

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »

Année 2021

N° 90

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Pierre BOULARD né le 15 janvier 1994 à Nevers (58)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 15 OCTOBRE 2021

**SUIVI DE LA MODULATION DE L'EXPRESSION DU FCRN DANS LES
LEUCOCYTES CHEZ LES PATIENTS TRANSPLANTES RENAU**

JURY

Président du Jury : Mr le Professeur Gilles Thibault, PU-PH, Faculté de Pharmacie et CHRU de TOURS

Membres du Jury : Mme la Professeur Claire Pouplard, PU-PH, Faculté de Pharmacie et CHRU de TOURS

Mr le Professeur Philippe Gatault, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Mme la Docteur Valérie Gouilleux-Gruart, MCU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Thèse dirigée par :

Mme la Docteur Valérie Gouilleux-Gruart, MCU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Mr le Professeur Gilles Thibault, PU-PH, Faculté de Pharmacie et CHRU de TOURS

ANNEE : 2021 - 2022

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAIE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

7 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistiques & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHÉMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

37 MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAIE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

2 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

2 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

HILALI	Soukaïna	PHARMACOGNOSIE
--------	----------	----------------

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 15/10/2021

L'étudiant

M Pierre Boulard

Le Doyen de la Faculté

Professeur Véronique Maupoil



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier le Pr Gilles Thibault de présider mon jury de thèse sur un thème qu'il connaît bien et qu'il affectionne : le FcRn. Je vous remercie pour vos conseils, votre soutien et votre bienveillance tout au long de ces 18 mois au sein du laboratoire d'immunologie.

Je remercie les Pr Claire Pouplard et Philippe Gatault de participer au jury de ma thèse d'exercice. En tant que coordinatrice du DES de biologie médicale, je remercie la Pr Pouplard pour son soutien lorsque je représentais les internes de biologie médicale. Je remercie le Pr Gatault de me permettre de profiter de son expertise en néphrologie pour éclairer mon travail de thèse.

Je suis profondément reconnaissant vis-à-vis de la Dr Valérie Gouilleux-Gruart, pour ses recommandations et son encadrement de mon travail de thèse. Je la remercie aussi de m'avoir permis de m'épanouir en immunologie et de m'avoir transmis sa passion du FcRn. Je la remercie pour sa patience, sa disponibilité, sa rigueur qui m'ont permis de progresser tout au long de ce travail de thèse et de mes 18 mois au sein du laboratoire d'immunologie. Je me réjouis de pouvoir continuer à travailler à ses côtés lors de mon master 2 puis lors de ma thèse de sciences.

Je tiens à remercier le Pr Hervé Watier pour son soutien et son écoute au cours de mes stages au laboratoire d'immunologie ainsi que pour la confiance qu'il me témoigne dans tous les projets que j'engage pour construire ma carrière hospitalo-universitaire.

Je souhaite remercier l'équipe du laboratoire d'immunologie de m'avoir aidé à découvrir les différentes facettes de l'immunologie puis à progresser dans cette merveilleuse discipline. Je remercie Arnaud et Loïc pour le temps qu'ils ont consacré à ma formation. Je remercie Bérénice Prieur pour son soutien, son aide lors de ces journées « recherche », pour sa bonne humeur et ses plaisanteries. Merci à toutes les techniciennes du laboratoire d'immunologie pour leur bienveillance et leur aide tout au long de mes stages.

Je remercie l'équipe FRAME et en particulier Juliette et Marie-Véronique de m'avoir encadré au cours de mes expérimentations à la faculté de Pharmacie puis à Vialle.

Je souhaite remercier ma famille en particulier mes parents. Vous êtes les deux piliers qui m'ont aidé à grandir et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour votre éducation, pour m'avoir donné le goût de la curiosité et de la science. Merci pour votre soutien, votre amour et vos encouragements. Merci Pauline pour ton grain de folie, ton amour, tu es un modèle pour moi. Merci à mes grands-parents et tous les membres de ma famille qui m'ont permis de me construire. Merci à ma belle-famille pour son soutien et sa présence en ce jour de soutenance.

Merci à toi Bérénice, tu partages ma vie et tu me permets de m'épanouir quotidiennement. Tu me soutiens dans mes périodes de doutes, de peur, de stress et tu as toujours le bon mot et la bonne attitude. Tu m'as connu au lendemain de ma première garde, nous sommes maintenant à ma soutenance de thèse d'exercice, que le temps passe vite. Saches que je t'admire et que je suis fier d'être à tes côtés pour toutes les étapes que la vie nous réserve.

Merci Thomas, Justine et Mathieu pour votre amitié et votre soutien au cours de ces 5 années à Clermont-Ferrand. Des souvenirs mémorables nous unissent. Merci Thomas pour tes encouragements, ton soutien dans mes entreprises personnelles et professionnelles ainsi que pour ton amitié sans faille.

Anne-Sophie, merci pour ta présence à mes côtés au fil des années. Merci pour ces moments partagés à New-York, "en salle verte" lors des révisions de nos internats respectifs, à Clermont-Ferrand, lors des réveillons et maintenant entre Tours et Nantes avec nos conjoints.

Merci à toi Jules pour ton amitié depuis le collège, en espérant que nos routes se croiseront toujours. Merci d'avoir été un soutien depuis toutes ces années.

Victoria, Emeline et Elodie, merci pour ces années d'internat partagées à vos côtés, merci pour vos fous rires, votre bonne humeur, votre soutien et vos encouragements. Que de souvenirs partagés ensemble !

Merci à mes co-internes, à tous ceux qui ont participé à mes côtés à la vie du BIBIPHT, en particulier Wayne, Joevin et Manu. Merci à tous de m'avoir permis de réaliser un internat comme j'en rêvais.

Merci à toi Thierry. Tu n'es malheureusement plus là en ce jour où je deviens docteur mais saches que tu es là, malgré tout, à mes côtés. Je ne serais ni pharmacien ni biologiste si tu n'avais pas su trouver les mots pour me donner l'envie d'exercer ce métier. Je te dédis cette thèse et ce travail.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS	2
SERMENT DE GALIEN	4
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES.....	8
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES ANNEXES.....	14
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION.....	17
1 LE FcRn OU RECEPTEUR NEONATAL POUR LA PORTION FC DES IgG.....	17
A. <i>Structure et ligands du FcRn</i>	17
i. Structure du FcRn.....	17
ii. Ligands du FcRn.....	17
iii. Interaction du FcRn avec ses ligands.....	19
B. <i>Expression du FcRn</i>	21
i. Expression tissulaire	21
ii. Régulation de l'expression	21
2 FONCTIONS DU FcRn	22
A. <i>Homéostasie des IgG et de l'albumine</i>	22
i. Recyclage et transcytose des IgG et de l'albumine	22
B. <i>Fonctions dans la réponse immunitaire</i>	23
i. Au sein de la réponse immunitaire innée.....	23
ii. Au sein de la réponse immunitaire adaptative	23
3 ROLES DU FcRn EN PATHOLOGIE	25
A. <i>FcRn et immunité anti-tumorale</i>	25
B. <i>FcRn et maladies auto-immunes</i>	26
C. <i>Autres situations pathologiques</i>	28
CONTEXTE ET OBJECTIFS	29
MATERIEL ET METHODES	30
	8

1	MATERIEL BIOLOGIQUE	30
2	CYTOMETRIE EN FLUX.....	30
3	WESTERN BLOT	32
4	DOSAGE DES CYTOKINES	34
5	ANALYSE STATISTIQUE.....	35
	RESULTATS.....	36
	PREMIERE PARTIE : MESURE QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION INTRACELLULAIRE DU FCRN DANS LES LEUCOCYTES PAR CYTOMETRIE EN FLUX	36
1	MISE AU POINT DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL	36
	<i>A. Création du panel d'analyse.....</i>	<i>36</i>
	<i>B. Optimisation du protocole expérimental</i>	<i>41</i>
	<i>C. Optimisation du fenêtrage des sous-populations cellulaires</i>	<i>43</i>
2	DEFINITION DES VALEURS NORMALES DE L'EXPRESSION DU FCRN	46
	DEUXIEME PARTIE : MODULATION DE L'EXPRESSION DU FCRN INTRACELLULAIRE AU COURS DE LA TRANSPLANTATION RENALE	49
1	EXPRESSION DU FCRN AU COURS DE LA TRANSPLANTATION RENALE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	49
2	CONFIRMATION DE LA MODULATION DE L'EXPRESSION DU FCRN PAR WESTERN BLOT.....	53
3	MODULATION DE L'EXPRESSION DU FCRN ET CONTEXTE INFLAMMATOIRE.....	54
	<i>A. La protéine C réactive</i>	<i>54</i>
	<i>B. Les cytokines plasmatiques</i>	<i>56</i>
4	MODULATION DE L'EXPRESSION DU FCRN ET MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE LA FONCTION RENALE	57
	<i>A. La créatinine</i>	<i>57</i>
	<i>B. Le débit de filtration glomérulaire</i>	<i>60</i>
5	MODULATION DE L'EXPRESSION DU FCRN ET ALBUMINE	62
6	SCHEMA GENERAL.....	70
	DISCUSSION.....	73
	CONCLUSION	78
	ANNEXES.....	79
	BIBLIOGRAPHIE.....	81

LISTE DES TABLEAUX

TABEAU I : LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES POUR LE WESTERN BLOT.....	34
TABEAU II : COMPARAISON DE LA CONCENTRATION EN CRP SELON L'EXPRESSION DU FcRN AU COURS DE LA TRANSPLANTATION EN FONCTION DES CINQ PERIODES DEFINIES PREALABLEMENT	55
TABEAU III : CORRELATION DE LA CONCENTRATION DE CRP EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN	55
TABEAU IV : COMPARAISON DE LA CONCENTRATION EN CYTOKINES DANS LES DEUX GROUPES DE PATIENTS DEFINIS SUR L'EXPRESSION DU FcRN	57
TABEAU V : COMPARAISON DE LA CONCENTRATION EN CREATININE SELON L'EXPRESSION DU FcRN AU COURS DE LA TRANSPLANTATION EN FONCTION DES CINQ PERIODES DEFINIES PREALABLEMENT	58
TABEAU VI : CORRELATION DE LA CONCENTRATION EN CREATININE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN	58
TABEAU VII : COMPARAISON DU DFG SELON L'EXPRESSION DU FcRN AU COURS DE LA TRANSPLANTATION EN FONCTION DES CINQ PERIODES DEFINIES PREALABLEMENT	60
TABEAU VIII : CORRELATION DU DFG EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN.....	61
TABEAU IX : COMPARAISON DE LA CONCENTRATION EN ALBUMINE DANS LES DEUX GROUPES DE PATIENTS DEFINIS SELON L'EXPRESSION DU FcRN AU COURS DU SUIVI DE LA TRANSPLANTATION	63
TABEAU X : CORRELATION DE LA CONCENTRATION EN ALBUMINE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN AU COURS DU SUIVI.....	63
TABEAU XI : COMPARAISON DE LA NUMERATION EN PNN, LYMPHOCYTES ET MONOCYTES DANS LES DEUX GROUPES DE PATIENTS DEFINIS SELON L'EXPRESSION DU FcRN AU COURS DU SUIVI.....	65
TABEAU XII : CORRELATION DE LA CONCENTRATION EN ALBUMINE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN AU SEIN DES SOUS-POPULATIONS CELLULAIRES AU COURS DU SUIVI DE LA TRANSPLANTATION (PRE-TRANSPLANTATION A J94).....	66
TABEAU XIII : CORRELATION DE LA CONCENTRATION EN ALBUMINE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN AU SEIN DES PNN	68
TABEAU XIV : CORRELATION DE LA CONCENTRATION EN ALBUMINE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN AU SEIN DES LYMPHOCYTES.....	68
TABEAU XV : CORRELATION DE LA CONCENTRATION EN ALBUMINE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN AU SEIN DES MONOCYTES.....	69

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU FcRn HUMAIN D'APRES RATH ET AL., J CLIN IMMUNOL, 2013 (33).....	19
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES DE RECYCLAGE ET TRANSCYTOSE DES IgG ET DE L'ALBUMINE D'APRES KNUDSEN SAND ET AL., 2014 (51).....	22
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PRESENTATION ANTIGENIQUE PAR LES CELLULES DENDRITIQUES, D'APRES SAND ET AL., FRONT IMMUNOL, 2014 (51).....	24
FIGURE 4 : ROLE DU FcRn DANS L'IMMUNOSURVEILLANCE DU CANCER (PARTIE GAUCHE) ET LES EFFETS DE SA DEREGLATION SUR LA CROISSANCE TUMORALE ET LES METASTASES (A DROITE), EN CAS DE SUREXPRESSION (EN BAS) OU DE SOUS-EXPRESSION (EN HAUT) D'APRES CADENA CASTANEDA ET AL., CANCER MEDICINE, 2020 (62)	26
FIGURE 5 : GAMME D'ETALONNAGE (DO EN FONCTION DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DE BSA EN $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) POUR LE DOSAGE DES ECHANTILLONS SELON LA METHODE DE BRADFORD ..	33
FIGURE 6 : STRATEGIE DE FENETRAGE POUR L'ISOLEMENT DES PNN	38
FIGURE 7 : STRATEGIE DE FENETRAGE POUR L'ISOLEMENT DES SOUS-TYPES LYMPHOCYTAIRES ..	39
FIGURE 8 : STRATEGIE DE FENETRAGE POUR L'ISOLEMENT DES SOUS-TYPES MONOCYTAIRES.....	40
FIGURE 9 : COMPARAISON DES RATIOS D'EXPRESSION DU FcRn SELON LE VOLUME D'ANTICORPS UTILISE POUR LE MARQUAGE EXTRACELLULAIRE	42
FIGURE 10 : COMPARAISON DES RATIOS D'EXPRESSION DU FcRn SELON LE VOLUME DE LYSE UTILISE POUR LA LYSE ERYTHROCYTAIRE	43
FIGURE 11 : COMPARAISON DU RATIO D'EXPRESSION DU FcRn DES PNN SELON LA STRATEGIE DE FENETRAGE	44
FIGURE 12 : COMPARAISON DU RATIO D'EXPRESSION DU FcRn DES LYMPHOCYTES NK SELON LA STRATEGIE DE FENETRAGE.....	45
FIGURE 13 : COMPARAISON DU RATIO D'EXPRESSION DU FcRn DES MONOCYTES SELON LA STRATEGIE DE FENETRAGE.....	46
FIGURE 14 : RATIO D'EXPRESSION DU FcRn AU SEIN DES SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES (LEUCOCYTES, PNN, LYMPHOCYTES, MONOCYTES)	47
FIGURE 15 : RATIO D'EXPRESSION DU FcRn AU SEIN DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES (LY T, LY B, LY NK).....	47
FIGURE 16 : RATIO D'EXPRESSION DU FcRn AU SEIN DES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES Mo1, Mo2 ET Mo3.....	48

FIGURE 17 : FIGURE : RATIO D'EXPRESSION DU FcRN CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS EN PRE-TRANSPLANTATION	49
FIGURE 18 : RATIO D'EXPRESSION DU FcRN MONOCYTAIRE CHEZ DES TEMOINS ET LES PATIENTS EN PRE-TRANSPLANTATION	50
FIGURE 19 : CINETIQUE D'EXPRESSION DU FcRN DANS LES LEUCOCYTES AU COURS DE LA TRANSPLANTATION RENALE EN CYTOMETRIE EN FLUX	51
FIGURE 20 : RATIO D'EXPRESSION DU FcRN CHEZ DES PATIENTS TRANSPLANTES RENALES CLASSES SELON LEUR APPARTENANCE AU PROFIL FcRN BAS OU PROFIL FcRN HAUT	52
FIGURE 21 : COMPARAISON DE L'EXPRESSION DU FcRN EN CYTOMETRIE EN FLUX <i>VERSUS</i> WESTERN BLOT	53
FIGURE 22 : CONCENTRATION EN CREATININE DE J7 A J94 EN FONCTION DE L'EXPRESSION DE FcRN SELON LE GROUPE DE PATIENTS	59
FIGURE 23 : DFG EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN DE J7 A J94 SELON LE GROUPE DE PATIENTS	62
FIGURE 24 : CONCENTRATION EN ALBUMINE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN SELON LE GROUPE DE PATIENTS ENTRE H4-J1,5	64
FIGURE 25 : CONCENTRATION EN ALBUMINE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DU FcRN DANS LES 2 GROUPES DE PATIENTS AU COURS DU SUIVI POST-TRANSPLANTATION (PRE-TRANSPLANTATION A J94) DANS LES PNN (A), LES LYMPHOCYTES (B), LES MONOCYTES (C)	67
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE GLOBALE DES MODIFICATIONS BIOLOGIQUES DANS LES DEUX GROUPES DE PATIENTS DEFINIS SELON LE PROFIL D'EXPRESSION DU FcRN AU COURS DU SUIVI DE LA TRANSPLANTATION RENALE	71

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : TABLEAU DESCRIPTIF DE LA COHORTE	79
ANNEXE 2 : VALEURS NORMALES DES RATIOS D'EXPRESSION DU FcRN DANS LES SOUS- POPULATIONS LEUCOCYTAIRES (LEUCOCYTES, PNN, LYMPHOCYTES, MONOCYTES) DE DONNEURS SAINS	80

LISTE DES ABREVIATIONS

A

Ac : Anticorps

AcM : Anticorps monoclonaux

Ag : Antigène

APC : Allophycocyanine

B

β_2m : β_2 -microglobuline

C

CD : Cluster de différenciation

CMF : Cytométrie en flux

CMH : Complexe majeur
d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices
d'antigène

CRP : Protéine C réactive

D

Da : Dalton

DFG : Débit de filtration glomérulaire

E

ECD : *Phycoerythrin-texas red-X*

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-
acétique

EFS : Etablissement français du sang

F

Fab : *Fragment antigen binding*

Fc : Fragment cristallisable

Fc γ R : Récepteurs pour le Fc des IgG

FCGRT : Gène du FcRn humain

fcgrt : Gène du FcRn murin

FcRn : Récepteur néonatal pour la
portion Fc des immunoglobulines G

FSC : *Forward scatter*

I

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

INF : Interféron

K

KO : *Krome orange*

L

Ly : Lymphocyte

MFI : Moyenne d'intensité de
fluorescence

N

NK : *Natural killer*

P

PB : *Pacific blue*

PBS : *Phosphate-buffered saline*

PC : Phycoérythrine-cyanine

PE : Phycoérythrine

PNN : Polynucléaires neutrophiles

S

SSC : *Sideward scatter*

SVF : Sérum de veau fœtal

T

TGF : *Transforming growth factor*

TNF : *Tumor necrosis factor*

INTRODUCTION

1 Le FcRn ou récepteur néonatal pour la portion Fc des IgG

Dans les années 1960, F.W Rogers Brambell proposa le concept d'un récepteur pour le Fc (fragment cristallisable) des immunoglobulines G (IgG) appelé récepteur de Brambell puis, ultérieurement, récepteur néonatal pour la portion Fc des IgG (FcRn) (1-5). D'après ses travaux, ce récepteur permettait la transmission des γ -globulines de la mère au fœtus pour protéger ce dernier des infections néonatales.

A. Structure et ligands du FcRn

i. Structure du FcRn

Le FcRn appartient à la famille des récepteurs pour le Fc des IgG (Fc γ R) (6, 7). Par sa structure hétérodimérique composée d'une chaîne lourde α de 40 kDa (Dalton) et de la β_2 -microglobuline (β_2 -m), il appartient également à la famille de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1 (8-15). La chaîne lourde est composée de 3 domaines extracellulaires (α_1 , α_2 , α_3), d'un domaine transmembranaire et d'une partie cytoplasmique (8, 9, 12). Elle est liée de façon non-covalente à la β_2 -m. Les domaines α_1 et α_2 forment un sillon similaire à celui permettant la présentation de peptides par les molécules du CMH aux lymphocytes T (Ly T). Cependant, Raghavan et Bjorkman ont montré que ce sillon ne peut pas accueillir de peptide, étant trop étroit (16, 17) ; il est donc admis que le FcRn n'a pas de capacité de présentation antigénique. La position du gène codant le FcRn est en dehors du *locus* des gènes du complexe du CMH (18). Le FcRn est présent en intracellulaire, majoritairement dans les endosomes, et en moindre quantité, en surface, lorsque l'endosome fusionne avec la membrane cellulaire. Le FcRn possède deux ligands principaux : les IgG et l'albumine (19).

ii. Ligands du FcRn

Les IgG furent les premiers ligands du FcRn décrits par Brambell. La transmission des γ -globulines de la mère au fœtus s'effectuait selon lui par

l'intermédiaire d'un récepteur au sein du syncytiotrophoblaste, appelé plus tard le FcRn (5). Les IgG sont composées d'un Fc et de deux *fragment antigen binding* (Fab), liés par une charnière. Deux chaînes lourdes γ et deux chaînes légères forment l'IgG. Chaque chaîne est composée de plusieurs domaines. Les domaines CH₂-CH₃ sont présents sur chaque chaîne lourde de l'IgG et forment le Fc avec la partie basse de la région charnière (20). Ce sont ces deux domaines qui sont impliqués dans la liaison au FcRn. Le FcRn peut lier toutes les sous-classes d'IgG (11). Les anticorps (Ac) monoclonaux (AcM) étant des analogues structuraux des immunoglobulines et principalement des IgG, ils se fixent similairement au FcRn.

Le FcRn est connu pour avoir un second ligand, l'albumine (21). L'albumine ainsi que les IgG sont les deux protéines les plus abondantes dans la circulation sanguine (19). L'albumine est une protéine importante en physiologie humaine, notamment pour le transport sanguin de nombreux ligands endogènes et exogènes (métabolites, hormones, ...), le maintien du pH ainsi que la régulation de la pression oncotique du sang (21). L'albumine est synthétisée par les hépatocytes (22) et dégradée dans les cellules endothéliales musculaires et cutanées, les hépatocytes et les tubules proximaux (23). L'albumine est composée de 3 domaines (DI, DII, DIII), c'est principalement le domaine III qui est impliqué dans la liaison au FcRn. Le site de liaison au FcRn se situe à l'opposé de celui des IgG (24-26), aucune compétition entre les ligands n'est donc retrouvée. Sur le plan stœchiométrique, l'albumine se lie au FcRn en 1:1 alors que les IgG ont une stœchiométrie pour le FcRn de 1:2 (27, 28), soit une IgG se liant à deux FcRn via ses deux chaînes lourdes.

Un autre ligand a été décrit par Alberio et *al.* : le fibrinogène. Ce dernier a la capacité de se lier au FcRn pour limiter sa dégradation lysosomiale (29).

En 2019, deux équipes ont montré que le FcRn était un récepteur nécessaire à l'infection par les Echovirus (30, 31). Ces virus de la famille des *Picornaviridae* sont à l'origine de méningites et d'encéphalites chez les enfants. Morosky et *al.* ont montré que la perte du FcRn entraîne une incapacité du virus à infecter la cellule (30).

iii. Interaction du FcRn avec ses ligands

Les IgG se lient au FcRn par leur Fc au niveau des domaines CH₂-CH₃. La liaison du FcRn aux IgG et à l'albumine est dépendante du pH. En effet, le Fc des IgG se lie avec une haute affinité au FcRn à pH 5-6 (pH des endosomes) et se dissocie à pH 7-7,4 (pH physiologique) (19, 32). Parmi les acides aminés importants dans la liaison au FcRn, deux histidines (His) (His310 et His435) et une isoleucine (Ile253) présents dans la portion Fc de l'IgG interagissent avec le FcRn (7) (figure 1). La protonation des histidines du Fc permet de créer une liaison ionique avec, entre autres, les résidus Asp130 et Glu115 présents sur le FcRn. La nécessité de ces acides aminés est confirmée par la mutation IHH (Ile253, His310 et His435) sur le Fc des IgG qui abolit complètement la liaison au FcRn à pH acide.

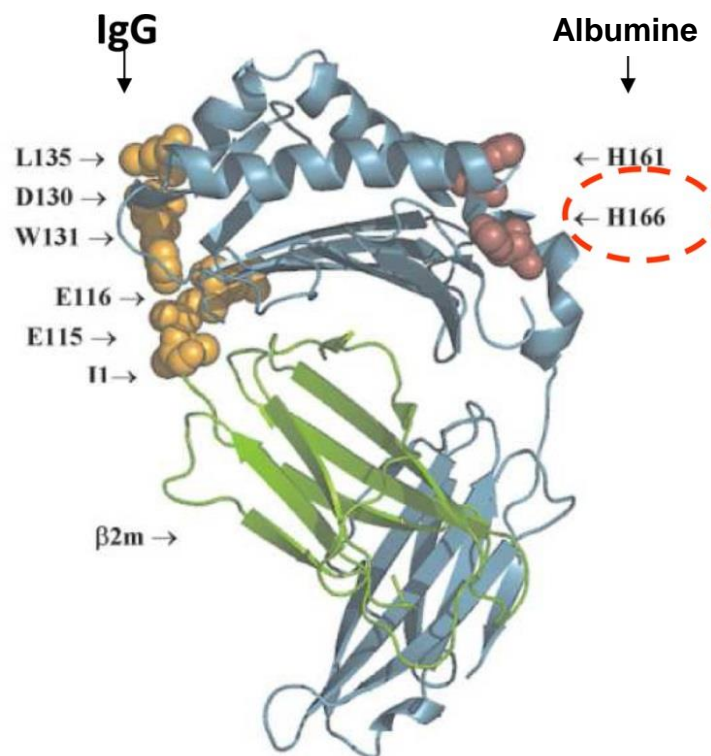


Figure 1 : Structure tridimensionnelle du FcRn humain d'après Rath et *al.*, J Clin Immunol, 2013 (33)

Le FcRn est un hétérodimère comprenant une chaîne lourde similaire au CMH de type 1 (bleu) qui est liée de façon non covalente à la β₂-m (vert). Les acides aminés nécessaires pour l'interaction avec l'IgG sont symbolisés en jaune. La liaison de l'albumine au FcRn (symbolisée en rouge) se situe à l'opposé du site de liaison aux IgG, avec la présence de l'histidine 166 considérée comme un acide aminé nécessaire à la liaison pH-dépendante à l'albumine.

Des travaux ont démontré que le *fragment antigen binding* (Fab) est aussi impliqué dans la liaison au FcRn. Wang et *al.* démontrèrent que des anticorps (Ac) ayant le même Fc mais des Fab différents, possèdent une liaison différente au FcRn ainsi qu'une demi-vie différente (34). Deux études récentes ont montré que des modifications physico-chimiques se produisaient au niveau du Fc de l'IgG lors de la formation d'un complexe Antigène (Ag)-IgG-FcRn (35, 36). Cela signifie que la liaison de l'Ag à son IgG ou AcM doit être prise en compte dans les interactions entre l'AcM/IgG et le FcRn. En dehors du Fab et de la fraction CH₂-CH₃, des variations au sein du CH₁ des IgG modifient la liaison au FcRn (37). Une autre équipe a isolé des variants d'IgG par mutation aléatoire ayant une affinité augmentée pour le FcRn. Ces mutations se situent dans le site de liaison au FcRn (CH₂-CH₃) mais aussi dans d'autres parties de l'IgG comme la charnière (38). Ces données soulignent l'importance de la prise en compte de l'intégralité de l'IgG lors de l'ingénierie d'un AcM, pour la liaison au FcRn.

L'albumine se lie au FcRn par une interaction entre trois histidines du domaine III de l'albumine (His464, His510, His535) et l'His166 présente sur le FcRn (21, 39). On remarque que ce sont des histidines de l'albumine qui permettent la liaison au FcRn ; ce sont aussi ces mêmes acides aminés qui sont impliqués dans la liaison au Fc des IgG. Grâce à la liaison de l'albumine ou des IgG au FcRn, de multiples applications sont développées en utilisant les propriétés de recyclage du FcRn pour augmenter la demi-vie de molécules (40).

Les écovirus sont présents dans les endosomes suite à leur liaison au FcRn. Le changement de pH au sein de ces endosomes permet la libération du génome viral et l'infection de la cellule. Contrairement à l'albumine et aux IgG, la liaison n'est pas pH-dépendante (31). De nombreux travaux restent à réaliser pour mieux comprendre les interactions entre le FcRn et ces virus et ainsi tester les inhibiteurs du FcRn en traitement préventif de ces infections.

B. Expression du FcRn

i. Expression tissulaire

Le FcRn est exprimé dans la majorité des organes de l'organisme humain de façon ubiquitaire et intracellulaire (41). Son expression a particulièrement été étudiée dans l'intestin, le placenta, les reins, le foie, les poumons ainsi que dans les cellules hématopoïétiques (les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles (PNN), les cellules dendritiques, les Ly B, les Ly T et Natural Killer (NK)) (7, 42), (Ramdani.Y et *al.*, Lupus, 2021, accepté pour publication). Au niveau rénal, le FcRn est exprimé dans les podocytes et les cellules des tubules proximaux (43).

ii. Régulation de l'expression

Chez l'Homme, la chaîne lourde α du FcRn (*FCGRT*) est codée par le chromosome 19 (44). L'expression du gène *FCGRT* est régulée par deux facteurs de transcription sensibles à la méthylation (Zbtb7a et Sp1) ainsi que deux micro ARNs (acides ribonucléiques) (*hsa-miR-3181*, *hsa-miR-3136-3p*) (45, 46). Un polymorphisme de type VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) est présent sur le promoteur du FcRn dans la région 5' (47). Liu et *al.* ont montré que l'expression du FcRn est régulée par des cytokines. Le *tumor necrosis factor α* (TNF α) permet une surexpression du FcRn par la voie *nuclear factor- κ B* alors que l'interféron (INF) γ entraîne une sous expression de la protéine par la voie JAK/STAT-1 (48, 49). Dernièrement, la même équipe a montré que le *transforming growth factor* (TGF) β -1 permet une surexpression du FcRn par la voie JNK/MAPK chez le porc (50). Ces différents travaux montrent que l'expression du FcRn est modulable.

2 Fonctions du FcRn

A. Homéostasie des IgG et de l'albumine

i. Recyclage et transcytose des IgG et de l'albumine

Les premières fonctions du FcRn décrites furent celles du recyclage et de la transcytose des IgG puis de l'albumine, permettant de maintenir leurs concentrations sanguines constantes et leurs biodistributions (figure 2).

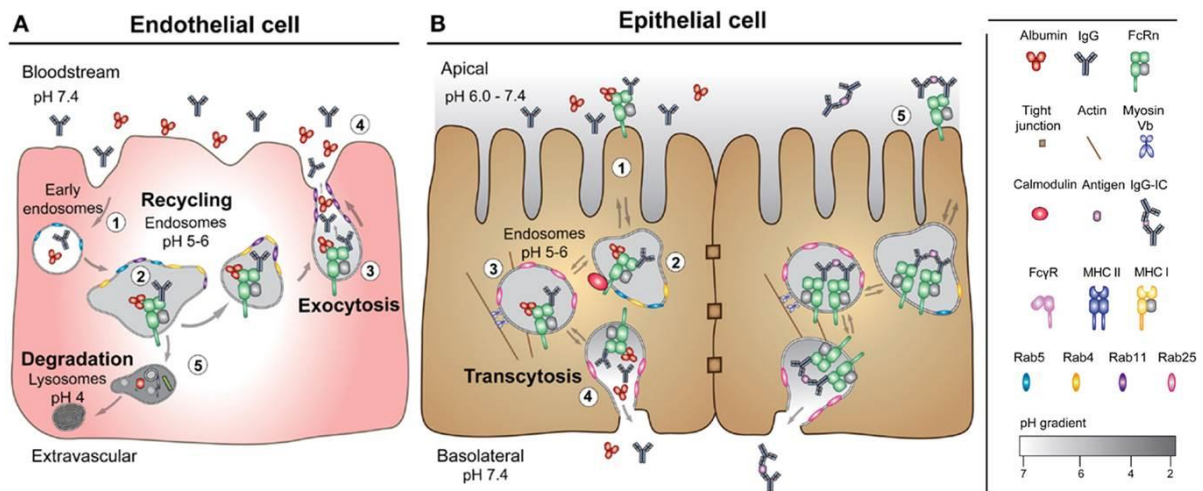


Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes de recyclage et transcytose des IgG et de l'albumine d'après Knudsen Sand et al., 2014 (51)

(A) Processus de recyclage au sein de la cellule endothéliale : (1) pinocytose des IgG et de l'albumine, incorporation de l'albumine et des IgG dans les endosomes précoces (Rab 5). (2) Fusion avec les endosomes tardifs (Rab 4 et Rab 11), possédant un pH acide. (3-4) Exocytose et relargage des protéines à pH neutre dans le milieu extracellulaire. (5) Les protéines non liées au FcRn (= non protégées) sont dégradées dans les lysosomes après avoir transité dans les endosomes tardifs. (B) Processus de transcytose dans les cellules polarisées (ici, épithéliales) : (1) liaison des protéines au FcRn au pôle apical à pH acide. (2-3) Intégration des complexes IgG-FcRn-albumine dans le trafic de transcytose, impliquant les protéines cytosquelettiques MyoVb et Rab25. (4) Fusion des endosomes avec la membrane cellulaire au niveau basal et libération des ligands à pH neutre. (5) Le FcRn permet également la transcytose des complexes immuns (IgG-IC).

Les principales étapes du recyclage/transcytose des ligands du FcRn sont décrites dans la figure 2. Une internalisation du ligand par pinocytose et une liaison au FcRn suite à la fusion avec l'endosome tardif sont décrits. Puis il est relargué en extracellulaire, à pH neutre, du même côté que son internalisation (pour le recyclage)

ou du côté opposé (pour la transcytose). Le transfert des immunoglobulines tel que décrit par Brambell, permet le passage des IgG par transcytose de la mère au fœtus et sa protection contre les infections néonatales (5, 52). Selon l'organe, le mécanisme de transcytose des IgG peut être uni ou bidirectionnel. Dans le rein, Sarav et *al.* ont montré que le FcRn permet le recyclage sanguin de l'albumine et l'excrétion urinaire des IgG au sein des glomérules, les IgG étant réabsorbées dans les cellules tubulaires proximales (53).

B. Fonctions dans la réponse immunitaire

i. Au sein de la réponse immunitaire innée

Le FcRn est un acteur de la phagocytose. La phagocytose est un mécanisme permettant la destruction des pathogènes extracellulaires au sein des phagolysosomes. Les opsonines, dont font partie les IgG1 et 3, permettent une fixation du phagocyte (PNN, monocytes/macrophages) au pathogène. La fixation des IgG au pathogène se fait par la partie Fab pour une reconnaissance spécifique de l'antigène, la partie Fc se fixe au FcγR du phagocyte. A l'intérieur de la cellule, dans les endosomes, le pathogène opsonisé se détache du FcγR pour se fixer au FcRn grâce aux IgG, suite à l'acidification du phagosome. Le pathogène sera ensuite détruit dans les lysosomes (54). La taille du complexe immunitaire influe sur son devenir au sein du phagolysosome, les complexes immunitaires de tailles importantes seront orientés vers les lysosomes alors que les complexes immunitaires de petite taille seront pris en charge comme des IgG et seront recyclés (55).

ii. Au sein de la réponse immunitaire adaptative

Le FcRn est exprimé au sein des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques ... Dans les CPA, le FcRn recycle les IgG et l'albumine mais possède aussi un rôle dans la présentation de l'antigène. Baker et *al.* ont montré que le FcRn, en coopération avec le FcγR, permettait la présentation des antigènes aux Ly T CD4⁺ et CD8⁺ par les cellules dendritiques, en intégrant les Ag dans ses compartiments intracellulaires afin qu'ils soient processés et apprêtés par les molécules de CMH I et II (56). Le FcRn

intervient également dans la présentation croisée des peptides antigéniques. La présentation croisée étant le mécanisme immunologique où les Ag extracellulaires, habituellement présentés par les molécules de CMH II, sont présentés aux Ly T CD8⁺ par les molécules de CMH I pour les activer (figure 3). Plus récemment, il a été montré par Hubbard et *al.* que la coopération entre le CD32a (FcγRIIa) et le FcRn augmente significativement la réponse immunitaire vis-à-vis d'un complexe immun (57).

Les principales étapes de la présentation antigénique sont exposées dans la figure 3. Le complexe immun est internalisé suite à la liaison au FcγR. Après acidification de l'endosome, le complexe immun (IgG-Ag) se fixe sur le FcRn. Celui-ci participe à l'orientation du complexe immun vers les compartiments de chargement. Le complexe immun sera ensuite présenté sur les molécules du CMH de classe I ou II.

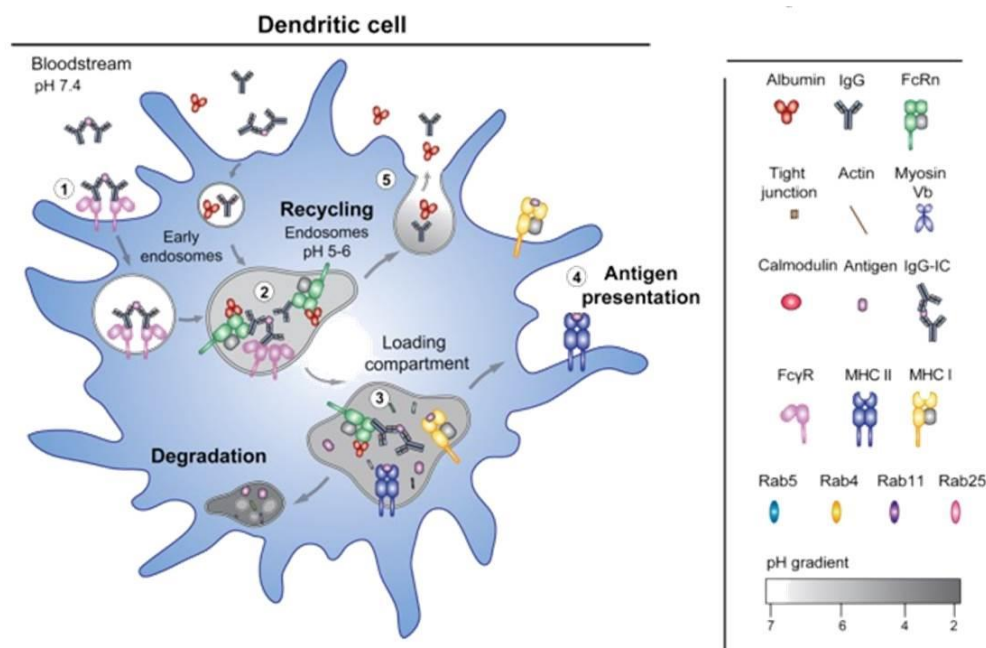


Figure 3 : Représentation schématique de la présentation antigénique par les cellules dendritiques, d'après Sand et *al.*, Front Immunol, 2014 (51)

Les cellules dendritiques expriment à la fois les récepteurs FcRn et FcγR classiques. (1) La liaison croisée d'un complexe immun, contenant des IgG (IgG-CI), aux FcγR exprimés en surface, conduit à leur internalisation dans les endosomes précoces. (2) Après l'internalisation, les endosomes s'acidifient ce qui permet la liaison des complexes immuns au FcRn. (3) Le FcRn oriente les complexes immuns vers des « compartiments de chargement » pour la prise en charge des peptides antigéniques sur le CMH I et II. (4) Les molécules de CMH I et II, une fois chargées, vont se diriger vers la membrane plasmique pour la présentation des peptides aux cellules T. (5) Les ligands sous forme monomériques peuvent quant à eux être recyclés par les cellules dendritiques.

Au niveau intestinal, le FcRn permet la transcytose des complexes immuns (IgG/Ag) de la lumière intestinale vers la *lamina propria* pour amener l'Ag aux cellules dendritiques sous-jacentes. Il permet aussi la transcytose des IgG synthétisées dans la *lamina propria* vers la lumière intestinale pour capter l'Ag (58), appuyant ainsi le rôle du FcRn au cours de la réponse immunitaire adaptative.

Le FcRn ne doit donc pas être restreint à ses fonctions originelles mais doit être considéré comme un acteur de l'immunité à part entière.

3 Rôles du FcRn en pathologie

A. FcRn et immunité anti-tumorale

En 2013, Baker et *al.* ont décrit la participation du FcRn dans l'immunité anti-tumorale (59). Chez des souris *fcgrt*^{-/-}, ils ont décrit une diminution des Ly T CD8⁺ reliée à la diminution de l'expression du FcRn au sein des cellules dendritiques CD8⁻CD11b⁺. De plus, les cellules dendritiques des souris *fcgrt*^{-/-} produisent moins de cytokines stimulant la réponse T cytotoxique.

Dans le cancer du poumon non à petites cellules, il a été démontré que le FcRn est moins exprimé dans le tissu cancéreux, comparé au tissu sain et que cette diminution d'expression est inversement corrélée au pronostic du patient (60).

Par ailleurs, l'albumine est captée par les cellules tumorales via le FcRn, dans de nombreux tissus. La diminution de l'expression du FcRn au sein de ces cellules, entraîne une diminution du recyclage de l'albumine et permet son utilisation comme nutriment par les cellules cancéreuses (61). L'expansion tumorale est ainsi favorisée par l'absence du FcRn au sein du tissu cancéreux. Les différents rôles et implications du FcRn dans l'immunité anti-tumorale sont décrits dans la figure 4.

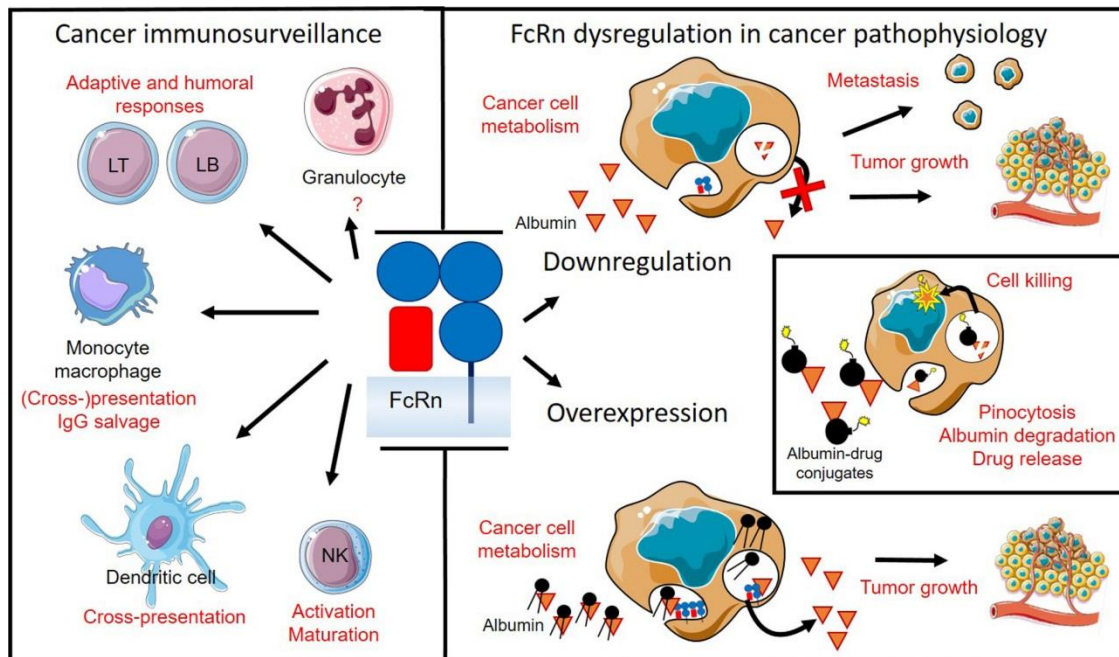


Image credits; Servier Medical ART (<https://smart.servier.com/>)

Figure 4 : Rôle du FcRn dans l'immunosurveillance du cancer (partie gauche) et les effets de sa dérégulation sur la croissance tumorale et les métastases (à droite), en cas de surexpression (en bas) ou de sous-expression (en haut) d'après Cadena Castaneda et al., Cancer Medicine, 2020 (62)

Dans l'encart sur la partie droite, le mécanisme d'action attendu des conjugués albumine-médicament sur les cellules cancéreuses, qui sous-expriment le FcRn, est décrit. L'albumine est pinocytée et dirigée vers les endosomes. En l'absence du FcRn, elle est digérée au lieu d'être recyclée vers la membrane. Le traitement avec des conjugués albumine-médicament conduit au catabolisme de la fraction protéique et à l'accumulation cellulaire du médicament cytotoxique. LB et LT représentent respectivement les lymphocytes B et T. L'albumine est représentée par des triangles orange ; la fraction médicamenteuse cytotoxique est représentée par des bombes et les nutriments par une boule avec deux chaînes latérales, également en noir.

B. FcRn et maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont des pathologies systémiques ou spécifiques d'organes, où la rupture de la tolérance au soi entraîne des lésions cellulaires ou tissulaires par l'intermédiaire des Ly T et B auto-réactifs. Ces derniers produisent des auto-anticorps spécifiques d'auto-antigènes. Les maladies auto-immunes dépendent de facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux dont la présence, chez certains patients, les prédisposent à ces pathologies. Mais leurs étiologies précises sont souvent inconnues (63).

Le FcRn prend en charge les auto-anticorps retrouvés en pathologie car ce sont le plus souvent des IgG (64). Il augmente leur demi-vie par sa fonction de

recyclage. Cela a été suggéré par Liu et *al.* puisque les souris n'ayant pas de β_2 -m présentaient moins de signes cliniques de pemphigoïde bulleuse en comparaison aux souris sauvages, lors d'une injection d'auto-anticorps spécifiques (65). L'implication du FcRn dans le recyclage des auto-anticorps a été confirmée ultérieurement dans d'autres modèles de maladies auto-immunes : l'épidermolyse bulleuse acquise (66) ou la polyarthrite rhumatoïde (67) par des modèles de souris avec un FcRn invalidé. L'absence de recyclage des auto-anticorps par blocage du FcRn est une des possibilités thérapeutiques dans les maladies auto-immunes. Actuellement, des AcM ciblant le FcRn sont en étude de phase III. Ils ciblent le FcRn, soit par leur Fab, soit en possédant un Fc ayant une affinité supérieure à celui des IgG physiologiques. Ces traitements sont testés dans la myasthénie (68), le purpura thrombopénique idiopathique (69), les polyradiculonévrites inflammatoires démyélinisantes chroniques, l'anémie hémolytique dite à « anticorps chauds » et l'anémie hémolytique du nouveau-né (70) .

Une autre fonction du FcRn ayant un impact en auto-immunité est la transcytose. En effet, le FcRn permet le passage placentaire des IgG maternelles au fœtus au cours de la grossesse. Par ce mécanisme, des auto-anticorps lupiques comme les anti-SSa/Ro passent la barrière placentaire et des lupus néonataux (blocs auriculo-ventriculaires, manifestations cutanées) ont été observés chez les nouveau-nés de patientes lupiques (71). Des anémies ou thrombopénies auto-immunes néonatales ont aussi été décrites dans la littérature pouvant impliquer le FcRn dans la transcytose d'auto-anticorps (72).

Au niveau rénal, la transcytose permet de protéger le rein dans les glomérulonéphrites. En effet, certaines équipes ont montré que l'absence du FcRn entraîne une accumulation des auto-anticorps et une majoration de la pathologie (73). Ces données sont parfois contestées par d'autres publications où l'inactivation du FcRn n'entraîne pas de protéinurie ou de lésions glomérulaires (74).

L'implication du FcRn dans les maladies auto-immunes est indéniable (75), confortant le développement de thérapies impliquant le FcRn.

C. Autres situations pathologiques

En 2013, Baker a montré que la production d'IL-12 à partir de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains, en réponse aux complexes immuns, dépend du FcRn (59). Dans le cadre de la recherche sur les Ac anti-FcRn, les équipes de Blumberg ont testé les effets sur la réponse immunitaire du SYNT001 (Orilanolimab), AcM bloquant le FcRn en se fixant par son Fab. En présence du SYNT001, une diminution de la sécrétion de TNF α et d'IL-6 par les cellules dendritiques en réponse à des complexes immuns est observée (76). Ainsi par son activité sur la synthèse de cytokines inflammatoires, le FcRn participe à la réaction inflammatoire, composante de nombreuses pathologies.

D'autre part, le FcRn participe, par sa capacité de transcytose, à la réaction immunitaire contre les pathogènes. Il permet la libération en intra-luminal d'IgG dirigées contre un pathogène intestinal comme *Citrobacter rodentium* (77). D'autres études ont montré son implication dans l'immunité gastrique contre *Helicobacter heilmannii* (78) ou dans les infections génitales à *Chlamydiae muridarum* (79).

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Le FcRn est un récepteur jouant un rôle central dans l'homéostasie des IgG. Les modulations de son expression par des cytokines et dans des pathologies à complexes immuns comme le lupus, ont été décrites. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant d'étudier la transplantation rénale car il est admis que, lors de cette chirurgie et de ses conséquences, le système immunitaire est mis en jeu. En effet, il existe une réaction immunitaire de l'hôte envers le greffon, considéré comme du non-soi, associée à une réaction inflammatoire importante.

Dans cette étude, nous avons commencé par la mise au point d'un protocole d'analyse de l'expression du FcRn par cytométrie en flux sur sang total. Grâce à cette mise au point, nous avons déterminé des valeurs normales de l'expression intracellulaire de ce récepteur au sein des sous populations leucocytaires. Puis nous avons étudié la modulation de ce récepteur au cours de la transplantation rénale. Nous avons étudié les liens entre les paramètres biologiques et cliniques des patients et la modulation de ce récepteur.

MATERIEL ET METHODES

1 Matériel biologique

Les valeurs normales de l'expression du FcRn sont obtenues à partir de sang de donneurs sains prélevé sur tube EDTA (Acide éthylène diamine tétra-acétique) grâce à la convention établie avec l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Tours (agrément N° CA-REC-2019-188).

Le sang (prélevé sur tube EDTA) des patients hospitalisés dans le service de néphrologie/transplantation rénale du CHRU de Tours provient d'un fond de tube préalablement analysé (numération, phénotypage lymphocytaire) au sein du laboratoire de biologie médicale du CHRU de Tours. Les données cliniques et biologiques collectées proviennent de la cohorte prospective de patients transplantés rénaux et des données ASTRE [“Commission Nationale Informatique et Liberté” (CNIL) autorisation n° : DR-2012-518], pour laquelle chaque patient a consenti à participer de façon libre et éclairée.

Le plasma des patients est récupéré à partir du sang (prélevé sur tube EDTA) par centrifugation à 1000g pendant 10 min. Il est congelé à -80°C dans les 12 heures suivant le prélèvement.

2 Cytométrie en flux

Pour étudier les modulations de l'expression du FcRn, nous avons réalisé un protocole d'analyse en cytométrie en flux comportant plusieurs étapes de marquages et de fixation en raison de la présence en intracellulaire du FcRn.

Le sang collecté est maintenu à température ambiante (18-25°C) avant le marquage. La réalisation de 2 lavages successifs de 300 µL de sang avec 10mL de PBS (*phosphate buffered saline*, réf 1011, Immunoconcepts™) contenant 2mM d'EDTA et 2% de sérum de veau foetal (SVF) permet l'élimination du plasma afin de récupérer les leucocytes. Ces lavages sont réalisés par centrifugation de 10 et 5 minutes (min), 300g, à 18-22°C. Le culot cellulaire est ensuite récupéré et remis en suspension dans 300µL de PBS.

Les différentes sous populations leucocytaires expriment à leur surface des molécules ou Clusters de Différenciation (CD). Afin d'identifier les cellules d'intérêt, ces clusters sont marqués par des Ac monoclonaux couplés à des fluorochromes. Les différents Ac utilisés dans notre étude proviennent de chez Beckman CoulterTM, le fournisseur ayant établi les volumes nécessaires pour chaque test :

- Pour tous les leucocytes : 10 µL d'Ac anti-CD45 KO (*krome orange*) (Réf : B36294)
- Pour les PNN : 10 µL d'Ac anti-CD66 APC (allophycocyanine) (Réf B15091)
- Pour les Ly T : 10 µL d'Ac anti-CD3 PC7 (phycoérythrine-cyanine 7) (Réf : 737657)
- Pour les Ly B : 10 µL d'Ac anti-CD19 PB (*pacific blue*) (Réf : B49213)
- Pour les monocytes : 10 µL d'Ac anti-CD14 ECD (*phycoerythrin-texas red-X*) (Réf : B92391)
- Pour le FcγRIIIa présent sur les Ly NK et les monocytes : 20 µL d'Ac anti-CD16 PE (phycoérythrine) (Réf : A07766)
- Pour les Ly NK : 10 µL d'Ac anti-CD56 APC-Alexa Fluor 750 (Réf B46024)

Cent µl de cellules sont marqués par le mix composé des anticorps cités ci-dessus. Cinq µL de *Fc block* (*Fc Blocking Reagent*, humain, 130-059-901, MiltenyiTM) sont ajoutés au mélange réactionnel pour saturer les récepteurs Fc des leucocytes avant de l'homogénéiser. Le mix est incubé 15 min à 4°C à l'abri de la lumière. Après incubation, 2 mL de VersaLyse (réf A09777, Beckman CoulterTM) sont ajoutés aux tubes. Le tout est homogénéisé et incubé à 18-22°C à l'abri de la lumière pendant 15 min. Une centrifugation à 300g, 5 min, 18-22°C est ensuite réalisée et le surnageant est éliminé.

Afin de conserver le marquage extracellulaire lors du marquage intracellulaire du FcRn, deux étapes de fixations différentes ont été adaptées. Les leucocytes sont fixés une première fois avec 150µL de para-formaldéhyde 4% (réf 28908, ThermofisherTM) puis incubés 15 min à 4°C à l'abri de la lumière. Une deuxième étape de fixation et de perméabilisation est ensuite appliquée avec 150µL de fixateur du kit *FlowX FoxP3/Transcription Factor Fixation and Permabilisation Buffer Kit* (réf FC012-100, R&D SystemTM). Un lavage par centrifugation (300g, 5 min, à 4°C) est réalisé au PBS EDTA 2mM SVF 2% après chaque fixation.

Le marquage intracellulaire du FcRn est réalisé par addition de l'anticorps anti-FcRn marqué au FITC (*Fluorescein Isotocyanate*) dilué au 1/100 (réf IC8639G, R&D System™) ou par son isotype dilué au 1/10 (réf IC00416, R&D System™). Après incubation (30 min, à 4°C, à l'abri de la lumière), les cellules sont centrifugées à 300g, 5 min, à 4°C. Après avoir retiré le surnageant, les cellules sont suspendues dans 250µL de PBS EDTA 2mM SVF 2% avant une analyse par le Navios™.

Les cellules sont analysées sur un cytomètre possédant 3 lasers et 10 détecteurs de fluorescences (FSC, SSC et huit canaux pour les fluorochromes). L'automate est calibré en utilisant un kit de billes Flow Check (Réf : A70454-AF) et Flow Set (Réf : A69044-AF) de Beckman Coulter™. Les fichiers générés par le Navios™ sont analysés sur le logiciel Kaluza™ (Beckman Coulter™).

3 Western Blot

Un mL de sang prélevé sur EDTA est centrifugé à 1000g pendant 10 min. Après élimination du plasma et un second lavage au PBS, le culot leucocytaire est récupéré et stocké à -80°C. La préparation des échantillons est réalisée à 4°C (dans la glace). La lyse cellulaire est obtenue par un tampon de lyse 1% de Nonidet P40 (Sigma™), 50 mM Tris 1 M pH 7,5 (Sigma™), 10% de glycérol (Sigma™) et 150 mM de NaCl 5 M (Merck™) auquel est ajouté extemporanément 4% de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche™) et 0,5% de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF, Sigma™). Les lysats cellulaires sont placés dans la glace pendant 30 min (vortex toutes les 10 min) avant d'être centrifugés (13 000 tr/min, 15 min à 4°C) afin de récupérer les surnageants. La quantité de protéines dans les surnageants est dosée par la méthode de Bradford (méthode colorimétrique, lecture à 595 nm).

Une gamme de *Bovine Serum Albumine* (BSA, Kit Thermo Scientific™), servant de courbe d'étalonnage (figure 5) permet de déterminer la concentration de chacun des échantillons.

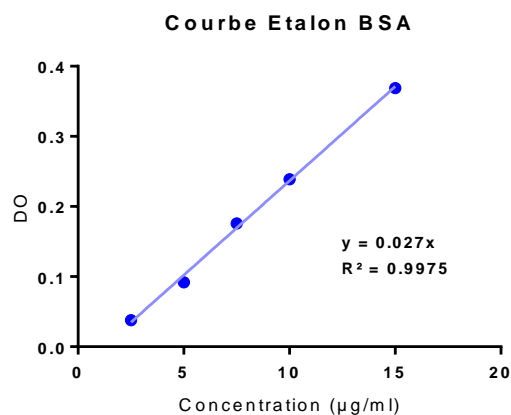


Figure 5 : Gamme d'étalonnage (DO en fonction des concentrations croissantes de BSA en µg/µL) pour le dosage des échantillons selon la méthode de Bradford

Trente µg de protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE en présence d'un marqueur de poids moléculaire (ProSieve™ QuadColor™, Lonza™ #00193837). Le tampon de migration MES-SDS 1X (Life Technologies™) a été utilisé pour séparer les protéines par électrophorèse. Après cette étape, les protéines sont transférées (Transfert semi-Dry - Equipement BioRad Trans-Blot™) sur une membrane de nitrocellulose (Thermo Scientific™) à l'aide d'un tampon Tris-Glycine Transfert Buffer 1X (Euromedex™) et 20% d'éthanol (VWR™).

Après saturation en PBS-*Tween* et 5% de lait pendant 1h sur agitation à température ambiante, la membrane est incubée avec les anticorps nécessaires à notre étude (tableau I). Le FcRn possède un poids moléculaire d'environ 42 kDa, très proche de ceux des gènes de ménage utilisés. Par conséquent, il sera nécessaire d'éliminer les anticorps fixés à la membrane en réalisant un *stripping* pendant 5 min avec une solution contenant 15 g/L de glycine (Sigma™), 1g de dodécylsulfate de sodium (SDS, Sigma™) et 1% de Tween 20 (Sigma™) entre chaque incubation d'anticorps pour pouvoir normaliser le dépôt des protéines par rapport à l'actine (40 kD). Lorsque la membrane est deshybridée, elle est lavée avec du PBS 1X pendant 10 min suivie par 2 lavages avec du PBS-T 0,2% pendant 10 min. La membrane peut à nouveau être saturée par le PBS-*Tween*/Lait puis incubée avec un nouvel anticorps.

Anticorps	Références	Dilutions	Durée d'incubation
FcRn - HRP	Santa Cruz™ AcMo souris sc-271745 #E2516	1/800 ^{ème}	1 heure
β-Actine - HRP	Santa Cruz™ AcMo souris sc-47778 #J2915	1/8000 ^{ème}	1 heure

Tableau I : Liste des anticorps primaires utilisés pour le Western Blot

Après l'incubation avec l'anticorps, trois lavages de 10 min de la membrane avec du PBS-T 0,2% sont réalisés. La révélation de nos membranes est réalisée par chimiluminescence à l'aide d'une solution commerciale de révélation (SuperSignal West Femto™, Thermo Scientific™). La lecture des membranes est réalisée avec le Fusion FX826 de Vilbert Lourmat.

La quantification des bandes est obtenue avec le logiciel ImageJ™ en déterminant les aires sous la courbe (*Area Under Curve*, AUC) des différents pics protéiques. Les résultats sont normalisés et exprimés selon un rapport FcRn/β-Actine. Cette normalisation permet de s'affranchir d'éventuelles variations de dépôt de nos échantillons dans chaque puits. De plus, l'utilisation de marqueurs de poids moléculaire permet de vérifier la taille des protéines révélée par les anticorps.

4 Dosage des cytokines

Le dosage des cytokines est réalisé avec le kit *LEGEND plex Multiplex Assays* (Cat. No. 740503, *Human Macrophage/Microglia Panel*) selon la procédure recommandée par le fournisseur. Les cytokines suivantes sont dosées : TNF-α, IL-6, IL-4, IL-10, IL-1β, CCL17, IL-1RA, IL-12p40, IL-12p70, IL-23, IFN-γ, CXCL10. L'analyse est réalisée par cytométrie en flux, à partir de billes d'intensité de fluorescence différentes, couplées à des Ac spécifiques de chaque cytokine. Les protocoles d'analyse sont fournis par le fournisseur. Celui du Cytoflex™ (Beckman Coulter™) a été utilisé.

Une gamme standard de cytokines permet d'évaluer la concentration de chacune d'elles dans un échantillon donné. Un volume de 25µL est nécessaire pour chaque dosage. Les dosages sont réalisés en *duplicate* sur le plasma des patients.

5 Analyse statistique

Les données brutes, dont les MFI, ainsi que les ratios de MFI sont analysés par le logiciel GraphPad PrismTM 7.03. Le test non paramétrique de Wilcoxon a été réalisé pour les séries d'échantillons appariés, celui de Mann-Whitney a été utilisé pour les séries d'échantillons non appariés. Le test de Spearman a été réalisé pour les corrélations.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE : MESURE QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION INTRACELLULAIRE DU FcRn DANS LES LEUCOCYTES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

1 Mise au point du protocole expérimental

Le FcRn étant une protéine intracellulaire, la mesure de son expression sur sang prélevé sur tube EDTA, nécessite un protocole expérimental différent de ceux utilisés actuellement pour les analyses réalisées au laboratoire hospitalier. L'utilisation du sang nécessite l'utilisation d'une lyse permettant d'éliminer les érythrocytes, tout en préservant l'intégrité des leucocytes, en particulier les PNN. La lyse utilisée lors des suivis lymphocytaires au laboratoire hospitalier ne permettant pas de garantir cette intégrité, nous avons donc choisi la Versalyse (lyse enzymatique). Deux étapes de marquage sont nécessaires : la première permet d'isoler un sous-type leucocytaire en fonction du CD que la cellule exprime à sa membrane, la seconde permet de mesurer l'expression du FcRn au sein du sous-type leucocytaire à l'aide d'un Ac anti-FcRn et d'un isotype de l'anti-FcRn, ce dernier permet de tenir compte de la fixation aspécifique de l'Ac anti-FcRn.

Notre protéine d'intérêt étant intracellulaire, une double fixation est nécessaire avant le marquage intracellulaire. Le FcRn étant principalement dans les endosomes, la double fixation permet de fixer la membrane plasmique et endosomale. Celles-ci sont perméabilisées lors de la deuxième étape de fixation afin que l'anti-FcRn atteigne sa cible.

A. Création du panel d'analyse

Les données acquises par le NaviosTM sont traitées sur un logiciel d'analyse de cytométrie en flux, KaluzaTM. Un outil, le composite, a permis le traitement combiné des données acquises avec l'isotype de l'anti-FcRn et avec l'anti-FcRn.

Pour analyser l'expression du FcRn dans les sous-populations leucocytaires, l'élimination des doublets est nécessaire en identifiant uniquement les singulets. Ensuite, les cellules vivantes sont identifiées avec un marqueur de viabilité. Les cellules vivantes (nommé *Live* en figure 6, 7, 8) correspondent aux cellules non marquées. L'expression du FcRn sur l'ensemble des leucocytes est déterminée à partir des cellules vivantes (nommé FcRn Total en figure 6, 7, 8). L'expression variable du CD45 permet d'identifier les PNN (nommé NEUTRO en figure 6, 7, 8), les monocytes (nommé MONO en figure 6, 7, 8) et les lymphocytes (nommé LYMPH en figure 6, 7, 8).

L'expression du FcRn des PNN est déterminée de deux manières différentes (figure 6). Dans une première méthode, à partir de la fenêtre $CD45^{dim}/SSC^{high}$, les cellules exprimant FcRn sont identifiées parmi les cellules CD66 positives (CD spécifique des PNN). La seconde méthode consiste en l'identification des cellules exprimant FcRn directement à partir de la fenêtre $CD45^{dim}/SSC^{high}$ (nommé NEUTRO en figure 6).

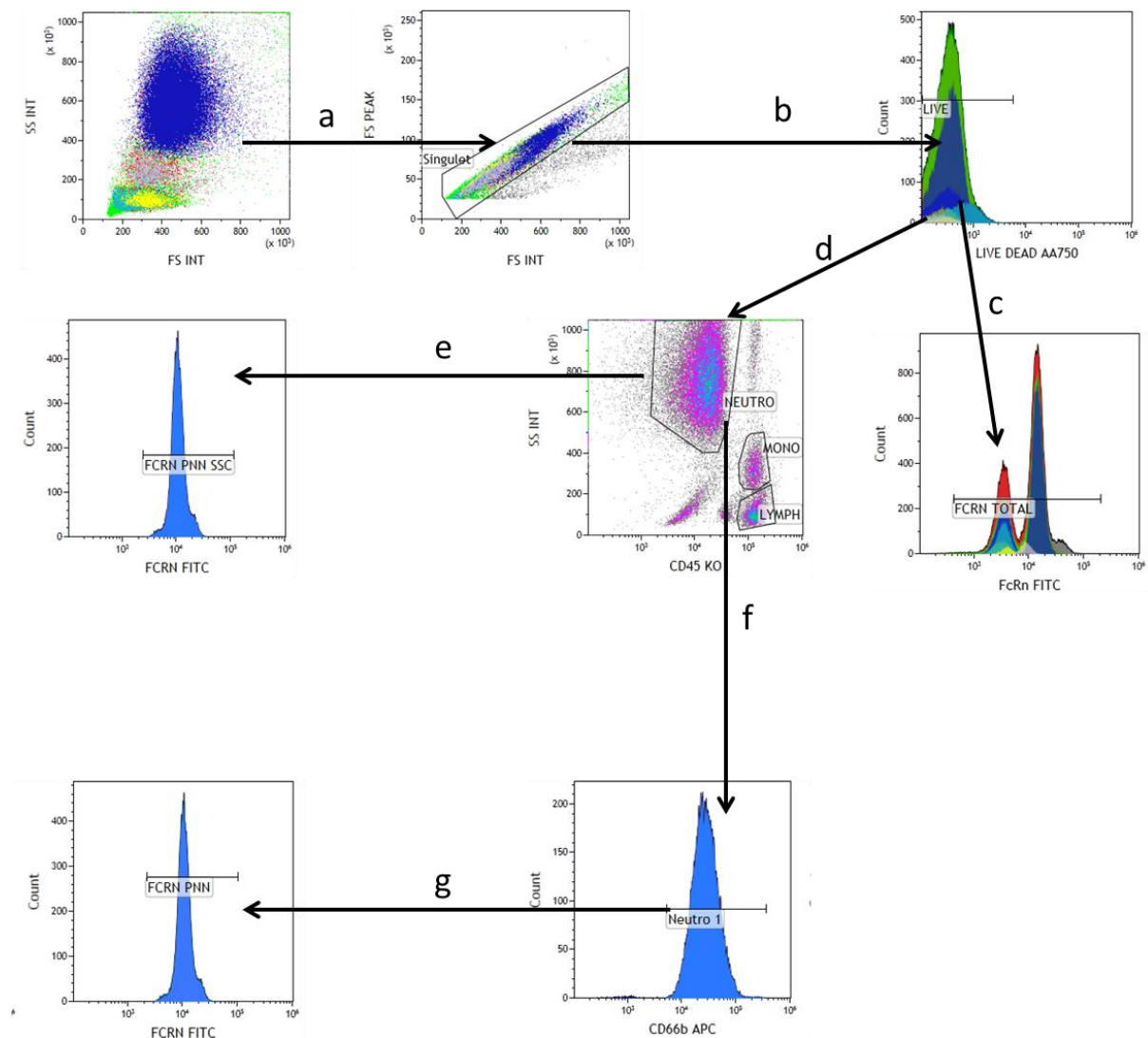


Figure 6 : Stratégie de fenêtrage pour l'isolement des PNN

a : Fenêtrage des singulets à partir de la fenêtre FSC/SSC. Cette fenêtre permet d'éliminer les doublets. b : Fenêtrage des cellules vivantes (*LIVE*) à partir de la fenêtre des singulets. c : Fenêtrage des cellules exprimant FcRn à partir de la fenêtre des cellules vivantes (FCRN TOTAL). On obtient ainsi l'expression du FcRn dans les leucocytes totaux. d : Fenêtrage des PNN (NEUTRO), monocytes (MONO) et lymphocytes (LYMPH) en fonction des paramètres de structure des cellules et de l'intensité d'expression du CD45, à partir de la fenêtre des cellules vivantes. e : Fenêtrage des PNN exprimant FcRn (FCRN PNN SSC) à partir de la fenêtre NEUTRO (=CD45^{dim} et SSC^{high}). f : Fenêtrage des événements CD66⁺ (Neutro 1) à partir de la fenêtre NEUTRO. g : Fenêtrage des PNN exprimant FcRn (FCRN PNN) à partir de la fenêtre Neutro 1. Image issue du logiciel Kaluza.

En ce qui concerne les lymphocytes, l'isolement des sous-types lymphocytaires et la détermination de leurs expressions en FcRn sont présentés en figure 7. Chaque sous-type lymphocytaire est identifié par son CD spécifique puis les cellules exprimant le FcRn sont identifiées au sein de chaque sous-type (Ly B, Ly T, Ly NK).

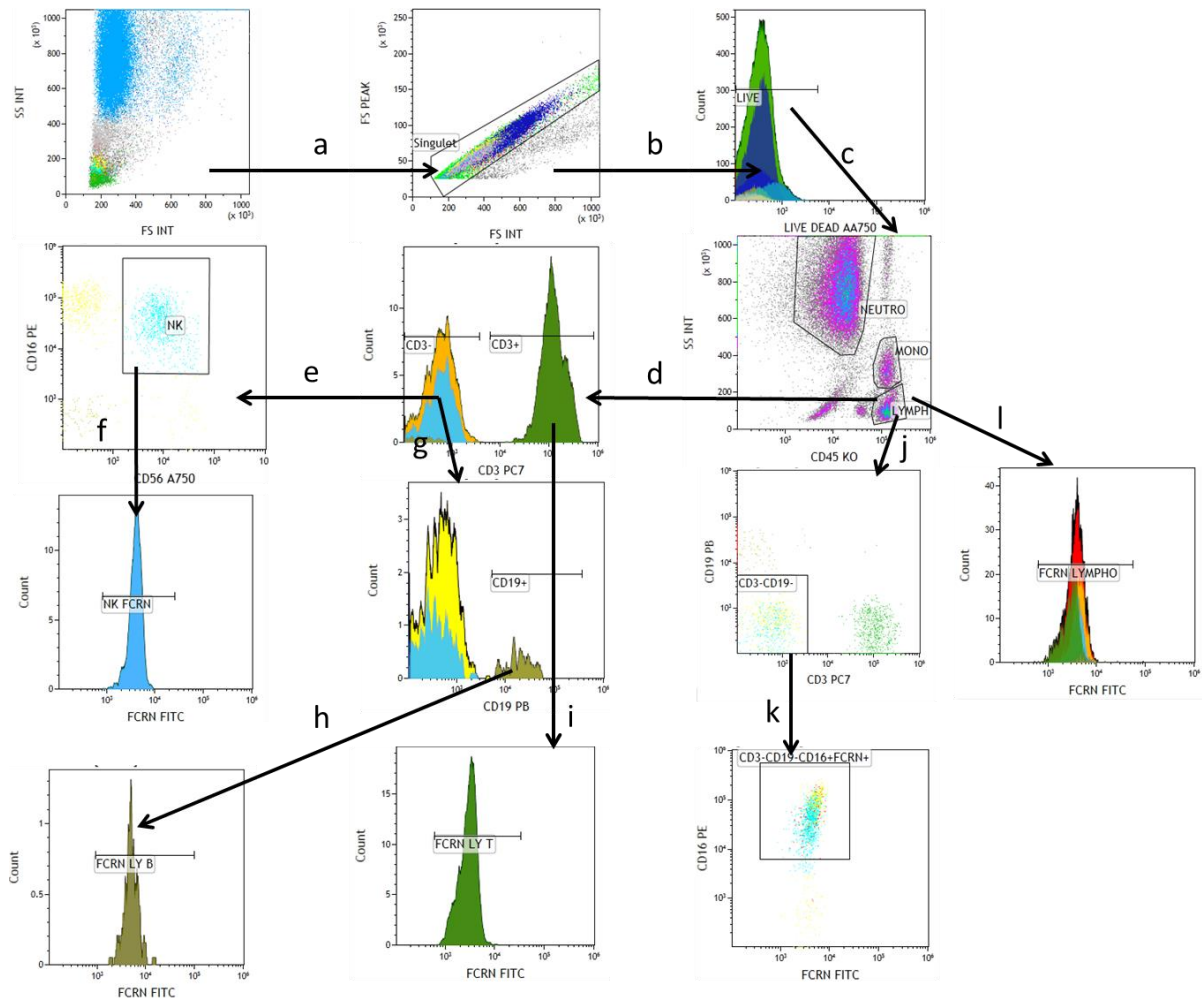


Figure 7 : Stratégie de fenêtrage pour l'isolement des sous-types lymphocytaires

a : Fenêtrage des singulets à partir de la fenêtrage FSC/SSC. Cette fenêtrage permet d'éliminer les doubles. b : Fenêtrage des cellules vivantes (*LIVE*) à partir de la fenêtrage des singulets. c : Fenêtrage des PNN (NEUTRO), monocytes (MONO) et lymphocytes (LYMPH) en fonction des paramètres de structure des cellules et de l'intensité d'expression du CD45, à partir de la fenêtrage *LIVE*. d : Fenêtrage des lymphocytes CD3⁻ ou CD3⁺ à partir de la fenêtrage LYMPH. e : Fenêtrage des lymphocytes NK, cellules CD16⁺ et CD56⁺ à partir de la fenêtrage des lymphocytes CD3⁻. f : Fenêtrage des lymphocytes NK exprimant le FcRn (=NK FCRN) à partir de la fenêtrage NK. g : Fenêtrage des lymphocytes CD19⁺ à partir de la fenêtrage CD3⁻. h : Fenêtrage des lymphocytes B FcRn⁺ (=FCRN LY B) à partir de la fenêtrage CD19⁺. i : Fenêtrage des lymphocytes T FcRn⁺ (=FCRN LY T) à partir de la fenêtrage CD3⁺. j : Fenêtrage des lymphocytes CD3⁻ et CD19⁻ à partir de la fenêtrage LYMPH. k : Fenêtrage des lymphocytes CD16⁺FcRn⁺, à partir de la fenêtrage CD3⁻CD19⁻. l : Fenêtrage des Lymphocytes FcRn⁺ (FCRN LYMPHO) à partir de la fenêtrage LYMPH. Image issue de Kaluza.

Pour les Ly NK, deux stratégies de fenêtrage sont utilisées (figure 7). Dans une première stratégie, les événements CD56⁺/CD16⁺ (CD spécifiques des NK) sont identifiés à partir des événements n'exprimant pas le CD3. L'expression de FcRn est analysée à partir des événements CD56⁺CD16⁺. La seconde stratégie consiste à

identifier les NK sans CD56 pour diminuer le coût de l'expérience. Les cellules NK exprimant le FcRn, représentent les événements $CD3^+CD19^-CD16^+FcRn^+$.

Pour les monocytes, l'isolement des sous-types monocytaires et la détermination de leurs expressions en FcRn sont présentés en figure 8. Chaque sous-type monocytaire est identifié en fonction de l'expression du CD16 et du CD14. Les monocytes conventionnels (Mo1) sont identifiés comme étant les événements $CD14^{high}/CD16^-$, les événements $CD14^{low}/CD16^+$ sont identifiés comme étant les monocytes non conventionnels (Mo3), les monocytes intermédiaires (Mo2) sont les événements $CD14^{bright}/CD16^{bright}$. Les cellules exprimant le FcRn au sein de chaque sous-type monocytaire sont alors évaluées.

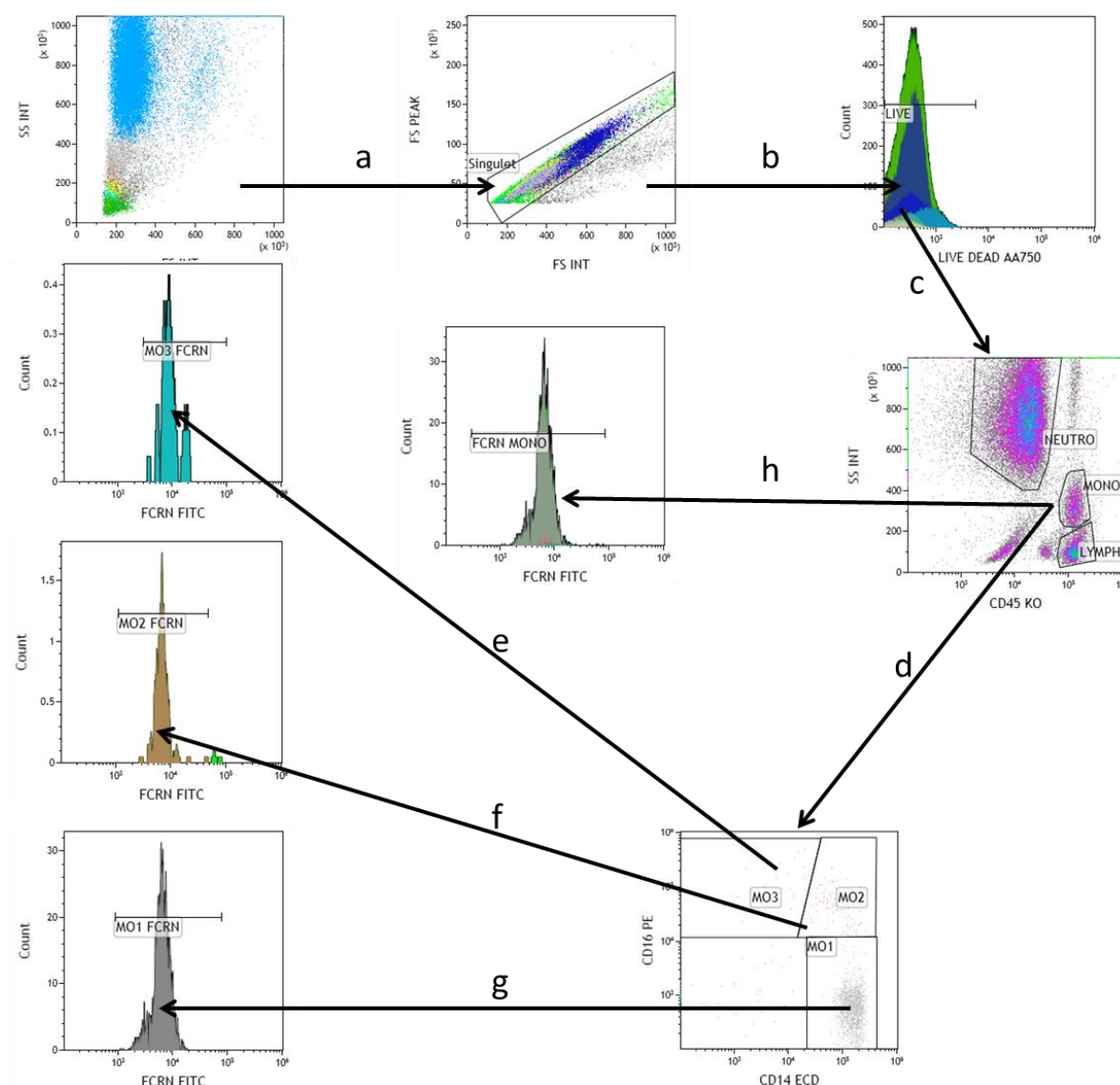


Figure 8 : Stratégie de fenêtrage pour l'isolement des sous-types monocytaires

a : Fenêtrage des singulets à partir de la fenêtre FSC/SSC. Cette fenêtre permet d'éliminer les doublets. b : Fenêtrage des cellules vivantes (*LIVE*) à partir de la fenêtre des singulets. c : Fenêtrage des PNN (NEUTRO), monocytes (MONO) et lymphocytes (LYMPH) en fonction des paramètres de structure des cellules et de l'intensité d'expression du CD45, à partir de la fenêtre des cellules vivantes. d : Fenêtrage des monocytes conventionnels (MO1), non conventionnels (MO2) et intermédiaires (MO3) par leur intensité d'expression du CD16 et du CD14 à partir de la fenêtre MONO. e : Fenêtrage des MO1 FcRn⁺ à partir de la fenêtre MO1. f : Fenêtrage des MO2 FcRn⁺ à partir de la fenêtre MO2. g : Fenêtrage des MO3 FcRn⁺ à partir de la fenêtre MO3. h : Fenêtrage des monocytes FcRn⁺ (FCRN MONO) isolés à partir de la fenêtre MONO. Image issue de Kaluza.

Les moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) de l'isotype et de l'anti-FcRn pour chaque sous-population leucocytaire sont obtenues par la stratégie de fenêtrage présentée ci-dessus. L'expression du FcRn est calculée par le ratio d'expression du FcRn correspondant au ratio entre la MFI de l'anticorps anti-FcRn humain et la MFI de l'isotype de cet anticorps. L'expression du FcRn est ainsi standardisée en s'affranchissant de la fixation aspécifique de l'anticorps anti-FcRn.

Pour une meilleure sensibilité et spécificité de la stratégie de fenêtrage des sous-populations leucocytaires, nous avons utilisé les isotypes des Ac du marquage extracellulaire (CD16, CD14, CD3, CD19, CD56, CD66). Une fois, le masque d'analyse créé et optimisé sur le logiciel KaluzaTM, les isotypes pour le marquage extracellulaire des sous-populations leucocytaires n'ont plus été utilisés.

B. Optimisation du protocole expérimental

Le protocole expérimental a nécessité des optimisations lors de son utilisation au sein du laboratoire hospitalier, en comparaison de celui utilisé précédemment au sein de l'équipe FRAME.

Pour une utilisation optimale de ses Ac, le fournisseur préconise un volume d'Ac à utiliser pour chaque manipulation. Ce sont des volumes importants qui impliquent une consommation rapide et coûteuse des Ac. Pour limiter cette consommation, nous avons réalisé en parallèle deux expériences : l'une utilisant les volumes préconisés par le fournisseur et l'autre en diminuant le volume de tous les Ac de moitié.

Après comparaison de l'expression du FcRn des sous-populations leucocytaires de 2 donneurs sains, selon la quantité d'anticorps ciblant les différentes populations cellulaires, nous obtenons les résultats présentés en figure 9.

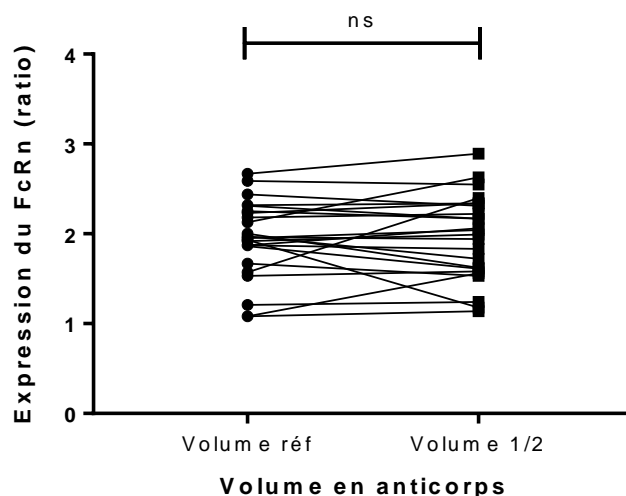


Figure 9 : Comparaison des ratios d'expression du FcRn selon le volume d'anticorps utilisé pour le marquage extracellulaire

Les leucocytes sont issus du sang de 2 donneurs sains grâce à la convention établie avec de l'EFS. Chaque donneur est testé dans les deux conditions. Le ratio d'expression du FcRn a été mesuré sur 12 sous-populations leucocytaires chez chaque patient. Il est comparé selon le volume d'anticorps utilisés pour le marquage. Volume réf : volume recommandé par le fournisseur. Volume 1/2 : volume égal à la moitié du volume recommandé par le fournisseur. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. ns : non significatif. Test non paramétrique de Wilcoxon sur une série d'échantillons appariés en bilatéral.

Aucune différence significative n'a été observée entre les ratios d'expression du FcRn des leucocytes selon le volume utilisé (figure 9). Pour la suite de l'étude, les volumes en Ac utilisés pour le marquage extracellulaire seront les volumes les plus faibles (volume 1/2).

La Versalyse étant coûteuse, la nécessité d'utiliser un volume de 2mL par tube a été remise en question. Deux marquages parallèles ont donc été réalisés avec différents volumes de Versalyse (1mL ou 2mL). L'intérêt est d'observer si la lyse est suffisante avec un volume plus faible. Nous avons réalisé le même protocole expérimental chez 4 patients, en faisant varier uniquement le volume de lyse utilisé entre les deux marquages.

Après comparaison de l'expression du FcRn de chaque sous population leucocytaire selon la quantité de lyse utilisée, nous obtenons les résultats présentés en figure 10.

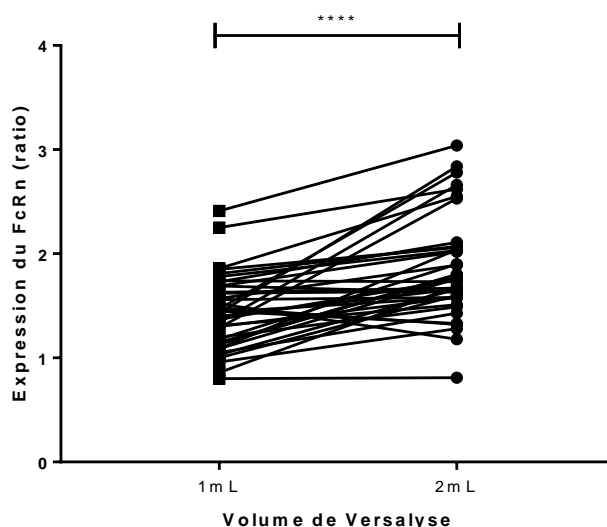


Figure 10 : Comparaison des ratios d'expression du FcRn selon le volume de lyse utilisé pour la lyse érythrocytaire

Les leucocytes sont issus du sang de 4 donneurs sains grâce à la convention établie avec de l'EFS. Chaque donneur est testé avec les deux conditions. Le ratio d'expression du FcRn a été mesuré sur 12 sous-populations leucocytaires chez chaque patient, il est comparé selon le volume de Versalyse utilisé. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. **** = $p < 0.0001$: différence significative. Test non paramétrique de Wilcoxon sur une série d'échantillons appariés en bilatéral.

Une différence très significative d'expression du FcRn est observée selon le volume de Versalyse en figure 10. L'expression du FcRn est beaucoup plus faible avec 1mL de Versalyse comparé à 2mL. Le volume de lyse ne sera donc pas modifié au cours de la suite des expérimentations.

C.Optimisation du fenêtrage des sous-populations cellulaires

Dans un second temps, afin de diminuer les coûts, les stratégies de fenêtrage sont comparées et présentées en figure 6 pour les PNN, en figure 7 pour les NK et figure 8 pour les monocytes.

Pour les PNN (figure 6), la stratégie consistait à identifier les PNN exprimant le FcRn, soit à partir de la fenêtre CD45/SSC, soit par l'ajout d'une étape d'identification précise des PNN par le CD66, spécifique des PNN. La comparaison des stratégies est présentée en figure 11.

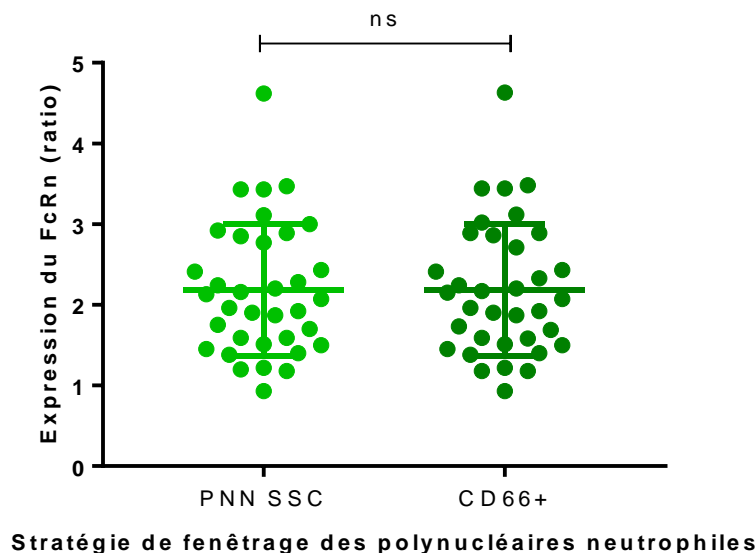


Figure 11 : Comparaison du ratio d'expression du FcRn des PNN selon la stratégie de fenêtrage

Les PNN sont issus du sang de 6 patients au cours du suivi de la transplantation. Représentation en *scatterplot* avec la moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. Le ratio de MFI obtenu à partir d'un fenêtrage structure des PNN/CD45 (SSC/CD45) est comparé à celui obtenu à partir du fenêtrage avec le CD66. ns : non significatif. Test non paramétrique de Wilcoxon sur une série d'échantillons appariés en bilatéral. CD66+ : PNN isolés grâce au CD66+. PNN SSC : PNN isolés par leur SSC sur la fenêtre CD45/SSC.

Nous avons comparé les ratios d'expression du FcRn selon les deux stratégies, aucune différence significative n'est apparue entre les deux stratégies de fenêtrage.

Pour les lymphocytes NK, (figure 7), la stratégie consistait à identifier les NK exprimant le FcRn, soit à partir de la fenêtre CD16⁺FcRn⁺ basée sur la fenêtre CD3⁺CD19⁻, soit par l'ajout d'une étape d'identification précise par une combinaison de CD spécifique des NK (CD56 et CD16). La comparaison des stratégies est présentée en figure 12.

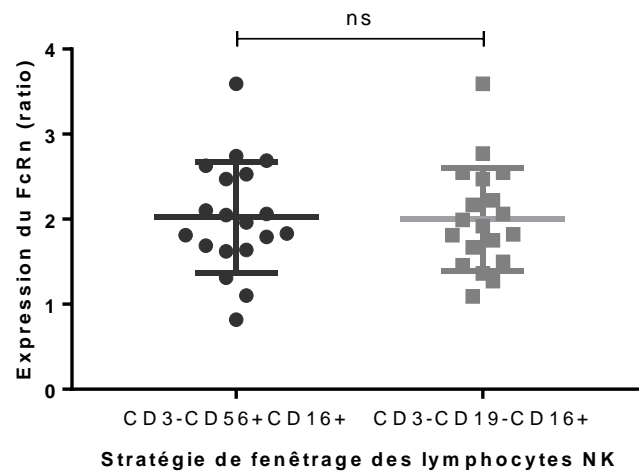


Figure 12 : Comparaison du ratio d'expression du FcRn des lymphocytes NK selon la stratégie de fenêtrage

Les Ly NK sont issus du sang de 4 patients de la cohorte prospective de patients transplantés rénaux au cours du suivi de la transplantation et de 7 donneurs sains. Représentation en *scatterplot* avec la moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. Le ratio de MFI obtenu à partir d'un fenêtrage CD3⁻CD19⁻CD16⁺ sur la fenêtre structure des lymphos/CD45 est comparé à celui obtenu à partir du fenêtrage avec le CD56 et CD16 sur les CD3⁻. ns : non significatif. Test non paramétrique de Wilcoxon sur une série d'échantillons appariés en bilatéral. CD3-CD56+CD16+ : NK isolés grâce aux Ac anti-CD56 et anti CD16 parmi les CD3⁻. CD3-CD19-CD16+ : NK isolés grâce au Ac anti-CD16 parmi les CD19⁻ et CD3⁻.

Nous avons comparé les ratios d'expression du FcRn selon les deux stratégies, aucune différence significative n'est apparue entre les deux stratégies de fenêtrages.

Pour les monocytes, la stratégie consistait à identifier les monocytes exprimant le FcRn, soit à partir de la fenêtre monocytes identifiés à partir du SSC/CD45, soit par l'ajout d'une étape d'identification précise par le CD 14, spécifique des monocytes. La comparaison des stratégies est présentée en figure 13.

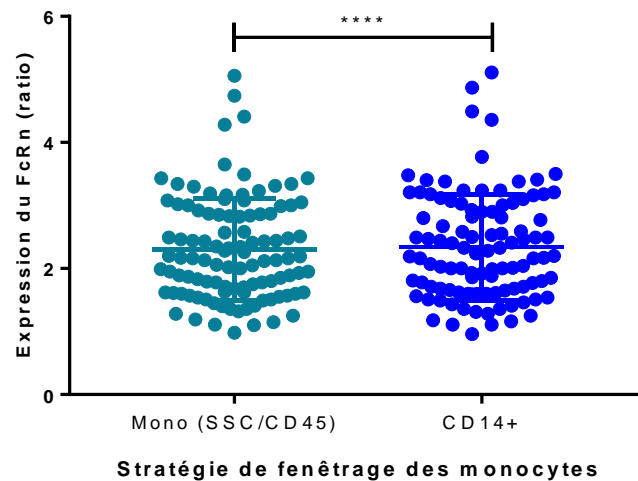


Figure 13 : Comparaison du ratio d'expression du FcRn des monocytes selon la stratégie de fenêtrage

Les monocytes sont issus du sang de 10 patients de la cohorte prospective de patients transplantés rénaux, au cours du suivi de la transplantation, ainsi que de 19 donneurs sains. Le ratio des MFI obtenu à partir d'un fenêtrage de la structure des monocytes/CD45 (SSC/CD45) est comparé à celui obtenu à partir du fenêtrage avec le CD14. Représentation en *scatterplot* avec la moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. **** = $p < 0.0005$: très significatif. Test non paramétrique de Wilcoxon sur une série d'échantillons appariés en bilatéral.

Nous avons comparé les ratios d'expression du FcRn selon les deux stratégies. Une différence significative est apparue entre les deux stratégies de fenêtrage (figure 13) due à l'absence de monocytes $CD16^{high}CD14^{low}$ (monocytes non conventionnels) dans le fenêtrage par le $CD14^{+}$.

Finalement, dans la suite de l'étude, les PNN seront identifiés à partir de la fenêtre CD45/SSC uniquement, les Ly NK seront identifiés à partir de la fenêtre $CD3^{-}CD19^{-}CD16^{+}$. Les monocytes seront identifiés à partir du fenêtrage avec le CD14.

2 Définition des valeurs normales de l'expression du FcRn

La définition de valeurs normales a été réalisée à partir du sang de 19 témoins selon le protocole décrit précédemment. Nous avons obtenu des valeurs moyennes d'expression du FcRn de chacune des sous-populations de leucocytes (PNN, Ly T,

Ly B, NK, Mo1, Mo 2, Mo3). La moyenne et les écarts-types obtenus de chaque population leucocytaire sont présentés figure 14, 15, 16.

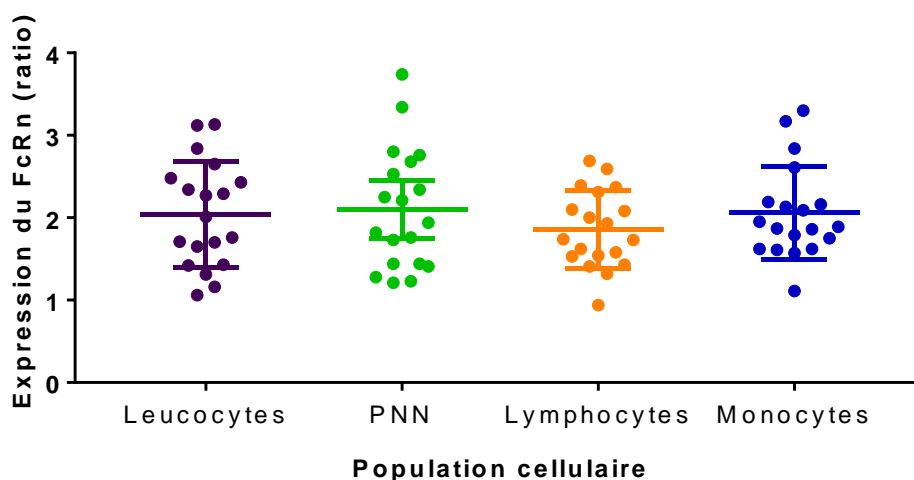


Figure 14: Ratio d'expression du FcRn au sein des sous-populations leucocytaires (leucocytes, PNN, lymphocytes, monocytes)

Les leucocytes sont issus du sang de 19 donneurs sains. Le ratio d'expression du FcRn a été mesuré sur l'ensemble des leucocytes et sur les PNN, monocytes et lymphocytes. Représentation en *scatterplot* avec la moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence.

Nous avons comparé les ratios d'expression du FcRn entre les différentes populations. Aucune différence significative d'expression du FcRn n'est apparue entre les populations (figure 14).

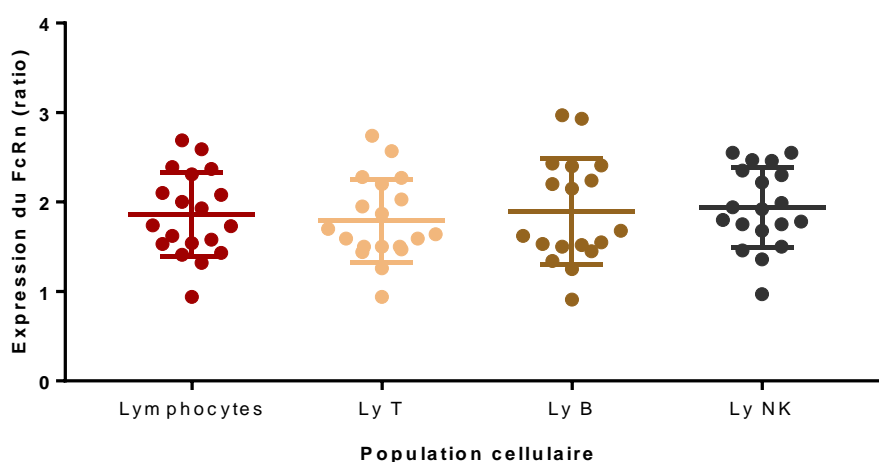


Figure 15 : Ratio d'expression du FcRn au sein des sous-populations lymphocytaires (Ly T, Ly B, Ly NK)

Les leucocytes sont issus du sang de 19 donneurs sains. Le ratio d'expression du FcRn a été mesuré sur l'ensemble des lymphocytes et sur les Ly T, Ly B, Ly NK. Représentation en *scatterplot* avec la

moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence.

Nous avons comparé les ratios d'expression du FcRn entre les différentes populations lymphocytaires. Aucune différence significative d'expression du FcRn n'est apparue entre les populations (figure 15).

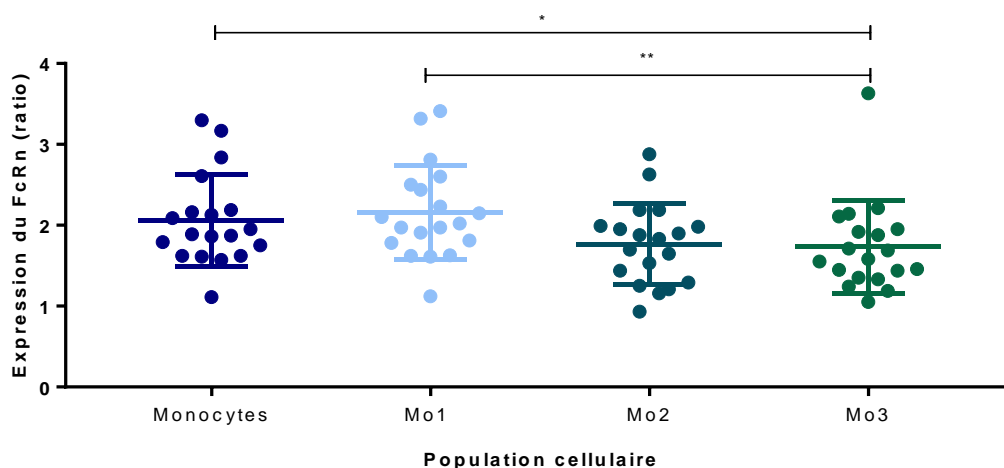


Figure 16 : Ratio d'expression du FcRn au sein des sous-populations monocytaires Mo1, Mo2 et Mo3

Les leucocytes sont issus du sang de 19 donneurs sains. Le ratio d'expression du FcRn a été mesuré sur l'ensemble des monocytes et sur les monocytes Mo1, Mo2 et Mo3. Représentation en *scatterplot* avec la moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.005$: différence significative. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral.

Nous avons comparé les ratios d'expression du FcRn entre les différentes populations monocytaires. Une différence significative d'expression du FcRn est observée entre les monocytes totaux et les Mo3, ainsi qu'entre les Mo1 et Mo3 (figure 16).

La détermination des valeurs d'expression du FcRn (valeur moyenne \pm un écart-type) au sein de chaque population cellulaire chez nos 19 donneurs sains nous permet d'envisager un suivi de l'expression du FcRn chez les patients transplantés rénaux.

DEUXIEME PARTIE : MODULATION DE L'EXPRESSION DU FcRn INTRACELLULAIRE AU COURS DE LA TRANSPLANTATION RENALE

1 Expression du FcRn au cours de la transplantation rénale par cytométrie en flux

Le suivi de l'expression du FcRn a été réalisé chez 10 patients transplantés rénaux. Au moment de l'inclusion, c'est-à-dire avant la transplantation, les ratios d'expression du FcRn ont été mesurés et comparés à ceux des témoins (figure 17).

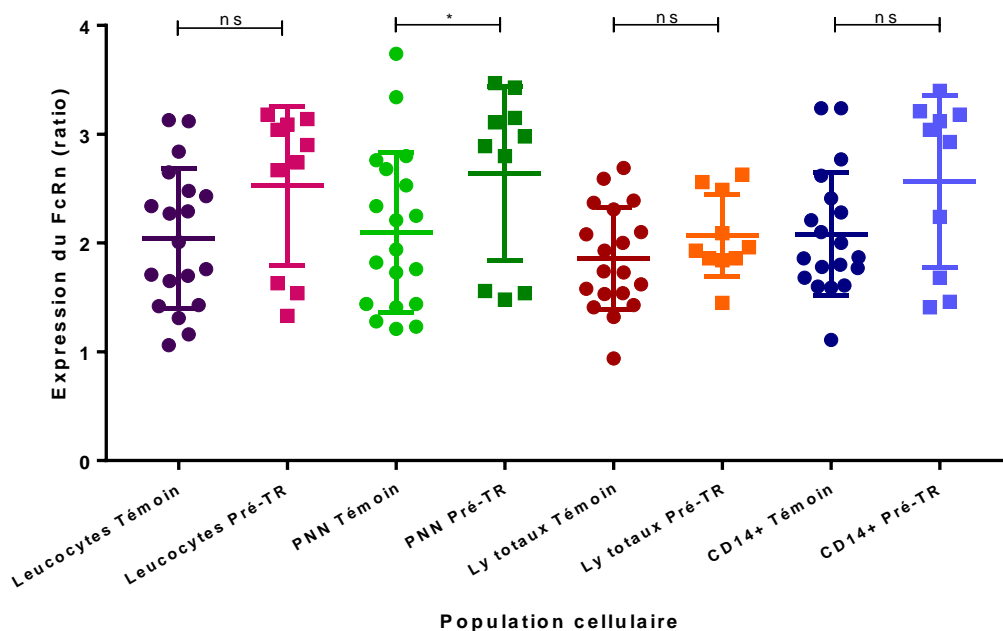


Figure 17 : Figure : Ratio d'expression du FcRn chez les témoins et les patients en pré-transplantation

Les leucocytes sont issus du sang total de 10 patients de la cohorte de patients transplantés avant la transplantation et de 19 donneurs sains. L'analyse est effectuée sur les leucocytes, les PNN, les lymphocytes (Ly), les monocytes (CD14⁺). Représentation en *scatterplot* avec la moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. * $p < 0.05$, ns : non significatif. Pré-TR : pré-transplantation rénale. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral.

Aucune différence significative n'est obtenue pour l'expression du FcRn dans les leucocytes des patients transplantés par rapport aux témoins. Cependant, nous

constatons que la population des PNN des patients présente une expression du FcRn significativement supérieure à la population de témoins (figure 17). Les Ly des patients en pré-transplantation ne présentent aucune différence avec les témoins, de même que les Ly T, B, NK.

L'analyse plus détaillée des sous-populations de monocytes présentée figure 18, révèle qu'aucune différence significative n'est observée sur les monocytes totaux et sur les populations Mo1. A l'inverse, les monocytes de type Mo2 et Mo3 de patients avant transplantation expriment plus le FcRn que les donneurs sains.

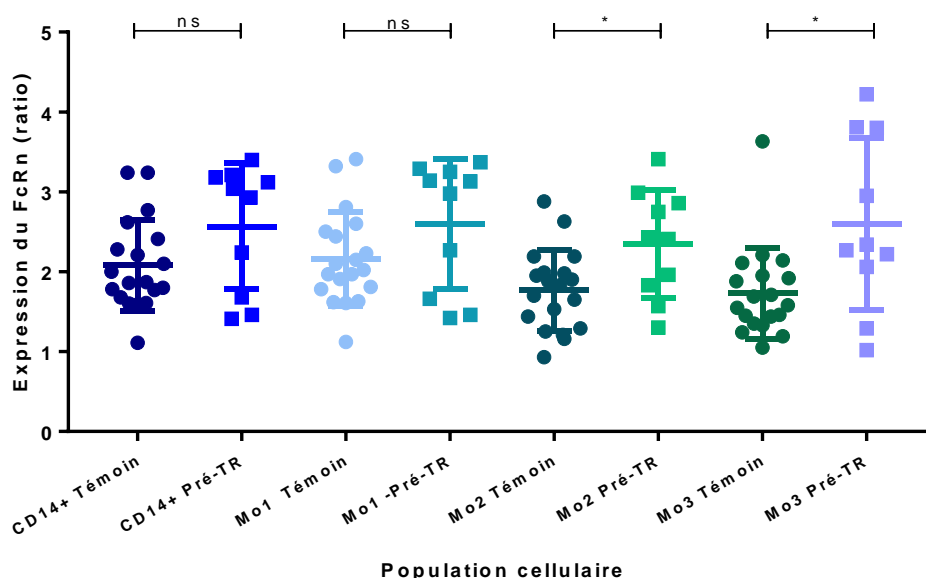


Figure 18 : Ratio d'expression du FcRn monocyttaire chez des témoins et les patients en pré-transplantation

Les leucocytes sont issus du sang total de 10 patients de la cohorte de patients transplantés rénaux avant la transplantation et de 19 donneurs sains. L'expression du FcRn est mesurée sur les monocytes totaux ainsi que sur les sous-populations Mo1, Mo2 et Mo3. Représentation en *scatterplot* avec la moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. * $p < 0.05$, ns : non significatif. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral. Mo1 : monocytes conventionnels, Mo2 : monocytes intermédiaires. Mo3 : monocytes non conventionnels. Pré-TR : pré-transplantation rénale.

Le suivi de l'expression du FcRn sur les leucocytes a été effectué de manière rapprochée au cours de l'hospitalisation suivant la transplantation ainsi que sur plusieurs prélèvements (2 à 5) lors des consultations post-transplantation (figure 19).

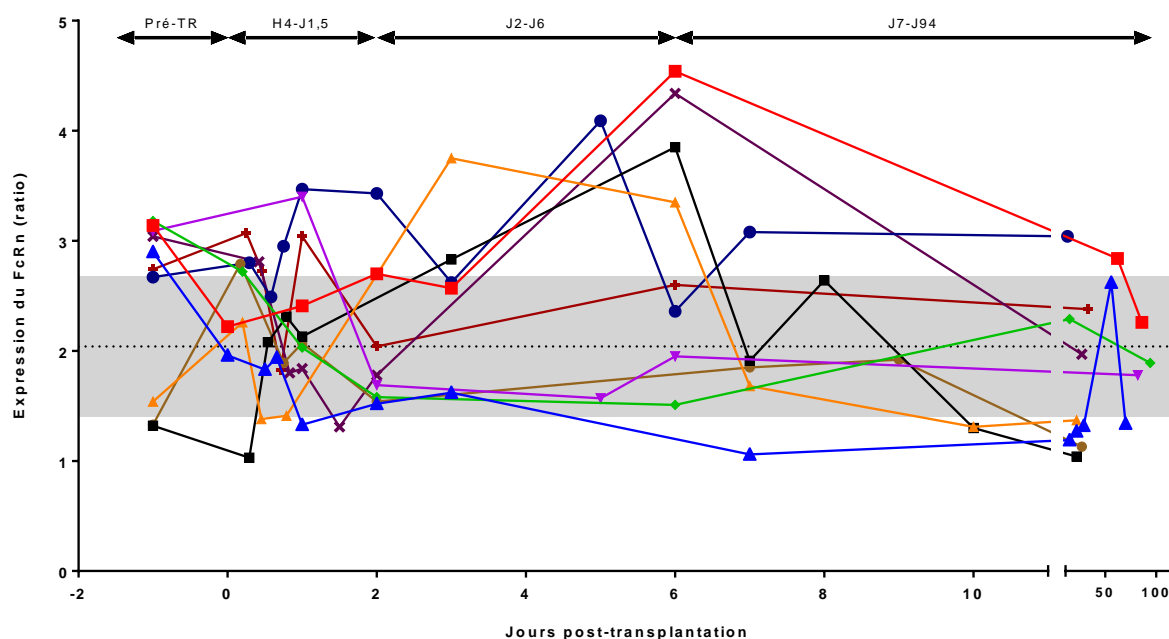


Figure 19 : Cinétique d'expression du FcRn dans les leucocytes au cours de la transplantation rénale en cytométrie en flux

Les leucocytes sont issus du sang total de 10 patients de la cohorte de patients transplantés au cours du suivi de la transplantation. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. Chaque couleur représente le suivi pour un patient. La ligne en pointillés représente la valeur normale moyenne obtenue chez des témoins sains, la zone grise représente les valeurs comprises entre ± 1 écart-type de la valeur moyenne des témoins sains. Les flèches situées au-dessus du graphique représentent les quatre périodes distinctes où sont observées les variations d'expression du FcRn. Pré-Tr : pré-transplantation.

Nous avons observé que chez certains patients, l'expression du FcRn leucocytaire augmente en post-transplantation alors que chez d'autres cette expression diminue. Cette différence est visible sur la figure 19 pour la période jour 2 à jour 6. Nous avons alors choisi de séparer les patients en 2 groupes sur la période allant du 2^{ème} (J2) au 6^{ème} jour (J6) post-transplantation. Un premier groupe est composé des patients ayant une expression du FcRn supérieure à la valeur moyenne des témoins plus un écart type soit une valeur de 2,68 sur cette période (groupe nommé ci-après profil FcRn haut). Un second groupe est composé de ceux ayant une expression moyenne du FcRn inférieure à 2,68 sur cette même période (groupe nommé ci-après profil FcRn bas).

Cette analyse de la cinétique de l'expression du FcRn a également été réalisée sur chaque sous-population leucocytaire (PNN, Ly T, Ly B, NK, Mo1, Mo2,

Mo3). Les variations observées n'étant pas différentes de celle observées lors du suivi sur les leucocytes (résultats non présentés), nous présenterons uniquement les résultats de l'expression du FcRn leucocytaire dans la suite de notre travail.

Nous avons comparé l'expression du FcRn pour les 2 groupes entre J2 et J6 post-transplantation mais aussi en pré-transplantation, en post-transplantation immédiate (période nommée H4-J1,5) et après J6 (période nommée J7-J94) (figure 20).

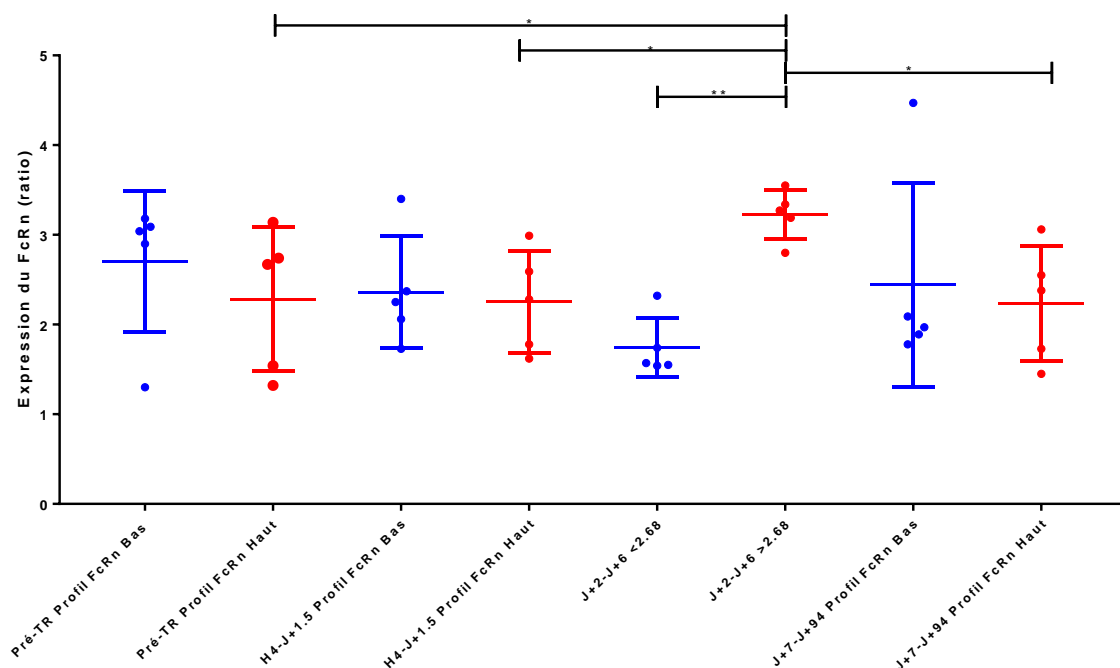


Figure 20 : Ratio d'expression du FcRn chez des patients transplantés rénaux classés selon leur appartenance au profil FcRn bas ou profil FcRn haut

Les leucocytes sont issus du sang total de 10 patients de la cohorte de patients transplantés rénaux au cours du suivi de la transplantation. Représentation en *scatterplot* avec la moyenne \pm un écart type. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. * $p < 0.05$: différence significative. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral. Pré-TR : pré-transplantation rénale. En rouge, les patients appartenant au groupe « Profil FcRn Haut » ; en bleu, les patients appartenant au groupe « profil FcRn Bas ». Les groupes sont définis à partir de la valeur moyenne d'expression au cours de la période J2-J6, « Profil FcRn Haut » : patients ayant une valeur moyenne du FcRn $> 2,68$; « Profil FcRn Bas » : patients ayant une valeur moyenne du FcRn $< 2,68$.

Au cours de la période J2-J6, l'expression du FcRn est significativement plus élevée dans le profil FcRn haut (représenté en rouge) que dans le groupe profil FcRn bas (représenté en bleu). Par contre en pré-transplantation, entre H4-J1,5 et J7-J94,

il n'y a aucune différence significative d'expression du FcRn entre les 2 groupes. En ce qui concerne les patients appartenant au profil FcRn bas (bleu), leur expression ne varie pas significativement quelle que soit la période alors que pour ceux appartenant au profil FcRn haut (rouge), l'expression du FcRn est significativement plus élevée entre J2-J6 par rapport aux trois autres périodes. Le code couleur rouge (FcRn haut de J2 à J6) et bleu (FcRn bas de J2 à J6) sera conservé tout au long de l'étude.

2 Confirmation de la modulation de l'expression du FcRn par western blot

Afin de confirmer les variations observées en cytométrie en flux sur la modulation de l'expression du FcRn au cours du suivi lors de la transplantation, une mesure de l'expression du FcRn a été effectuée par une autre méthode pour deux patients (en pré-transplantation et à deux autres temps au cours du suivi (figure 21)). Nous avons choisi de réaliser un western blot en utilisant un autre Ac anti-FcRn.

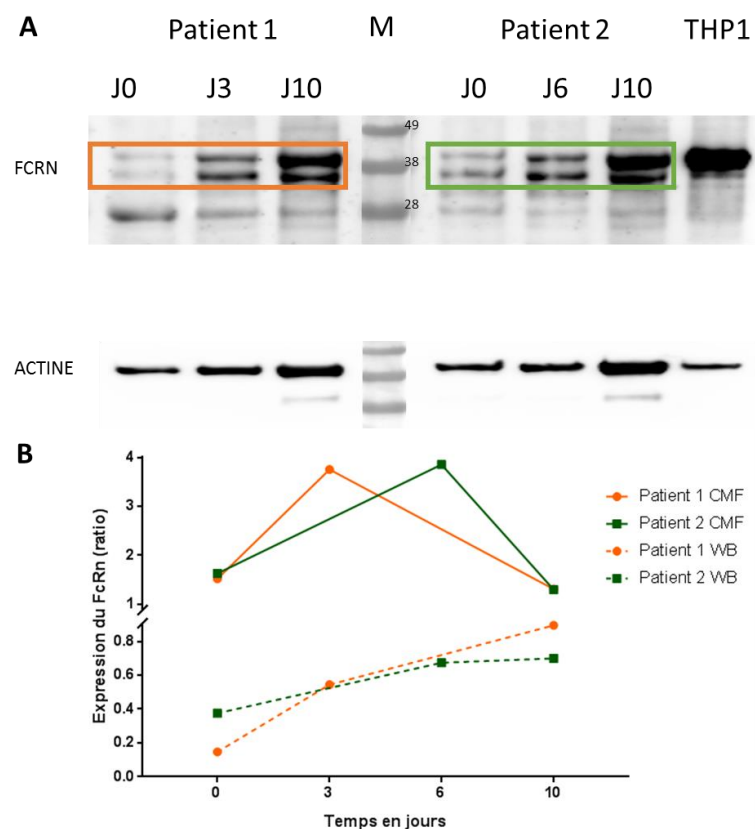


Figure 21 : Comparaison de l'expression du FcRn en cytométrie en flux *versus* western blot

A : Extraits protéiques totaux de leucocytes circulants issus de sang total de 2 patients transplantés rénaux (Patient 1 et Patient 2). L'échelle de taille en kDa est figurée au centre. THP1 est un contrôle

positif de cellules THP1 (lignée monocyttaire) exprimant FcRn. Présentation d'un western blot représentatif de 2 expériences indépendantes.

B : Cinétique de l'expression du FcRn en western Blot (WB) ou en cytométrie en flux (CMF). Les leucocytes sont issus du sang de 2 patients de la cohorte de patients transplantés rénaux avant la transplantation, à J3 ou J6 et J10 post transplantation. Les données en CMF sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. Les données en WB, normalisées par rapport à l'actine, sont exprimées en ratio d'intensité des bandes.

Pour chaque échantillon, la protéine FcRn quantifiée en cytométrie en flux est retrouvée sur le western blot. Une augmentation de la quantité du FcRn est détectée avec les 2 techniques à J3/J6 pour les 2 patients. A J10, les résultats varient dans des sens opposés. La lyse cellulaire, les différents lavages et la sensibilité du western blot peuvent expliquer ces variations.

3 Modulation de l'expression du FcRn et contexte inflammatoire

Afin d'analyser le lien entre certains paramètres biologiques et l'expression du FcRn, nous avons réalisé l'analyse en 2 temps pour chaque paramètre. Dans un premier temps, nous comparons la concentration du paramètre biologique entre les deux groupes de patients (profil FcRn haut ou bas) à chaque période (suivi global, Pré-TR, H4-J1,5, J2-J6, J7-J94) afin de déterminer si ce paramètre est différent selon le groupe de patients. Dans un second temps, nous analysons la corrélation entre le paramètre biologique et l'expression du FcRn au sein de chaque groupe (patient FcRn haut ou bas) ainsi que sur l'ensemble de la cohorte, à toutes les périodes de temps citées ci-dessus.

Une première hypothèse pour expliquer les variations observées, fût de relier cette modulation au contexte inflammatoire présent en post-transplantation.

A. La protéine C réactive

La protéine c réactive (CRP) est un marqueur biochimique utilisé pour évaluer l'état inflammatoire d'un patient. Le FcRn étant susceptible de participer à la réaction

inflammatoire par son action sur l'expression des cytokines, nous avons comparé la concentration en CRP obtenu au sein des deux profils de patients sur la totalité du suivi (J0-J94) ainsi qu'au cours des quatre périodes définies précédemment (tableau II).

	Patients avec profil FcRn bas (bleu)		Patients avec profil FcRn haut (rouge)		<i>p</i>
	<i>n</i>	<i>CRP en mg/L</i>	<i>n</i>	<i>CRP en mg/L</i>	
Suivi global (J0-J94)	20	10,79	20	6,45	0,909
Pré-Transplantation	5	1	5	2,1	0,055
H4 – J1,5	5	20,13	5	15,25	0,421
J2 – J6	5	26,9	5	14,55	0,309
J7 – J94	5	0,65	5	3,36	0,285

Tableau II : Comparaison de la concentration en CRP selon l'expression du FcRn au cours de la transplantation en fonction des cinq périodes définies préalablement

Valeur de *p* : profil FcRn bas vs. profil FcRn haut. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Aucune différence significative de concentration en CRP entre les deux groupes n'est détectable.

Nous avons ensuite étudié la corrélation entre la concentration en CRP et l'expression du FcRn leucocytaire au sein de chaque groupe (profil FcRn haut et bas) et sur l'ensemble de la cohorte (tableau III).

	Profil de l'expression du FcRn au cours de la transplantation					
	Tous les patients		Profil FcRn bas (bleu)		Profil FcRn haut (rouge)	
			<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Suivi global (J0-J94)	0,01	0,914	-0,24	0,142	0,19	0,240
Pré-Transplantation	-0,64	0,054	-0,10	0,950	- 0,30	0,683
H4 – J1,5	-0,19	0,353	-0,33	0,313	0,06	0,849
J2 – J6	-0,25	0,265	0,08	0,843	-0,29	0,354
J7 – J94	0,05	0,809	-0,40	0,179	0,31	0,387

Tableau III : Corrélation de la concentration de CRP en fonction de l'expression du FcRn

r : coefficient de corrélation de Spearman. Valeur *p* : déterminée par un test de Spearman. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Il n'existe aucune corrélation détectable entre la CRP et l'expression du FcRn quel que soit le groupe de patients étudié et/ou le moment du suivi. La modulation de l'expression du FcRn, dans notre étude chez les patients transplantés, n'est pas corrélée à la concentration en CRP.

Pour étayer ce résultat, une mesure de l'expression du FcRn dans un contexte pathologique inflammatoire non infectieux comme la goutte, a été réalisée.

Dans le cas d'une crise de goutte, le patient présente une CRP élevée (environ 200 mg/L) pour une norme inférieure à 5 mg/L. Lors de la mise en place du traitement de la crise par colchicine, une diminution rapide de la CRP est observée. La mesure du FcRn a été effectuée avant la mise sous traitement, lorsque l'équipe médicale a conclu à une crise de goutte chez ces patients. Puis l'expression du FcRn a été mesurée une seconde fois au cours de l'hospitalisation, lorsque la CRP était proche de la normale. Aucune différence n'est observée entre les prélèvements avant et après mise sous traitement (résultats non présentés) confirmant l'hypothèse que la modulation du FcRn ne serait pas liée à l'inflammation.

B. Les cytokines plasmatiques

Pour évaluer l'implication des cytokines dans la modulation de l'expression du FcRn, nous avons mesuré les concentrations de différentes cytokines présentes dans le plasma de 4 patients transplantés au cours du suivi post-transplantation. Nous avons dosé un panel de cytokines pro- (l'IL-6, le TNF- α et l'INF- γ) et anti-inflammatoires (l'IL-10). Nous comparons la concentration en cytokines au sein de chaque profil dans le tableau IV.

	Patients avec profil FcRn bas (bleu)		Patients avec profil FcRn haut (rouge)		<i>p</i>
	<i>n</i>	<i>Concentration en pg/mL</i>	<i>n</i>	<i>Concentration en pg/mL</i>	
IL-6	6	6,975	6	13,07	0,368
IL-10	6	4,625	7	3,700	0,221
TNF- α	6	6,37	7	2,74	0,0006
INF- γ	6	8,945	7	5,72	0,0076

Tableau IV : Comparaison de la concentration en cytokines dans les deux groupes de patients définis sur l'expression du FcRn

Valeur de *p* : profil FcRn bas vs. profil FcRn haut. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Les résultats du tableau IV indiquent que le groupe de patients ayant une expression du FcRn basse présente une concentration en TNF- α et en INF- γ significativement plus élevée par rapport à l'autre groupe. Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes pour l'IL-6 et l'IL-10.

4 Modulation de l'expression du FcRn et marqueurs biochimiques de la fonction rénale

A. La créatinine

La créatinine est un marqueur biochimique utilisé pour évaluer la fonction rénale d'un patient et plus particulièrement sa capacité de filtration.

Nous avons utilisé la même stratégie d'analyse que précédemment. Tout d'abord, nous avons comparé la concentration en créatinine entre les deux groupes de patients de la pré-transplantation à J94 ainsi qu'au cours des quatre périodes définies précédemment (tableau V).

	Patients avec profil FcRn bas (bleu)		Patients avec profil FcRn haut (rouge)		<i>p</i>
	<i>n</i>	<i>Créatininémie en µmol/L</i>	<i>n</i>	<i>Créatininémie en µmol/L</i>	
Suivi global (J0-J94)	20	205	20	398	0,018
Pré-Transplantation	5	396	5	413	0,341
H4 – J1,5	5	226,3	5	474,6	0,095
J2 – J6	5	119	5	370,5	0,421
J7 – J94	5	99	5	192	0,309

Tableau V : Comparaison de la concentration en créatinine selon l'expression du FcRn au cours de la transplantation en fonction des cinq périodes définies préalablement

Valeur de *p* : profil FcRn bas vs. profil FcRn haut. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Les patients ayant un profil haut ont une concentration en créatinine significativement plus élevée au cours du suivi, comparé à l'autre groupe. Par contre, les concentrations en créatinine ne sont pas significativement différentes entre les 2 groupes, au sein des 4 périodes (pré-transplantation, H4-J1,5 , J2-J-6, J7-J94).

Ensuite, nous avons analysé la corrélation entre la concentration en créatinine et l'expression du FcRn leucocytaire dans chaque groupe de patients (profil FcRn haut et bas) et sur l'ensemble de la cohorte (tableau VI).

	Profil de l'expression du FcRn au cours de la transplantation					
	Tous les patients		Profil FcRn bas (bleu)		Profil FcRn haut (rouge)	
			<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Suivi global (J0-J94)	0,112	0,299	-0,168	0,259	0,096	0,551
Pré-Transplantation	-0,109	0,766	0,200	0,783	-0,600	0,350
H4 – J1,5	0,101	0,596	0,275	0,363	-0,294	0,251
J2 – J6	0,193	0,378	0,091	0,811	-0,093	0,765
J7 – J94	-0,130	0,536	-0,575	0,042	0,081	0,805

Tableau VI : Corrélation de la concentration en créatinine en fonction de l'expression du FcRn

r : coefficient de corrélation de Spearman. Valeur *p* : déterminée par un test de Spearman. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Sur l'ensemble de la cohorte, aucune corrélation n'apparaît entre la concentration en créatinine et l'expression du FcRn quelle que soit la période

analysée. Dans le groupe de patients ayant un profil d'expression du FcRn haut, aucune corrélation n'est observée quelle que soit la période du suivi. Dans le groupe de patients ayant un profil d'expression du FcRn bas, aucune corrélation n'est observée sur l'ensemble du suivi, en pré-transplantation, à H4-J-1,5 et J2-J6. Dans ce groupe, pour la période J7-J94, la concentration en créatinine est inversement corrélée à l'expression du FcRn.

Les valeurs de créatinine de J7-J94 ont ensuite été analysées par régression linéaire en fonction de l'expression du FcRn (figure 22).

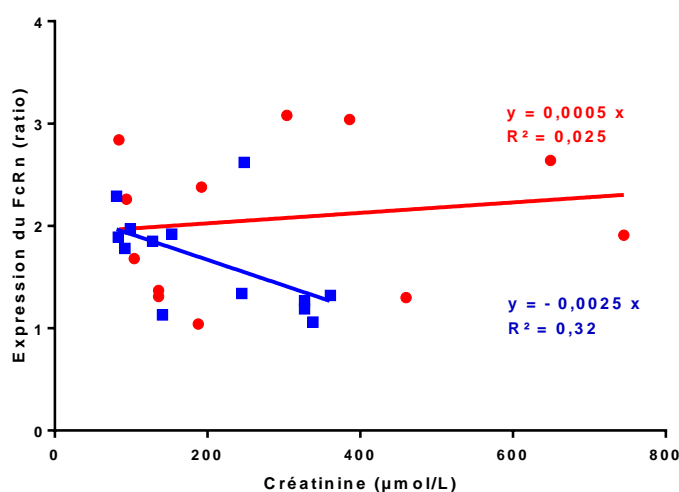


Figure 22 : Concentration en créatinine de J7 à J94 en fonction de l'expression de FcRn selon le groupe de patients

Les leucocytes sont issus du sang de 10 patients transplantés rénaux au cours du suivi de la transplantation de J7 à J94. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. Chaque couleur représente un profil de patients (bleu : patients ayant un profil bas d'expression du FcRn ; rouge : patients ayant un profil haut d'expression de FcRn). Les deux droites représentent les droites de régression pour chaque profil de patient.

L'analyse présentée dans la figure 22 indique que la créatinine est inversement corrélée à l'expression du FcRn chez les patients avec un profil FcRn bas après J7 post transplantation. Chez les patients appartenant au groupe « profil FcRn haut », il n'existe aucune corrélation entre la créatininémie et l'expression du FcRn.

Au total, même s'il n'existe aucune différence de concentration en créatinine entre les deux groupes entre J7-J94, dans le groupe de patients « profil FcRn bas »,

la concentration en créatinine après J7 est inversement corrélée à l'expression du FcRn.

B. Le débit de filtration glomérulaire

Le débit filtration glomérulaire (DFG) est une estimation de la filtration glomérulaire en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique du patient. Cependant au CHU de Tours, la formule est appliquée pour les populations caucasiennes quelle que soit l'origine du patient. Ce marqueur permet de s'affranchir des variations de sexe et d'âge des patients de la cohorte.

Tout d'abord, nous avons comparé le DFG entre les deux profils de patients de la pré-transplantation à J94 ainsi qu'au cours des quatre périodes définies précédemment (tableau VII).

	Patients avec profil FcRn bas (bleu)		Patients avec profil FcRn haut (rouge)		<i>p</i>
	<i>n</i>	<i>DFG (ml/min/1,73m²)</i>	<i>n</i>	<i>DFG (ml/min/1,73m²)</i>	
Suivi global (J0-J94)	20	29,75	20	14,5	0,020
Pré-Transplantation	5	12	5	10	0,230
H4 – J1,5	5	29	5	9,33	0,087
J2 – J6	5	53	5	15	0,222
J7 – J94	5	53	5	22	0,151

Tableau VII : Comparaison du DFG selon l'expression du FcRn au cours de la transplantation en fonction des cinq périodes définies préalablement

Le DFG est calculé à partir de la formule du CKD-EPI. Valeur de *p* : profil FcRn Bas vs. profil FcRn haut. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Les patients ayant un profil FcRn haut ont un DFG significativement plus bas au cours du suivi comparé aux patients de l'autre groupe, confirmant les données de la créatinine. Aucune variation n'est significativement observée dans les 4 périodes de temps définies dans le suivi. Les variations observées sont donc dues à la filtration rénale et non au sexe ou à l'âge des patients qui composent les deux groupes.

Nous avons ensuite étudié la corrélation entre le DFG et l'expression du FcRn leucocytaire dans chaque groupe (profil FcRn haut et bas) et sur l'ensemble de la cohorte (tableau VIII).

	Profil de l'expression du FcRn au cours de la transplantation					
	Tous les patients					
			Profil FcRn bas (bleu)		Profil FcRn haut (rouge)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Suivi global (J0-J94)	-0,162	0,132	-0,182	0,255	0,157	0,293
Pré-Transplantation	0,152	0,674	-0,500	0,450	0,359	0,633
H4 – J1,5	-0,149	0,429	-0,351	0,238	0,277	0,279
J2 – J6	-0,176	0,422	0,030	0,946	0,099	0,751
J7 – J94	0,087	0,679	0,639	0,021	-0,151	0,639

Tableau VIII : Corrélation du DFG en fonction de l'expression du FcRn

r : coefficient de corrélation de Spearman. Valeur *p* : déterminée par un test de Spearman. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Sur l'ensemble de la cohorte, aucune corrélation n'apparaît entre le DFG et l'expression du FcRn quel que soit le moment du suivi. Chez les patients avec un profil FcRn haut, il n'existe aucune corrélation quel que soit le moment du suivi. Au sein des patients ayant un profil FcRn bas, aucune corrélation n'est observée excepté pour la période allant de J7 à J94 où l'expression du FcRn est corrélée au DFG.

Les valeurs de DFG de J7 à J94, ont été analysées par régression linéaire en fonction de l'expression du FcRn (figure 23).

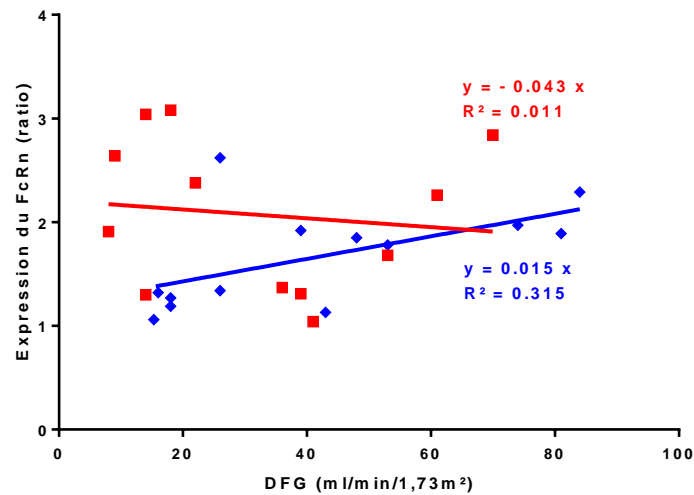


Figure 23 : DFG en fonction de l'expression du FcRn de J7 à J94 selon le groupe de patients

Les leucocytes sont issus du sang de 10 patients de la cohorte de patients transplantés rénaux au cours du suivi de la transplantation (J7-J94). Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. Chaque couleur représente un profil de patients (bleu : patients ayant un profil bas d'expression du FcRn ; rouge : patients ayant un profil haut d'expression du FcRn). Les deux droites représentent les droites de régression pour chaque profil de patient.

Les régressions linéaires confirment les résultats obtenus lors de l'analyse des corrélations entre le DFG et l'expression du FcRn chez les patients ayant un profil FcRn bas.

Au total, aucune différence de DFG n'apparaît lors de la comparaison entre les 2 groupes pour la période J7-J94. Mais le DFG du groupe de patients « profil FcRn bas » est corrélé positivement à l'expression du FcRn de J7 à J94, soulignant que plus l'expression du FcRn augmente, plus le DFG augmente.

5 Modulation de l'expression du FcRn et albumine

L'albumine étant un des deux ligands principaux du FcRn, nous nous sommes focalisés sur les variations de l'expression du récepteur avec son ligand.

Comme pour les autres marqueurs biologiques, nous avons comparé la concentration en albumine entre les deux profils de patients de la pré-transplantation à J94 ainsi qu'au cours des quatre périodes définies précédemment (tableau IX).

	Patients avec profil FcRn bas (bleu)		Patients avec profil FcRn haut (rouge)		<i>p</i>
	<i>n</i>	<i>Albumine en g/L</i>	<i>n</i>	<i>Albumine en g/L</i>	
Suivi global (J0-J94)	20	38,75	20	41,08	0,3576
Pré-Transplantation	5	43	5	44	0,786
H4 – J1,5	5	37,5	5	39	0,167
J2 – J6	5	36	5	36	0,730
J7 – J94	5	41,33	5	43,33	>0,999

Tableau IX : Comparaison de la concentration en albumine dans les deux groupes de patients définis selon l'expression du FcRn au cours du suivi de la transplantation

Valeur de *p* : profil FcRn Bas vs. profil FcRn haut. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Il n'existe aucune différence significative de concentration en albumine entre les deux groupes de patients quel que soit le moment du suivi.

Nous avons ensuite étudié la corrélation entre la concentration en albumine et l'expression du FcRn leucocytaire dans chaque groupe (profil FcRn haut et bas) et sur l'ensemble de la cohorte (tableau X).

	Profil de l'expression du FcRn au cours de la transplantation					
	Tous les patients		Profil FcRn bas (bleu)		Profil FcRn haut (rouge)	
			<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Suivi global (J0-J94)	-0,118	0,276	0,249	0,121	-0,462	0,001
Pré-Transplantation	0,198	0,583	0,633	0,267	0,051	>0,999
H4 – J1,5	-0,093	0,624	0,284	0,345	-0,561	0,021
J2 – J6	0,217	0,332	-0,008	0,992	0,207	0,494
J7 – J94	-0,049	0,813	0,389	0,189	-0,512	0,091

Tableau X : Corrélation de la concentration en albumine en fonction de l'expression du FcRn au cours du suivi

r : coefficient de corrélation de Spearman. Valeur *p* : déterminée par un test de Spearman. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Les résultats du tableau X indiquent que sur l'ensemble de la cohorte et chez les patients avec un profil FcRn bas, l'albumine n'est pas corrélée à l'expression du

FcRn quelle que soit la période du suivi. Chez les patients avec un profil haut, sur l'ensemble du suivi ainsi qu'au cours de la période H4-J1,5, la concentration en albumine est inversement corrélée à l'expression du FcRn.

Les valeurs d'albumine de H4-J1,5 ont ensuite été analysées par régression linéaire en fonction de l'expression du FcRn (figure 24)

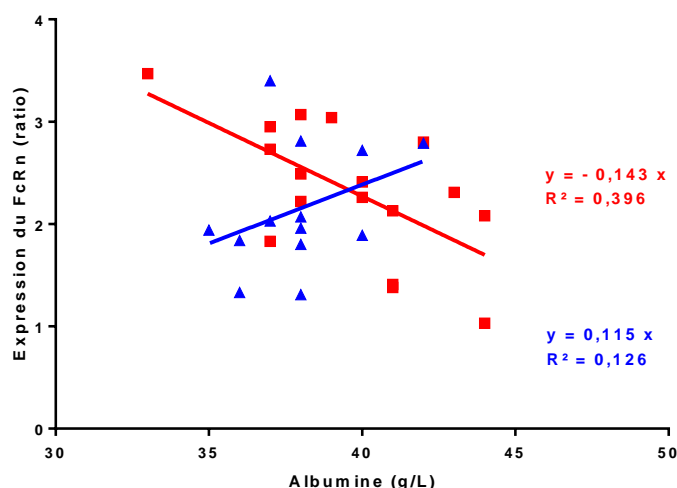


Figure 24 : Concentration en albumine en fonction de l'expression du FcRn selon le groupe de patients entre H4-J1,5

Les leucocytes sont issus du sang de 10 patients de la cohorte de patients transplantés rénaux au cours du suivi de la transplantation (H4-J1,5). Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. Chaque couleur représente un profil de patients (bleu : patients ayant un profil bas d'expression du FcRn ; rouge : patients ayant un profil haut d'expression du FcRn). Les deux droites représentent les droites de régression pour chaque profil de patient.

Les régressions linéaires confirment les résultats obtenus lors de l'analyse des corrélations entre la concentration en albumine et l'expression du FcRn. Au total, aucune différence de concentration en albumine n'apparaît lors de la comparaison entre les 2 groupes. Mais la concentration en albumine du groupe de patients « profil FcRn haut » est inversement corrélée à l'expression du FcRn au cours de la période H4 à J1,5 ainsi que sur l'ensemble du suivi.

Dans notre protocole de cytométrie, l'expression du FcRn a été analysée sur les leucocytes et sur les différentes populations cellulaires. Afin d'approfondir les données concernant l'expression du FcRn et compte tenu de l'expression élevée du FcRn au sein des PNN (figure 17), nous avons comparé les numérations de chaque

population cellulaire entre les deux groupes de patients sur l'ensemble du suivi (J0-J94) (tableau XI).

	Patients avec profil FcRn bas (bleu)		Patients avec profil FcRn haut (rouge)		<i>p</i>
	<i>n</i>	<i>Numération (G/L)</i>	<i>n</i>	<i>Numération (G/L)</i>	
PNN	5	8,79	5	9,06	0,309
Lymphocytes	5	1,06	5	1,08	0,421
Monocytes	5	0,81	5	0,66	0,309

Tableau XI : Comparaison de la numération en PNN, lymphocytes et monocytes dans les deux groupes de patients définis selon l'expression du FcRn au cours du suivi

Valeur de *p* : profil FcRn Bas vs. profil FcRn haut. Test non paramétrique de Mann-Whitney sur une série d'échantillons non appariés en bilatéral. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Les numérations moyennes de PNN, lymphocytes et monocytes ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes au cours du suivi.

Nous avons alors étudié la corrélation de l'albumine avec l'expression du FcRn de chacune des sous-populations (PNN, lymphocytes et monocytes) (tableau XII).

	Profil de l'expression du FcRn au cours de la transplantation					
	Tous les patients					
			Profil FcRn bas (bleu)		Profil FcRn haut rouge)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
PNN	-0,123	0,254	0,199	0,2180	-0,435	0,0020
Lymphocytes	0,015	0,888	0,539	0,0003	-0,512	0,0002
Ly T	0,035	0,749	0,551	0,0002	-0,509	0,0003
Ly B	-0,089	0,472	0,445	0,0175	-0,463	0,0030
Ly NK	0,014	0,898	0,523	0,0005	-0,446	0,0017
Monocytes	-0,017	0,877	0,518	0,0006	-0,487	0,0005
Mo1	-0,022	0,837	0,506	0,0009	-0,484	0,0006
Mo2	-0,008	0,942	0,530	0,0004	-0,510	0,0002
Mo3	0,023	0,833	0,562	0,0002	-0,499	0,0004

Tableau XII : Corrélation de la concentration en albumine en fonction de l'expression du FcRn au sein des sous-populations cellulaires au cours du suivi de la transplantation (pré-transplantation à J94)

r : coefficient de corrélation de Spearman. Valeur *p* : déterminée par un test de Spearman. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Les résultats présentés dans le tableau XII indiquent que la concentration en albumine n'est pas corrélée à l'expression du FcRn sur l'ensemble de la cohorte dans chaque sous-population cellulaire. Chez les patients ayant un profil bas, la concentration en albumine n'est pas corrélée à l'expression du FcRn au sein des PNN mais elle est corrélée positivement au sein des lymphocytes T, B, NK et au sein des monocytes Mo1, Mo2 et Mo3. Chez les patients ayant un profil haut, la concentration en albumine est inversement corrélée au sein des PNN, des sous-types lymphocytaires et des sous-types monocytaires.

Les valeurs de concentration en albumine ont ensuite été analysées par régression linéaire en fonction de l'expression du FcRn au sein des PNN, des lymphocytes et des monocytes (figure 25).

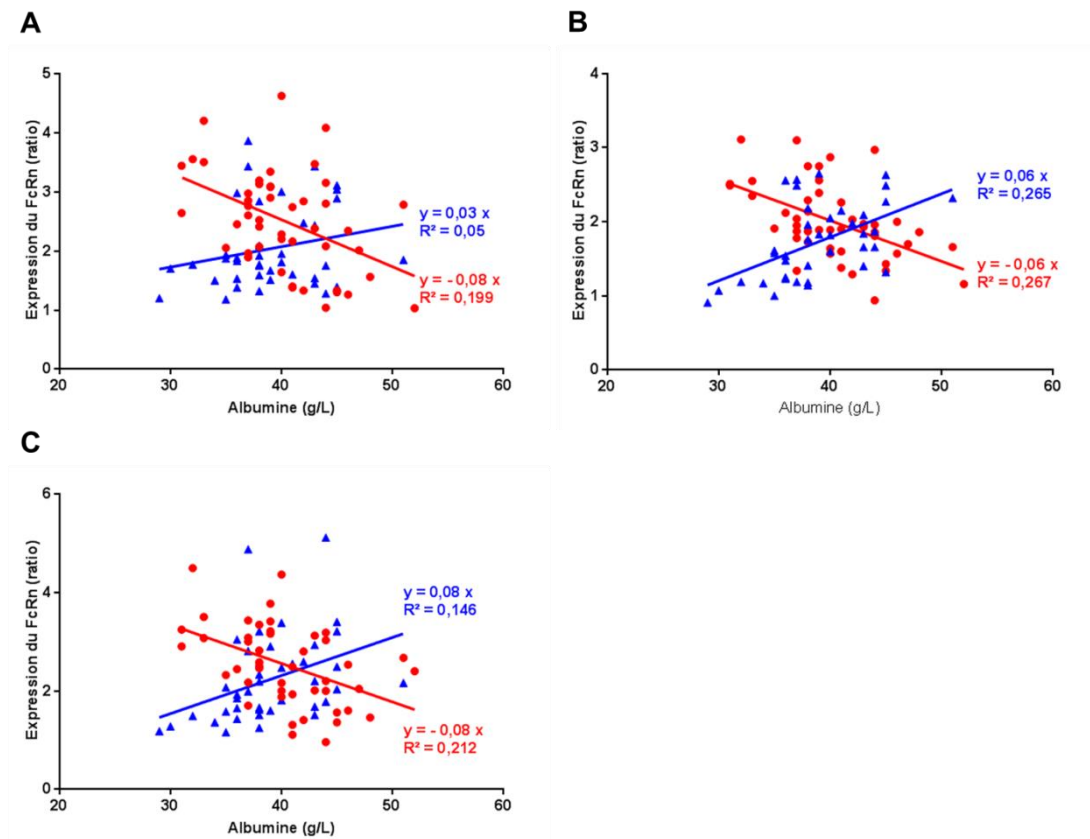


Figure 25 : Concentration en albumine en fonction de l'expression du FcRn dans les 2 groupes de patients au cours du suivi post-transplantation (pré-transplantation à J94) dans les PNN (A), les lymphocytes (B), les monocytes (C)

Les leucocytes sont issus du sang de 10 patients de la cohorte de patients transplantés rénaux au cours du suivi de la transplantation (J0-J94). Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence. Chaque couleur représente un profil de patients (bleu : patients ayant un profil bas d'expression du FcRn ; rouge : patients ayant un profil haut d'expression du FcRn). Les deux droites représentent les droites de régression pour chaque profil de patients.

Les régressions linéaires confirment les résultats obtenus lors de l'analyse des corrélations entre la concentration en albumine et l'expression du FcRn au sein des sous-populations cellulaires.

Pour affiner la relation existant entre FcRn et albumine, nous avons regardé, pour chaque sous population (PNN, Ly, Mono) la corrélation entre les deux variables au sein de nos quatre périodes de suivi (tableaux XIII, XIV, XV).

	Profil de l'expression du FcRn au cours de la transplantation					
	Tous les patients		Profil FcRn bas (bleu)		Profil FcRn haut (rouge)	
			<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Suivi global (J0-J94)	-0,123	0,254	0,199	0,2180	-0,435	0,0020
Pré-Transplantation	-0,006	0,994	0	>0,999	0,051	>0,999
H4 – J1,5	-0,101	0,596	0,253	0,403	-0,507	0,039
J2 – J6	0,218	0,329	0,033	0,937	0,190	0,530
J7 – J94	-0,019	0,927	0,447	0,127	-0,397	0,202

Tableau XIII : Corrélation de la concentration en albumine en fonction de l'expression du FcRn au sein des PNN

r : coefficient de corrélation de Spearman. Valeur *p* : déterminée par un test de Spearman. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Sur l'ensemble de la cohorte et chez les patients ayant un profil bas, la concentration en albumine n'est pas corrélée à l'expression du FcRn des PNN quel que soit le moment du suivi. Chez les patients ayant un profil haut, la concentration en albumine est inversement corrélée à l'expression du FcRn dans les PNN sur l'ensemble du suivi et de H4 à J1,5. Pour les autres temps, il n'y a pas de corrélation au sein de ce groupe.

	Profil de l'expression du FcRn au cours de la transplantation					
	Tous les patients		Profil FcRn bas (bleu)		Profil FcRn haut (rouge)	
			<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Suivi global (J0-J94)	0,015	0,888	0,539	0,0003	-0,512	0,0002
Pré-Transplantation	0,176	0,622	0,264	0,666	0,289	0,716
H4 – J1,5	-0,338	0,184	0,361	0,226	-0,338	0,184
J2 – J6	0,262	0,239	0,628	0,077	0,127	0,678
J7 – J94	-0,041	0,845	0,478	0,099	-0,618	0,035

Tableau XIV : Corrélation de la concentration en albumine en fonction de l'expression du FcRn au sein des lymphocytes

r : coefficient de corrélation de Spearman. Valeur *p* : déterminée par un test de Spearman. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Sur l'ensemble de la cohorte, la concentration en albumine n'est pas corrélée à l'expression du FcRn lymphocytaire quel que soit le moment du suivi. Chez les patients ayant un profil bas, la concentration en albumine est corrélée à l'expression du FcRn lymphocytaire uniquement sur l'ensemble du suivi. Dans les périodes définies précédemment, aucune corrélation n'est retrouvée dans ce groupe. Chez les patients ayant un profil haut, la concentration en albumine est inversement corrélée à l'expression du FcRn lymphocytaire sur l'ensemble du suivi et de J7 à J94. Pour les autres périodes, il n'y a pas de corrélation au sein de ce groupe.

	Profil de l'expression du FcRn au cours de la transplantation					
	Tous les patients					
			Profil FcRn bas (bleu)		Profil FcRn haut (rouge)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Suivi global (J0-J94)	-0,017	0,877	0,518	0,0006	-0,487	0,0005
Pré-Transplantation	0,309	0,383	0,632	0,267	0,205	0,767
H4 – J1,5	-0,1559	0,411	0,431	0,142	-0,609	0,011
J2 – J6	0,261	0,241	0,553	0,128	0,099	0,746
J7 – J94	0,010	0,961	0,379	0,199	-0,386	0,215

Tableau XV : Corrélation de la concentration en albumine en fonction de l'expression du FcRn au sein des monocytes

r : coefficient de corrélation de Spearman. Valeur *p* : déterminée par un test de Spearman. Les valeurs de *p* significatives sont en gras.

Sur l'ensemble de la cohorte, la concentration en albumine n'est pas corrélée à l'expression du FcRn monocytaire quel que soit le moment du suivi. Chez les patients ayant un profil bas, la concentration en albumine est corrélée à l'expression du FcRn monocytaire uniquement sur l'ensemble du suivi. Dans les périodes définies précédemment, aucune corrélation n'est retrouvée dans ce groupe. Chez les patients ayant un profil haut, la concentration en albumine est inversement corrélée à l'expression du FcRn monocytaire sur l'ensemble du suivi et de H4 à J1,5. Pour les autres périodes, il n'y a pas de corrélation au sein de ce groupe.

Au global, la concentration en albumine est inversement corrélée à l'expression du FcRn des PNN et des monocytes entre H4 et J1,5 pour les patients appartenant au groupe profil FcRn haut. Au sein des lymphocytes de ce groupe de patients, la corrélation entre l'albumine et l'expression du FcRn est retrouvée entre

J7-J94. Au contraire, la corrélation chez les patients ayant un profil FcRn bas n'est pas retrouvée à un moment précis quelle que soit la population cellulaire mais uniquement en global sur l'ensemble du suivi.

6 Schéma général

Une figure récapitulative est présentée ci-dessous. Elle synthétise les principales différences entre les deux groupes de patients en termes de comparaison de concentrations et de corrélations des marqueurs biologiques avec l'expression du FcRn.

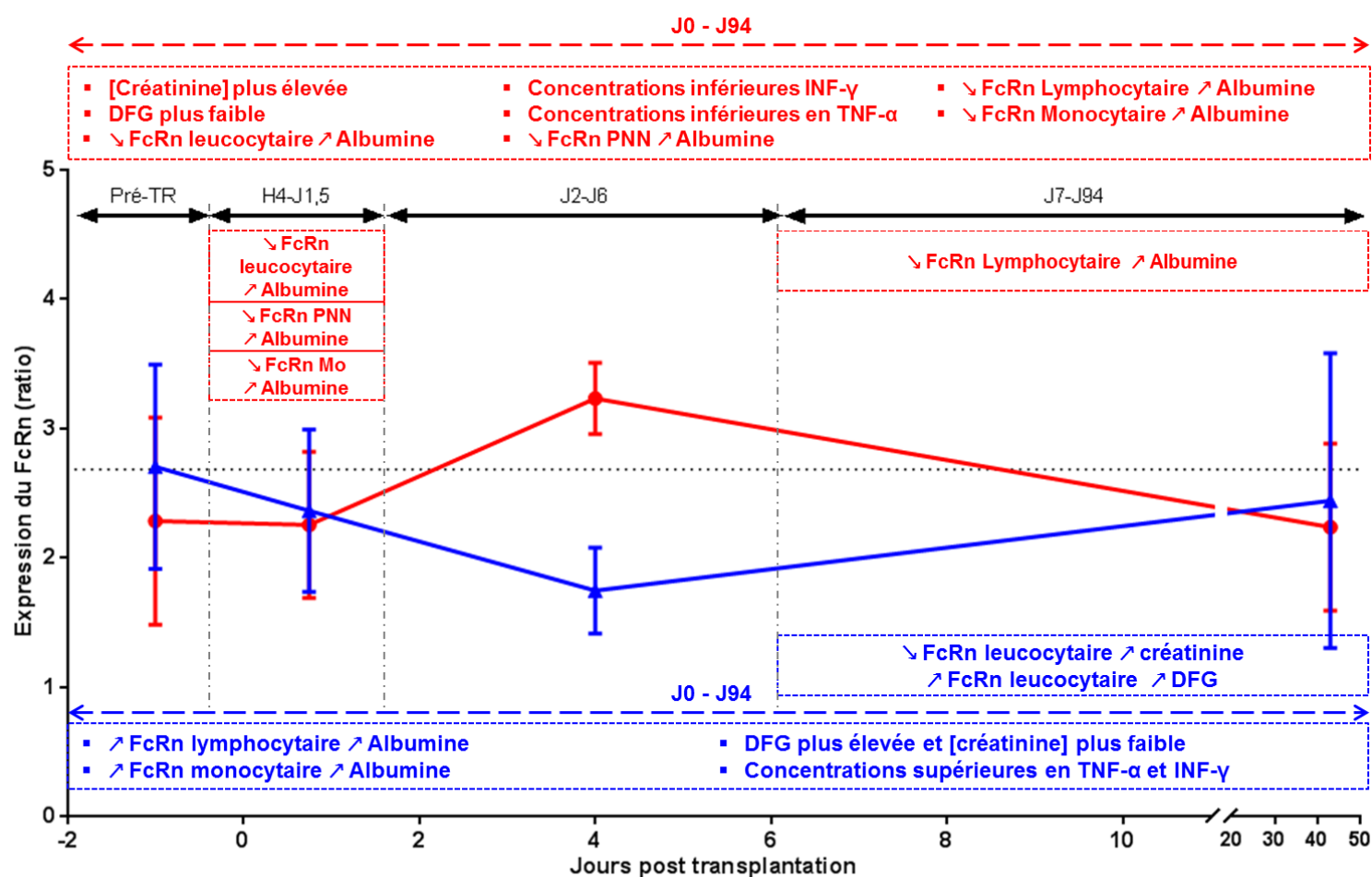


Figure 26 : Représentation schématique globale des modifications biologiques dans les deux groupes de patients définis selon le profil d'expression du FcRn au cours du suivi de la transplantation rénale

Les leucocytes sont issus du sang de 10 patients de la cohorte prospective de patients transplantés rénaux au cours du suivi de la transplantation (J0-J94). Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence +/- un écart-type. Chaque couleur représente un profil de patients (bleu : patients ayant un profil bas d'expression du FcRn ; rouge : patients ayant un profil haut d'expression du FcRn). La droite horizontale en pointillés représente la valeur moyenne seuil de 2,68 (définie à partir des donneurs sains) pour séparer les deux groupes. Les droites verticales en pointillés séparent les quatre périodes d'étude du suivi de la transplantation. Les cadres rouges se rapportent aux patients ayant un profil haut d'expression du FcRn alors que les cadres bleus se rapportent aux patients ayant un profil bas d'expression du FcRn. Les flèches situées au-dessus des courbes représentent les quatre périodes distinctes où ont été observées les variations d'expression du FcRn. Pré-Tr : pré-transplantation. DFG : Débit filtration glomérulaire. [Créatinine] : concentration en créatinine. PNN : polynucléaires neutrophiles. Mo : monocytes.

DISCUSSION

La transplantation rénale est une chirurgie mettant en jeu le système immunitaire. Le FcRn est un acteur de cette réponse, que ce soit sur le versant humoral par le recyclage des IgG, ou par son intervention dans la présentation antigénique par l'intermédiaire du CMH I ou II. Nous avons aussi étudié l'expression du FcRn en relation avec le suivi biologique des patients afin d'étudier une éventuelle participation du FcRn dans le processus de la transplantation rénale. Cette étude a nécessité la mise en place d'un protocole de dosage de l'expression du FcRn en intracellulaire sur sang total. Ce protocole a été utilisé lors d'une précédente étude au sein du laboratoire de recherche mais il a nécessité des ajustements pour un suivi hospitalier du FcRn qui pourrait être mis en place en suivi clinique de patients transplantés. En effet, le bénéfice de l'utilisation des AcM, inhibiteurs de l'activité du FcRn, pour diminuer les DSA (*Donor Specific Antibodies*) au cours d'une transplantation rénale chez des primates non humains a été démontré récemment (80).

La mise en place d'une méthode rapide, peu coûteuse, utilisable sur des fonds de tube de patients faisait partie des critères nécessaires à l'élaboration du protocole de cytométrie. Les tests de volume d'Ac nécessaires au marquage extracellulaire, les tests de volume de lyse érythrocytaire ont permis une diminution du coût des dosages. La rapidité de la méthode était nécessaire pour le suivi dans cette étude. Des problèmes de stabilité des Ac anti-FcRn ont nécessité un suivi rigoureux des lots. Des dosages avec des concentrations différentes d'Ac anti-FcRn ont été réalisés pour permettre un suivi optimal en évaluant la stabilité de l'Ac anti-FcRn. En effet, nous avons observé que l'Ac se dégradait au cours du temps. Ce problème de stabilité pourrait être levé si un Ac avec un marquage CE, synonyme de stabilité entre autres, était développé par un industriel. La manière de présenter les résultats d'expression du FcRn a aussi été un sujet de réflexion au cours notre étude. En effet, une représentation en histogramme des MFI de l'isotype et de l'anti-FcRn aurait pu être une solution, mais cela avait le désavantage de complexifier la lecture des résultats. C'est pourquoi nous avons choisi l'expression en ratio de MFI confortable pour les marquages de cytométrie intracellulaire.

Nous avons, dans un premier temps, décrit que les modulations de l'expression du FcRn ne sont pas corrélées à la concentration en CRP. Dans notre étude, les modulations du FcRn ne seraient donc pas liées au contexte inflammatoire présent lors de la transplantation. Nous avons examiné l'expression du FcRn dans un autre modèle d'inflammation que sont les crises de goutte. Nous avons mesuré la quantité de FcRn leucocytaire chez des patients goutteux, avant et après traitement par colchicine, qui est un traitement de première intention lors de la crise de goutte. Ce traitement permet de diminuer rapidement l'inflammation, objectivée biologiquement par la diminution de la CRP. Aucune différence n'est détectée entre les prélèvements avant et après mise sous traitement, semblant confirmer nos résultats sur l'absence de lien entre les concentrations en CRP et le FcRn. Certaines cytokines ayant des activités pro ou anti-inflammatoires, nous les avons évaluées dans notre étude. Ainsi, des concentrations supérieures en TNF- α et en INF- γ ont été retrouvées au sein du groupe de patients ayant une expression plus basse du FcRn. Les données publiées indiquent que ces deux cytokines possèdent des effets antagonistes sur l'expression du FcRn (49). L'INF- γ ayant un effet inhibiteur sur le promoteur du FcRn, cela pourrait expliquer un effet direct sur l'expression plus basse du FcRn. Pour le TNF- α , un effet indirect sur d'autres acteurs cellulaires susceptibles de produire des cytokines inhibant l'expression du FcRn peut être envisagée. Par ailleurs, Blumberg et *al.* ont montré que la cellule dendritique sécrétait moins de TNF- α et d'IL-6 en présence d'antagonistes du FcRn (76). Au cours de notre suivi des différences de concentrations en TNF- α ont été retrouvées entre les deux groupes de patients, mais pas en IL-6. Le faible nombre de patients au sein de la cohorte peut expliquer l'absence de résultats pour l'IL-6 mais ce résultat est compatible avec l'absence de relation entre la concentration en CRP et le FcRn. L'ensemble des résultats concernant la CRP et les cytokines semblent montrer que les modifications de l'expression du FcRn seraient le résultat de cytokines telles que le TNF- α et l'INF- γ .

La créatinine et le DFG sont deux marqueurs permettant d'estimer la fonction rénale. Dans cette étude, nous avons suivi l'évolution de ces marqueurs parallèlement à celui du FcRn. Les patients possédant une expression du FcRn plus basse entre J2 et J6, possèdent un DFG plus élevé ou une créatininémie plus basse. Ce groupe de patients présenterait une meilleure reprise de la fonction rénale

puisque les valeurs de DFG ou créatinine sont plus proches de celles observées chez des témoins sains. L'analyse de l'expression du FcRn après J7 post-transplantation, indique une corrélation au DFG dans ce même groupe. Le FcRn est exprimé au sein des cellules tubulaires et des podocytes ; des variations d'expression au sein de ces cellules expliquent peut-être ces résultats par des mécanismes encore inconnus. D'autres travaux pour comprendre le lien entre l'expression du FcRn et le DFG restent à entreprendre.

Dans notre étude, nous avons observé une corrélation entre l'expression du FcRn et les concentrations en albumine. L'albumine, ligand du FcRn, varie au cours des semaines suivant la transplantation. En effet, une diminution de celle-ci est observée pendant les premières semaines post-transplantation avant une normalisation (81). Cette diminution peut s'expliquer par la sensibilité de l'albumine à certaines cytokines. Le TNF- α et l'IL-1 diminuent sa concentration circulante dans un modèle de cachexie (82). Or des concentrations en TNF- α différentes selon les 2 groupes de patients sont retrouvées dans notre étude, mais aucune différence de concentration en albumine n'est observée entre les groupes.

Lorsque l'on étudie au niveau rénal, l'effet du FcRn sur la concentration en albumine, chez les souris ayant des podocytes sans FcRn, une augmentation des IgG par absence de transcytose est observée mais aucune modification n'est apparue pour l'albumine (83). Cette absence de modification peut s'expliquer par le fait que l'albumine peut se lier à un complexe cubiline mégaline dans des vésicules recouvertes de clathrine lors de la phase endocytose. Le complexe est ensuite libéré à pH acide dans l'endosome pour se fixer sur FcRn et subir une transcytose (23, 84). Au cours de notre suivi, les variations de l'expression du FcRn, lymphocytaires et monocytaires, sont corrélées à la concentration en albumine chez les patients ayant une expression faible du FcRn et les variations de l'expression du FcRn leucocytaire sont inversement corrélées chez les patients ayant une expression forte en FcRn. Cela suggère que l'expression du FcRn varie pour maintenir une concentration constante en albumine sanguine. Par contre, les concentrations en IgG n'ayant pas pu être mesurées dans cette étude, il est impossible de savoir s'il existe une différence de concentration en IgG entre les deux profils de patients. Mais une diminution des IgG est probable car d'après Weeke et *al.*, la concentration en IgG

diminue dans les deux premières semaines post-transplantation puis elle reste légèrement diminuée (81). Au niveau cinétique, les premières corrélations entre l'expression du FcRn et la concentration en albumine sont observées au cours de la période H4 et J1,5, soit au cours de la période précédant celle où les valeurs de l'expression du FcRn sont différentes entre les deux groupes de patients (profil FcRn haut et bas). La différence d'expression du FcRn entre les deux groupes à J2-J6 est peut être due aux corrélations avec la concentration en albumine observée entre H4 et J1,5.

Dans un modèle de syndrome néphrotique, l'albumine présent dans l'ultrafiltrat glomérulaire expose à des lésions podocytaires et entraîne une libération de cytokines comme le TNF- α , IL-1 β et l'IL-6 (85). Le maintien d'une concentration constante en albumine par l'intervention du FcRn observé dans notre suivi, pourrait être un moyen de limiter les lésions podocytaires et la libération de cytokines. La libération de TNF- α et IL-1 β lors d'une concentration trop importante en albumine, permettrait de normaliser la concentration en albumine car ce sont ces mêmes cytokines qui diminuent la concentration en albumine circulante.

Dans des cultures de podocytes sans FcRn, une augmentation de la motilité podocytaire, une réponse diminuée aux complexes immuns et une diminution de la sécrétion d'IL-6 ont été démontrées par Tonsawan (86). L'ajout d'IL-6 permet une normalisation de la motilité. Cette même équipe a montré qu'en présence d'albumine, les podocytes sauvages produisent plus d'IL-6 qu'en absence du FcRn. Cela conforte notre supposition que les variations du FcRn liées à celles de l'albumine vont influencer sur la concentration d'IL-6 libérée par le podocyte et sur sa motilité. Sachant que Mundel et Reiser ont montré que la motilité inappropriée du podocyte est une anomalie retrouvée dans de nombreuses pathologies glomérulaires à protéinurie massive (87), les modulations de l'expression du FcRn observées en lien avec l'albumine pourrait influencer sur la protéinurie des patients. Cela signifierait que le maintien d'une concentration constante en albumine par les modulations de l'expression du FcRn permettrait de limiter les lésions podocytaires dues à l'albumine et les modifications de motilité à l'origine de protéinurie. Dans notre cohorte, on a remarqué une diminution plus ou moins rapide de la protéinurie selon le profil mais le faible nombre de patients dans chaque groupe ne permet pas de conclure sur un lien

entre les variations du FcRn et la négativation de la protéinurie. Ces résultats sont toutefois à nuancer car il a été démontré par Fang Fang He que l'IL-6 augmentait la motilité podocytaire, résultat allant à l'inverse des résultats de Tonsawan (88). Des liens entre le FcRn, l'albumine, l'IL-6, la motilité podocytaire et la protéinurie semblent exister mais des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer l'interaction entre les différents acteurs et leurs conséquences cliniques.

CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons réalisé un suivi de l'expression du FcRn leucocytaire au sein d'une cohorte de patients transplantés rénaux. Deux profils de patients ayant des caractéristiques biologiques différentes (créatinine, DFG, concentration en cytokines) sont apparus au cours du suivi. Au sein du groupe de patients ayant un profil haut d'expression du FcRn, une corrélation négative de l'expression du FcRn avec la concentration en albumine a été montrée. Dans le groupe de patients ayant un profil bas d'expression du FcRn, la concentration en albumine est corrélée positivement à l'expression du FcRn uniquement sur les lymphocytes et les monocytes. A la lumière de la littérature, ces variations de l'expression du FcRn seraient un moyen de maintenir une concentration constante en albumine au niveau podocytaire en lien avec la négativation observée de la protéinurie. Cependant l'expression du FcRn mesurée dans notre étude est une expression leucocytaire et non podocytaire, nuancant les résultats observés. Des explorations complémentaires sont nécessaires pour confirmer les hypothèses évoquées.

ANNEXES

	Patient N°	Age	Poids	Taille (m)	Sexe	IMC (kg/m²)	Type Greffe		Ac Anti HLA Classe I	Ac Anti HLA Classe II	DSA	Induction	Nombre de TR	Pathologie à l'origine de l'insuffisance rénale	Particularité de la transplantation rénale	Durée ischémie froide (h)	Durée ischémie tiède (h)	Reprise diurèse	Reprise fonction rénale
Expression du FcRn basse à J2-J6	1	48	54,4	1,68	H	19,3	TDV	FRERE	-	-	NON	SIMULECT	1	Glomérulonéphrite Membranoproliférative	ABO incompatible	0,0	0,66	J1	Lente
	3	31	59	1,65	F	21,7	TDV	MARI	+	+	NON	SAL	1	Néphropathie IgA		0,0	0,95	J0	J1
	4	75	61,8	1,52	F	26,7	Mort Encéphalique		+	-	NON	SIMULECT	1	Néphropathie indéterminée		25,5	1,16	J0	J0
	7	72	98,9	1,73	H	33,0	TDV	FEMME	+	-	NON	SIMULECT	1	Néphropathie d'origine indéterminée (probablement mixte diabétique et hypertensive)		0,0	0,92	J1	J1
	9	56	61	1,78	H	19,3	TDV	FRERE	+	-	FAIBLE	SIMULECT	2	Glomérulonéphrite Membranoproliférative	Sd lymphoprolifératif post-TR (2 ans), rejet humoral 11 ans après TR	?	?	J1	J1
Expression du FcRn haute à J2-J6	2	52	71	1,63	F	26,7	TDV	MARI	-	-	NON	SIMULECT	1	Néphropathie indéterminée		2,0	0,70	J2	J2
	5	52	56,7	1,56	F	23,3	TDV	FRERE	+	+	NON	SIMULECT	2	Uropathie malformative avec reflux vésico-urétéral.	1ère TR en 1987, Lymphome B 15 ans post TR, rejet humoral 22 ans post TR	0,1	0,66	J1	J5
	6	29	56,5	1,64	H	21,0	Mort Encéphalique		+	+	NON	SIMULECT	1	Néphropathie indéterminée, familiale ?		6,7	1,10	J0	J5
	8	61	87,4	1,57	H	35,5	Mort Encéphalique		-	-	NON	SIMULECT	1	IRC liée à Maladie de Cacchi-Ricci avec néphrocalcinose	Thrombose à J1, reprise au bloc	11,0	0,93	J1	Lente
	10	74	68	1,55	F	28,3	Mort Encéphalique		+	+	NON	SIMULECT	1	Néphropathie diabétique		8,0	0,76	J2	Lente

Annexe 1 : Tableau descriptif de la cohorte

Données cliniques provenant des données ASTRE. H : homme. F : femme. HLA : *Human leucocyte antigen*. + : Patients possédant des Ac. - : Patients n'ayant pas d'Ac DSA : *Donor specific antibodies*. TR : Transplantation rénale. Sd : Syndrome. SIMULECT : Induction par Ac anti-récepteur à l'IL-2. SAL : Sérum anti-lymphocytaire. IMC : Indice masse corporelle. IRC : Insuffisance rénale chronique.

Population cellulaire	GB	PNN	Ly totaux	Mo	Ly T	Ly B	Ly NK	Mo 1	Mo2	Mo3
Valeur moyenne	2,04	2,10	1,86	2,06	1,79	1,89	1,94	2,16	1,77	1,73
Valeur d'un écart-type	0,64	0,73	0,47	0,56	0,46	0,59	0,45	0,58	0,50	0,57

Annexe 2 : Valeurs normales des ratios d'expression du FcRn dans les sous-populations leucocytaires (leucocytes, PNN, lymphocytes, monocytes) de donneurs sains

Les leucocytes sont issus du sang de 19 donneurs sains. Le ratio d'expression du FcRn a été mesuré sur l'ensemble des leucocytes (GB) ainsi que sur 9 sous-populations leucocytaires (PNN : polynucléaires neutrophiles, Ly totaux : Lymphocytes totaux, lymphocytes T, B, NK, Mo : monocytes et monocytes conventionnels (Mo1), non conventionnels (Mo3) et intermédiaires (Mo2)) pour chaque donneur. Les données sont exprimées en ratio de moyenne d'intensité de fluorescence.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brambell FW, Halliday R, Brierley J, Hemmings WA. Transference of passive immunity from mother to young. *Lancet*. 1954;266(6819):964-5.
2. Brambell RW. Problems concerning the transmission of immunity from mother to young. *Proc R Soc Med*. 1961;54:992-3.
3. Brambell FW, Hemmings WA, Morris IG. A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature*. 1964;203:1352-4.
4. Brambell FW. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet*. 1966;2(7473):1087-93.
5. Brambell FW. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. *Proc Nutr Soc*. 1969;28(1):35-41.
6. Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2014;15(8):707-16.
7. Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, Andersen JT, Sandlie I, Blumberg RS. The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Frontiers in immunology*. 2019;10:1540.
8. Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*. 1989;337(6203):184-7.
9. Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature*. 1994;372(6504):336-43.
10. Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature*. 1994;372(6504):379-83.
11. West AP, Jr., Bjorkman PJ. Crystal structure and immunoglobulin G binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor(,). *Biochemistry*. 2000;39(32):9698-708.
12. Story CM, Mikulska JE, Simister NE. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(6):2377-81.
13. Vaughn DE, Bjorkman PJ. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure*. 1998;6(1):63-73.
14. Gastinel LN, Simister NE, Bjorkman PJ. Expression and crystallization of a soluble and functional form of an Fc receptor related to class I histocompatibility molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(2):638-42.
15. Taha M, Ward SE, Nam HJ. The X-Ray Crystallographic Structure of the Human Neonatal Fc Receptor at Acidic pH Gives Insights into pH-Dependent Conformational Changes. *Protein Pept Lett*. 2016;23(6):525-9.
16. Raghavan M, Bjorkman PJ. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:181-220.
17. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987;329(6139):506-12.

18. Ahouse JJ, Hagerman CL, Mittal P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1993;151(11):6076-88.
19. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(9):715-25.
20. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*. 2014;5:520.
21. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(3):315-22.
22. Peters T, Jr. Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clinical Chemistry*. 1977;23(1):5-12.
23. Gburek J, Konopska B, Golab K. Renal Handling of Albumin-From Early Findings to Current Concepts. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11).
24. Andersen JT, Pehrson R, Tolmachev V, Daba MB, Abrahmsen L, Ekblad C. Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5234-41.
25. Andersen JT, Dalhus B, Cameron J, Daba MB, Plumridge A, Evans L, et al. Structure-based mutagenesis reveals the albumin-binding site of the neonatal Fc receptor. *Nat Commun*. 2012;3:610.
26. Oganessian V, Damschroder MM, Cook KE, Li Q, Gao C, Wu H, et al. Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J Biol Chem*. 2014;289(11):7812-24.
27. Abdiche YN, Yeung YA, Chaparro-Riggers J, Barman I, Strop P, Chin SM, et al. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *MAbs*. 2015;7(2):331-43.
28. Chaudhury C, Brooks CL, Carter DC, Robinson JM, Anderson CL. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry*. 2006;45(15):4983-90.
29. Alberio T, Forlani G, Lualdi M, Tosi G, Accolla RS, Fasano M. Neonatal Fc receptor is involved in the protection of fibrinogen after its intake in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Translational Medicine*. 2018;16(1):64.
30. Morosky S, Wells AI, Lemon K, Evans AS, Schamus S, Bakkenist CJ, et al. The neonatal Fc receptor is a pan-echovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(9):3758-63.
31. Zhao X, Zhang G, Liu S, Chen X, Peng R, Dai L, et al. Human Neonatal Fc Receptor Is the Cellular Uncoating Receptor for Enterovirus B. *Cell*. 2019;177(6):1553-65 e16.
32. Qi T, Cao Y. In Translation: FcRn across the Therapeutic Spectrum. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6).
33. Rath T, Kuo TT, Baker K, Qiao SW, Kobayashi K, Yoshida M, et al. The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG. *Journal of clinical immunology*. 2013;33 Suppl 1(Suppl 1):S9-17.

34. Wang W, Lu P, Fang Y, Hamuro L, Pittman T, Carr B, et al. Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011;39(9):1469-77.
35. Sun Y, Estevez A, Schlothauer T, Wecksler AT. Antigen physiochemical properties allosterically effect the IgG Fc-region and Fc neonatal receptor affinity. *MAbs*. 2020;12(1):1802135.
36. Rossini S, Noe R, Davenport V, Lecerf M, Justesen S, Dimitrov JD. V Region of IgG Controls the Molecular Properties of the Binding Site for Neonatal Fc Receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2020;205(10):2850-60.
37. Ternant D, Arnoult C, Pugnière M, Dhommée C, Drocourt D, Perouzel E, et al. IgG1 Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2016;196(2):607-13.
38. Monnet C, Jorieux S, Urbain R, Fournier N, Bouayadi K, De Romeuf C, et al. Selection of IgG Variants with Increased FcRn Binding Using Random and Directed Mutagenesis: Impact on Effector Functions. *Frontiers in immunology*. 2015;6:39.
39. Andersen JT, Dee Qian J, Sandlie I. The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptor heavy chain is critical for the pH-dependent binding to albumin. *Eur J Immunol*. 2006;36(11):3044-51.
40. Bern M, Sand KM, Nilsen J, Sandlie I, Andersen JT. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery. *J Control Release*. 2015;211:144-62.
41. Latvala S, Jacobsen B, Otteneder MB, Herrmann A, Kronenberg S. Distribution of FcRn Across Species and Tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2017;65(6):321-33.
42. Castaneda DC, Dhommee C, Baranek T, Dalloneau E, Lajoie L, Valayer A, et al. Lack of FcRn Impairs Natural Killer Cell Development and Functions in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2259.
43. Haymann JP, Levraud JP, Bouet S, Kappes V, Hagege J, Nguyen G, et al. Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(4):632-9.
44. Kandil E, Egashira M, Miyoshi O, Niikawa N, Ishibashi T, Kasahara M. The human gene encoding the heavy chain of the major histocompatibility complex class I-like Fc receptor (FCGRT) maps to 19q13.3. *Cytogenetics and cell genetics*. 1996;73(1-2):97-8.
45. Cejas RB, Ferguson DC, Quinones-Lombrana A, Bard JE, Blanco JG. Contribution of DNA methylation to the expression of FCGRT in human liver and myocardium. *Sci Rep*. 2019;9(1):8674.
46. Ferguson DC, Blanco JG. Regulation of the Human Fc-Neonatal Receptor alpha-Chain Gene FCGRT by MicroRNA-3181. *Pharm Res*. 2018;35(1):15.
47. Sachs UJ, Socher I, Braeunlich CG, Kroll H, Bein G, Santoso S. A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter. *Immunology*. 2006;119(1):83-9.

48. Liu X, Ye L, Christianson GJ, Yang JQ, Roopenian DC, Zhu X. NF-kappaB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;179(5):2999-3011.
49. Liu X, Ye L, Bai Y, Mojidi H, Simister NE, Zhu X. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN-gamma can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(1):449-63.
50. Qian S, Li C, Liu X, Jia X, Xiao Y, Li Z. Activation of the JNK/MAPK Signaling Pathway by TGF-beta1 Enhances Neonatal Fc Receptor Expression and IgG Transcytosis. *Microorganisms*. 2021;9(4).
51. Sand KM, Bern M, Nilsen J, Noordzij HT, Sandlie I, Andersen JT. Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. *Frontiers in immunology*. 2014;5:682.
52. Simister NE, Story CM, Chen HL, Hunt JS. An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol*. 1996;26(7):1527-31.
53. Sarav M, Wang Y, Hack BK, Chang A, Jensen M, Bao L, et al. Renal FcRn reclaims albumin but facilitates elimination of IgG. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(9):1941-52.
54. Vidarsson G, Stemerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, Rebers FE, et al. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood*. 2006;108(10):3573-9.
55. Weflen AW, Baier N, Tang QJ, Van den Hof M, Blumberg RS, Lencer WI, et al. Multivalent immune complexes divert FcRn to lysosomes by exclusion from recycling sorting tubules. *Molecular biology of the cell*. 2013;24(15):2398-405.
56. Baker K, Rath T, Pyzik M, Blumberg RS. The Role of FcRn in Antigen Presentation. *Frontiers in immunology*. 2014;5:408.
57. Hubbard JJ, Pyzik M, Rath T, Kozicky LK, Sand KMK, Gandhi AK, et al. FcRn is a CD32a coreceptor that determines susceptibility to IgG immune complex-driven autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*. 2020;217(10).
58. Yoshida M, Masuda A, Kuo TT, Kobayashi K, Claypool SM, Takagawa T, et al. IgG transport across mucosal barriers by neonatal Fc receptor for IgG and mucosal immunity. *Springer seminars in immunopathology*. 2006;28(4):397-403.
59. Baker K, Rath T, Flak MB, Arthur JC, Chen Z, Glickman JN, et al. Neonatal Fc receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity*. 2013;39(6):1095-107.
60. Dalloneau E, Baroukh N, Mavridis K, Maillet A, Gueugnon F, Courty Y, et al. Downregulation of the neonatal Fc receptor expression in non-small cell lung cancer tissue is associated with a poor prognosis. *Oncotarget*. 2016;7(34):54415-29.
61. Swiercz R, Mo M, Khare P, Schneider Z, Ober RJ, Ward ES. Loss of expression of the recycling receptor, FcRn, promotes tumor cell growth by increasing albumin consumption. *Oncotarget*. 2017;8(2):3528-41.

62. Cadena Castaneda D, Brachet G, Goupille C, Ouldamer L, Gouilleux-Gruart V. The neonatal Fc receptor in cancer FcRn in cancer. *Cancer medicine*. 2020;9(13):4736-42.
63. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*. 2015;278(4):369-95.
64. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2008;4(9):491-8.
65. Liu Z, Roopenian DC, Zhou X, Christianson GJ, Diaz LA, Sedmak DD, et al. Beta2-microglobulin-deficient mice are resistant to bullous pemphigoid. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(5):777-83.
66. Sesarman A, Sitaru AG, Olaru F, Zillikens D, Sitaru C. Neonatal Fc receptor deficiency protects from tissue injury in experimental epidermolysis bullosa acquisita. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2008;86(8):951-9.
67. Akilesh S, Petkova S, Sproule TJ, Shaffer DJ, Christianson GJ, Roopenian D. The MHC class I-like Fc receptor promotes humorally mediated autoimmune disease. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1328-33.
68. Melzer N, Ruck T, Fuhr P, Gold R, Hohlfeld R, Marx A, et al. Clinical features, pathogenesis, and treatment of myasthenia gravis: a supplement to the Guidelines of the German Neurological Society. *J Neurol*. 2016;263(8):1473-94.
69. Singh A, Uzun G, Bakchoul T. Primary Immune Thrombocytopenia: Novel Insights into Pathophysiology and Disease Management. *Journal of clinical medicine*. 2021;10(4).
70. Zuercher AW, Spirig R, Baz Morelli A, Rowe T, Käsermann F. Next-generation Fc receptor-targeting biologics for autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2019;18(10):102366.
71. Vanoni F, Lava SAG, Fossali EF, Cavalli R, Simonetti GD, Bianchetti MG, et al. Neonatal Systemic Lupus Erythematosus Syndrome: a Comprehensive Review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2017;53(3):469-76.
72. Mimoun A, Delignat S, Peyron I, Davenport V, Lecerf M, Dimitrov JD, et al. Relevance of the Materno-Fetal Interface for the Induction of Antigen-Specific Immune Tolerance. *Frontiers in immunology*. 2020;11:810.
73. Kang JH, Baik HW, Yoo SM, Kim JH, Cheong HI, Park CG, et al. Aliskiren Regulates Neonatal Fc Receptor and IgG Metabolism with Attenuation of Anti-GBM Glomerulonephritis in Mice. *Nephron*. 2016;134(4):272-82.
74. Olaru F, Luo W, Suleiman H, St John PL, Ge L, Mezo AR, et al. Neonatal Fc receptor promotes immune complex-mediated glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(5):918-25.
75. Lamamy J, Boulard P, Brachet G, Tourlet S, Gouilleux-Gruart V, Ramdani Y. "Ways in which the neonatal Fc-receptor is involved in autoimmunity". *Journal of Translational Autoimmunity*. 2021:100122.
76. Blumberg LJ, Humphries JE, Jones SD, Pearce LB, Holgate R, Hearn A, et al. Blocking FcRn in humans reduces circulating IgG levels and inhibits IgG immune complex-mediated immune responses. *Sci Adv*. 2019;5(12):eaax9586.

77. Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, Bry L, Glickman JN, Claypool SM, et al. Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2142-51.
78. Ben Suleiman Y, Yoshida M, Nishiumi S, Tanaka H, Mimura T, Nobutani K, et al. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) expressed in the gastric epithelium regulates bacterial infection in mice. *Mucosal immunology*. 2012;5(1):87-98.
79. Armitage CW, O'Meara CP, Harvie MC, Timms P, Blumberg RS, Beagley KW. Divergent outcomes following transcytosis of IgG targeting intracellular and extracellular chlamydial antigens. *Immunology and cell biology*. 2014;92(5):417-26.
80. Manook M, Flores WJ, Schmitz R, Fitch Z, Yoon J, Bae Y, et al. Measuring the Impact of Targeting FcRn-Mediated IgG Recycling on Donor-Specific Alloantibodies in a Sensitized NHP Model. *Frontiers in immunology*. 2021;12:660900.
81. Weeke B, Weeke E, Bendixen G. The variation in twenty-one serum proteins before and after renal transplantation. I. General pattern. *Acta medica Scandinavica*. 1971;189(1-2):113-8.
82. Brenner DA, Buck M, Feitelberg SP, Chojkier M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits albumin gene expression in a murine model of cachexia. *J Clin Invest*. 1990;85(1):248-55.
83. Dylewski J, Dobrinskikh E, Lewis L, Tonsawan P, Miyazaki M, Jat PS, et al. Differential trafficking of albumin and IgG facilitated by the neonatal Fc receptor in podocytes in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2019;14(2):e0209732.
84. Tenten V, Menzel S, Kunter U, Sicking EM, van Roeyen CR, Sanden SK, et al. Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(12):1966-80.
85. Okamura K, Dummer P, Kopp J, Qiu L, Levi M, Faubel S, et al. Endocytosis of albumin by podocytes elicits an inflammatory response and induces apoptotic cell death. *PLoS One*. 2013;8(1):e54817.
86. Tonsawan P, Dylewski J, Lewis L, Blaine J. Knockout of the neonatal Fc receptor in cultured podocytes alters IL-6 signaling and the actin cytoskeleton. *American journal of physiology Cell physiology*. 2019;317(5):C1048-c60.
87. Mundel P, Reiser J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney international*. 2010;77(7):571-80.
88. He FF, Bao D, Su H, Wang YM, Lei CT, Zhang CY, et al. IL-6 increases podocyte motility via MLC-mediated focal adhesion impairment and cytoskeleton disassembly. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(9):7173-81.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e)

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21809652t

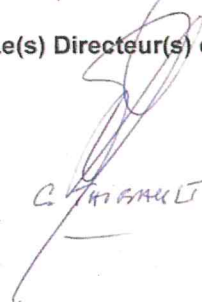

N° Thèse : 90

Nom et Prénom : Boulard Pierre

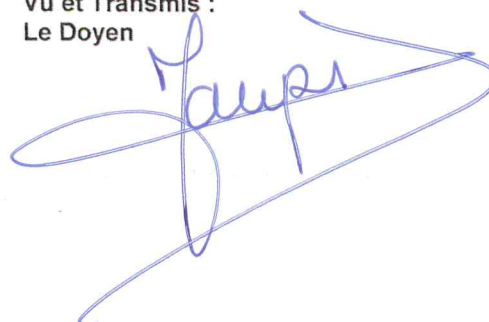
Sujet : Suivi de la modulation de l'expression du FcRn dans les leucocytes chez les patients
transplantés rénaux

Tours, le : 15/10/2021

Le(s) Directeur(s) de Thèse :

 C. HANULT 

Vu et Transmis :
Le Doyen



BOULARD PIERRE
N° 90

Suivi de la modulation de l'expression du FcRn dans les leucocytes chez les patients transplantés rénaux

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le FcRn ou récepteur néonatal pour la portion Fc des IgG est un récepteur connu initialement pour son implication dans la transcytose et le recyclage des IgG et de l'albumine. Ultérieurement, il est décrit comme un acteur important de la réponse immunitaire, en raison de sa participation à la phagocytose et à la présentation antigénique. Son intervention au cours de situations pathologiques comme le cancer, les maladies auto-immunes et l'inflammation a été démontrée en pathologie humaine. Le système immunitaire est mis en jeu dans de nombreuses situations cliniques. C'est le cas de la transplantation rénale puisque le receveur déclenche une réponse immunitaire contre le greffon, partiellement contrôlée par les thérapies immunosuppressives. Afin d'évaluer l'implication du FcRn dans la réponse immunitaire post-transplantation, nous avons suivi l'expression du FcRn leucocytaire dans une population de 10 patients transplantés rénaux. Durant l'étude, deux groupes de patients se distinguent selon leur expression du FcRn entre J2-J6 post transplantation. Des concentrations inférieures en cytokines (TNF- α et INF- γ) et une concentration supérieure en créatinine sont observées dans le groupe de patients ayant une expression plus élevée du FcRn. Dans ce groupe (n=5), l'expression du FcRn leucocytaire est inversement corrélée à celle de l'albumine et pendant la période J7-J94 post-transplantation, l'expression du FcRn est inversement corrélée à la concentration en créatinine. Au sein de l'autre groupe de patients, la concentration en albumine est corrélée positivement à l'expression du FcRn uniquement sur les lymphocytes et les monocytes. Ces résultats suggèrent une implication du récepteur FcRn au cours de la transplantation rénale, en rapport avec un de ses ligands, l'albumine. Les mécanismes à l'origine de ces observations restent à élucider.

FcRn, Transplantation rénale, Albumine, Leucocytes

JURY

PRÉSIDENT : Pr Gilles Thibault

MEMBRES :

Pr Claire Pouplard

Pr Philippe Gatault

Dr Valérie Gouilleux-Gruart

Vendredi 15 Octobre 2021 à la Faculté de Pharmacie de Tours