

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**IMPACT DE LA PRÉSENCE PRÉGREFFE D'ANTICORPS ANTI-HLA SPÉCIFIQUES
AU DONNEUR SUR LA SURVIE DU GREFFON RÉNAL**

Par
Alexandre Rouleau

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Marie Claude Rousseau
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Éric Wagner
Centre de recherche du CHU Laval
Université Laval

Directeur de recherche

Claude Daniel
Institut Armand-Frappier-INRS

1 REMERCIEMENTS

Merci à mes parents, ma copine, Claude Daniel, Fernando Echeverry, le jury ayant évalué ce document, mes collègues du laboratoire, Heloise Cardinal, les pathologistes du CHUM, l'INRS-IAF, le CHUM ainsi que tous les patients ayant accepté de participer à cette étude.

2 RÉSUMÉ

Les anticorps anti-HLA spécifiques au donneur (DSA) sont considérés comme une contre-indication de la transplantation rénale. Ils peuvent se développer suite à l'exposition d'allo-antigènes présents lors de transfusion sanguine, de grossesse ou de greffe d'organe. Des procédés existent pour les détecter et ces procédés sont devenus de plus en plus sensibles avec le temps, permettant la détection d'anti-HLA présents en faible titre. Pour évaluer les conséquences d'une greffe malgré la présence de ce type de DSA, nous avons analysé rétrospectivement, en utilisant des méthodes de détection contemporaine, une cohorte de 176 volontaires greffés entre 1994 et 2006 à l'hôpital Notre-Dame à la recherche d'anticorps anti-HLA non identifiés par les moyens de l'époque. Vingt-quatre DSA ont été identifiés chez 17 patients (9,6 %). Le groupe de patients avec DSA montre un pourcentage de survie du greffon réduit comparé au groupe de patients témoins ($p = 0,005$). Les patients possédant plus de 1 DSA n'ont pas un taux de survie inférieur à ceux n'en possédant qu'un seul ($p = 0.8858$). Tous les patients ayant un DSA dirigé contre les molécules du locus A (5) ont perdu leur greffon. La présence de DSA, même de faibles réactivités, doit être considérée dans la prise de décision au moment de la greffe et si possible évitée.

Mots-clés : [HLA; DSA; greffon; transplantation; rejet; survie; rénal]

TABLE DES MATIÈRES

1	REMERCIEMENTS.....	III
2	RÉSUMÉ.....	V
3	LISTE DES TABLEAUX.....	IX
4	LISTE DES FIGURES.....	XI
5	LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIII
6	REVUE DE LITTÉRATURE - SYSTEME IMMUNITAIRE ET TRANSPLANTATION.....	1
6.1	SYSTEME IMMUNITAIRE INNE	2
6.1.1	<i>Rôle dans la transplantation.....</i>	4
6.2	SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF	5
6.2.1	<i>Le complexe majeur d'histocompatibilité</i>	5
6.2.2	<i>Développement thymique.....</i>	8
6.2.3	<i>La présentation d'antigène</i>	9
6.2.4	<i>Réponse cellulaire.....</i>	10
6.3	REPOSE HUMORALE.....	11
6.3.1	<i>Développement des lymphocytes B.....</i>	11
6.3.2	<i>Activation des lymphocytes B.....</i>	12
6.3.3	<i>Rôles des anticorps.....</i>	13
7	DIAGNOSTIC ET PREVENTION DU REJET.....	17
7.1	LES CRITERES DE BANFF.....	17
7.2	LA PHARMACOPEE IMMUNOSUPPRESSIVE.....	17
7.2.1	<i>Inhibiteurs de calcineurine.....</i>	18
7.2.2	<i>Inhibiteurs de mTOR</i>	19
7.2.3	<i>Agents antiprolifératifs.....</i>	20
7.2.4	<i>Corticoglucostéroïdes.....</i>	20
7.2.5	<i>Les anticorps monoclonaux et protéines de fusion</i>	21
7.2.6	<i>Les effets secondaires et risques associés.....</i>	26
7.2.7	<i>Recherches et développement de molécules immunosuppressives</i>	27
7.3	METHODES D'EVALUATION DE COMPATIBILITE TISSULAIRE	28
7.3.1	<i>Les premiers pas.....</i>	28
7.3.2	<i>Les nouvelles méthodes.....</i>	29
7.3.3	<i>La complexité de l'identification des anticorps anti-HLA.....</i>	30
8	MATERIEL ET METHODES.....	32
8.1	IDENTIFICATION ET RECRUTEMENT DES PATIENTS	32
8.2	RECHERCHE D'ANTICORPS	33

8.3	GENOTYPAGE DE HLA	38
8.4	ANALYSES STATISTIQUES	39
9	RESULTATS	40
9.1	VALIDATION DE DETECTION D'ANTICORPS LSAI ET LSAII <i>LIFECODES LSA™</i>	40
9.2	CARACTERISTIQUE DE LA POPULATION A L'ETUDE	46
9.3	PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON.....	48
9.4	FACTEURS ASSOCIES A LA SURVIE DU GREFFON – ANALYSES UNIVARIEES	50
9.5	FACTEURS ASSOCIES A LA SURVIE DU GREFFON – ANALYSES MULTIVARIEES.....	66
10	DISCUSSION	68
10.1	LES DEFIS DU RECRUTEMENT	68
10.2	LA SURVIE DU GREFFON ET LES DSA	69
10.3	LA SURVIE DU GREFFON ET LES AUTRES PROBLEMATIQUES	72
11	CONCLUSION	76
12	RÉFÉRENCES.....	78
13	ANNEXES	84
13.1	VERBATIM TELEPHONIQUE.....	84
13.2	PROTOCOLE DE RECHERCHE.....	88
13.3	FORMULAIRE DE CONSENTEMENT	103

3 LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : RESUME DES CIBLES ET EFFETS DE CERTAINES CYTOKINES	3
TABLEAU 2: POLYMORPHISME DES GENES HLA	6
TABLEAU 3 : FONCTIONS ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DES DIFFERENTES CLASSES ET SOUS-CLASSE D'ANTICORPS	15
TABLEAU 4 : RESUME DES PRINCIPAUX AGENTS IMMUNOSUPPRESSIFS, MECANISMES ET EFFETS SECONDAIRES .	24
TABLEAU 5 : TEMPERATURE D'AMPLIFICATION D'ADN PAR LA METHODE <i>LIFECODES SSO HLA TYPING -RAPID</i> ..	38
TABLEAU 6 : TEMPERATURE D'HYBRIDATION D'ADN COMPLEMENTAIRE PAR LA METHODE <i>LIFECODES SSO HLA TYPING -RAPID</i>	39
TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DE LA COHORTE DE PATIENTS TRANSPLANTES DE L'ETUDE.....	46
TABLEAU 8 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DE LA COHORTE DE PATIENTS DE L'ETUDE SUITE.....	47
TABLEAU 9 : ANALYSE MULTIVARIEE DES FACTEURS INFLUANÇANT LA SURVIE DU GREFFON	66

4 LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PHYSIOLOGIE DES DOMMAGES CAUSES PAR LES DSA	14
FIGURE 2 : CIBLES ET MODE D'ACTION DES IMMUNOSUPPRESSEURS	23
FIGURE 3 : EXEMPLE D'IDENTIFICATION D'ANTICORPS DSA.....	37
FIGURE 4 : VALIDATION DE LA VALEUR SEUIL AD-BCR POUR LES ANTICORPS ANTI-HLA DE CLASSE I EN SE BASANT SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR LABSCREEN	40
FIGURE 5 : VALIDATION DE LA VALEUR SEUIL BCR POUR LES ANTICORPS ANTI-HLA DE CLASSE I EN SE BASANT SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR LABSCREEN.....	41
FIGURE 6 : VALIDATION DE LA VALEUR SEUIL BCM POUR LES ANTICORPS ANTI-HLA DE CLASSE I EN SE BASANT SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR LABSCREEN.....	42
FIGURE 7 : VALIDATION DE LA VALEUR SEUIL AD-BCR POUR LES ANTICORPS ANTI-HLA DE CLASSE II EN SE BASANT SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR LABSCREEN	43
FIGURE 8 : VALIDATION DE LA VALEUR SEUIL BCR POUR LES ANTICORPS ANTI-HLA DE CLASSE II EN SE BASANT SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR LABSCREEN.....	44
FIGURE 9 : VALIDATION DE LA VALEUR SEUIL BCM POUR LES ANTICORPS ANTI-HLA DE CLASSE II EN SE BASANT SUR LES RESULTATS OBTENUS PAR LABSCREEN.....	45
FIGURE 10 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON POUR L'ENSEMBLE DE LA COHORTE DE 176 PATIENTS GREFFES ENTRE 1994 ET 2006.....	49
FIGURE 11 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON NON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LE GROUPE SANS ANTI-HLA ET LE GROUPE AVEC ANTI-HLA NON-DSA	50
FIGURE 12 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LES GROUPE SANS ANTICORPS, AVEC ANTI-HLA NON DSA, ET AVEC DSA	52
FIGURE 13 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LE GROUPE TEMOIN ET LE GROUPE AVEC DSA CONTRE HLA CLASSE I.....	53
FIGURE 14 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON NON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LE GROUPE TEMOIN ET LE GROUPE AVEC DSA CONTRE HLA CLASSE II	55
FIGURE 15 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON NON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LES PATIENTS AVEC 1 DSA ET LES PATIENTS AVEC 2 DSA OU PLUS.....	56
FIGURE 16 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON NON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LES PATIENTS AVEC DSA CONTRE UNE SEULE CLASSE ET LE GROUPE AVEC DSA DIRIGE CONTRE LES CLASSES I ET II	57
FIGURE 17 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON NON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LES DSA DOMINANTS DES DIFFERENTS LOCI	58
FIGURE 18 : PROBABILITE DE SURVIE DU GREFFON NON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE ENTRE LE NOMBRE DE <i>MISMATCH</i> A-B-DR	59
FIGURE 19 : POURCENTAGE DE SURVIE DU GREFFON NON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT ENTRE LES HOMMES ET LES FEMMES TRANSPLANTES	60

FIGURE 20: LA SURVIE DU GREFFON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTE EN FONCTION DU TYPE DE REJET	62
FIGURE 21 : POURCENTAGE DE SURVIE DU GREFFON NON SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENT ENTRE LES DIFFERENTS TYPES DE DONNEURS	63
FIGURE 22: TEMPS MOYENS (MINUTES) D'ISCHEMIE SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTS ENTRE LES PATIENTS AYANT REÇU UN GREFFON DE DONNEUR VIVANT ET CEUX AYANT REÇU UN GREFFON DE DONNEUR CADAVERIQUE .	64
FIGURE 23: TEMPS MOYENS (MINUTES) D'ISCHEMIE SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTS ENTRE LES PATIENTS QUI AVAIENT UN GREFFON FONCTIONNEL AU 31 DECEMBRE 2015 ET CEUX L'AYANT PERDU POUR LES PATIENTS AYANT REÇU UN GREFFON D'ORIGINE CADAVERIQUE	65

5 LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ACH. Acide arachidonique
AHG. Anticorps anti-immunoglobuline humaine
AMR. Rejet humoral (*antibody-mediated rejection*)
APC. Cellules présentatrices d'antigènes (*antigen-presenting cells*)

C

CMF. Test de compatibilité croisée par cytométrie en flux (*flow crossmatch*)
CMH. Complexe majeur d'histocompatibilité

D

DAMP. Motifs moléculaires associés aux dommages (*damage-associated molecular pattern*)
DSA. Anticorps spécifiques contre les antigènes HLA du donneur (*donor specific antibody*)

E

EBV. Virus Epstein-Barr (*Epstein-barr virus*)
ELISA. Dosage immuno-enzymatique sur support solide (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

F

Fc. Fragment cristallisable
FKBP. Protéine de liaison FK (*FK Binding Protein*)

G

GM-CSF. Facteur de croissance de colonies de granulocytes et de macrophages. (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

H

HLA. Antigènes leucocytaires Humain (*human leukocyte antigens*)

I

IgG. Immunoglobulines de type G
IL-2. Interleukine 2
IMPDH. Iosine monophosphate déshydrogénase

M

MAC. Complexe d'attaque membranaire (*membrane attack complex*)
mTOR. Cible de la rapamycine chez les mammifères (*mammalian Target Of Rapamycin*)

N

NFAT. Facteur nucléaire des cellules T activées (*Nuclear factor of activated T-cells*)
NK. Cellule tueuse naturelle (*Natural killer cell*)

O

OATP-C. Anion organique transporteur du polypeptide C (*organic anion transporter of polypeptide C*)

P

PAMPs. Molécules largement répandues et associées aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*)
PCR. Réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)
PRR. Récepteurs de reconnaissance de motifs (*pattern recognition receptor*)
PTLD. Syndrome lymphoprolifératif post transplantation (*Post-transplant lymphoproliferative disorder*)

T

Tc. Lymphocyte T (*T cell*)

TCR. Récepteur des lymphocytes (*t-cell receptor*)

TGF- β . Facteur de croissance tumorale bêta (*tumor growth factor beta*)

TGN. Nucléotides thio-guanine(*Thioguanine nucleotide*)

TNF- α . Facteur de nécrose tumorale alpha (*tumor necrosis factor alpha*)

6 REVUE DE LITTÉRATURE - SYSTÈME IMMUNITAIRE ET TRANSPLANTATION

De nombreux facteurs ont contribué au succès de la transplantation rénale. De la première transplantation rénale effectuée en 1953 par Jean Hamburger à Paris [1] à l'identification du complexe majeur d'histocompatibilité en 1958 par Jean Dausset [2] en passant par le développement de la pharmacopée immunosuppressive [3], les objectifs ont toujours été les mêmes. Ils sont de prolonger et d'améliorer la vie des patients en même temps que d'allonger la durée de vie de leurs greffons tout en minimisant les effets secondaires associés aux immunosuppresseurs. Malgré ses limites, la transplantation représente donc un traitement de choix à l'insuffisance rénale [4]. L'insuffisance rénale, d'étiologie diverse, mais en constante augmentation dans la population, requiert que le patient soit placé sous dialyse, un traitement coûteux et limitant la qualité de vie du patient [5]. Selon une étude de la Fondation canadienne du rein en 2012, une transplantation, en comparaison avec le maintien d'un seul patient sous dialyse, permettrait à la société d'économiser environ 250 000 \$ sur cinq ans [4]. Malheureusement, la disponibilité des organes provenant de donneurs cadavériques est insuffisante comparée à l'augmentation des besoins [6]. L'attribution des organes au Québec est effectuée selon un algorithme considérant plusieurs éléments de façon à optimiser le succès de la transplantation [5, 6], parmi ceux-ci, la compatibilité immunologique entre le donneur et le patient en attente de greffe [6]. Cette dernière est définie, entre autres, par l'absence chez le patient d'anticorps spécifiques contre les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité du donneur (*donor specific antibody*), DSA. La présence de DSA prégreffe est associée au rejet hyperaigu survenant de quelques heures à quelques jours post-transplantation [7, 8]. De même, la présence de DSA prégreffe est également un facteur limitant la survie du greffon à court et moyen termes [7, 9-18]. Ces anticorps anti-HLA peuvent se développer suite à une exposition à des antigènes HLA du non-soi, conséquence de transfusions sanguines, de transplantations antérieures ou de grossesses [7, 19, 20]. Lorsque l'un de ces anticorps est dirigé contre un antigène HLA présent chez un donneur potentiel, la greffe doit préférentiellement être éludée afin de protéger le patient des conséquences d'un rejet

précoce ainsi que pour éviter la perte d'un organe qui pourrait être adéquat pour un autre receveur sur la liste d'attente. Cependant, les anticorps anti-HLA d'un receveur potentiel doivent être parfaitement identifiés afin de ne pas causer de préjudices inutiles en diminuant les opportunités de transplantation de ces patients dont un ou des anticorps anti-HLA ont été ajoutés à tort sur une liste d'inacceptables [21].

6.1 Système immunitaire inné

Le système immunitaire dispose de la lourde responsabilité de nous défendre contre une myriade d'agresseurs potentiels de tailles et d'origines très diversifiées. Il possède un ensemble de mécanismes moléculaires et cellulaires de première ligne, mais également des instruments biologiques de réponses spécialisées ainsi qu'une mémoire immunologique permettant une réponse rapide en cas de réexposition. Pendant longtemps, les scientifiques se sont creusés les méninges pour expliquer les réponses immunologiques. C'est par la tolérance centrale des molécules du soi que la reconnaissance des molécules du non-soi par les thymocytes est possible. Avant les années 1960, la transplantation d'organe restait marginale, les tentatives de greffes échouaient, le corps rejetait l'organe.

La plupart des organismes vivants ont développé des mécanismes biologiques pour lutter contre les bactéries, les virus ou les parasites. La première ligne de défense contre les agents infectieux est composée des barrières physiques : la peau et les muqueuses. Une fois ces barrières franchies, c'est au tour des cellules du système immunitaire inné d'identifier et d'éliminer la menace potentielle [22]. Les granulocytes et les monocytes, cellules du système immunitaire inné, sont pourvus de récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs). Parmi les différents PRR, notons la famille des *Toll like receptors* (TLR) présents chez l'ensemble des cellules. Ces récepteurs sont spécifiques pour une panoplie de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), mais non retrouvés chez l'espèce hôte [23]. L'activation d'un PRR par un PAMP enclenche la réponse immunitaire par l'activation de gènes codant pour des médiateurs de l'inflammation. Les chimiokines sont entre autres responsables du

recrutement des cellules immunitaires au site d'activation tandis que des cytokines contribuent à l'activation de ces cellules [22]. Une description plus détaillée du rôle des cytokines et de leurs effets se retrouve dans le tableau 1. Ces médiateurs chimiques permettant l'activation et la régulation de la réponse immunitaire peuvent servir de cible thérapeutique dans la transplantation d'organe. La production de ces médiateurs a également comme conséquence d'augmenter la perméabilité vasculaire dans la région atteinte et ainsi accroître l'afflux sanguin aux sites d'inflammation. L'augmentation de l'apport sanguin combinée aux médiateurs d'attractions permet à de nombreux neutrophiles et granulocytes de rejoindre le site, provoquant rougeur et enflure. De même, certains médiateurs pyrogéniques feront augmenter la température corporelle, aidant le corps à se débarrasser de ces pathogènes [22].

Tableau 1 : Résumé des cibles et effets de certaines cytokines¹

<i>Cytokines</i>	<i>Sources</i>	<i>Cibles</i>	<i>Effets</i>
IL-1(IL-1 α et - β)	Macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales, autres cellules	Cellules Th et B et autres	Activation
IL-2	Cellules Th1	Cellules Th, Tc et NK	Activation et prolifération
IL-3	Cellules Th, Tc et NK	Cellules hématopoïétiques et mastocytes	Prolifération et différenciation des cellules progénitrices
IL-4	Cellules Th2, mastocytes, NK	Lymphocytes B et T, mastocytes, macrophages	Prolifération, commutation isotypique, induction de l'expression des CMH de classe II
IL-5	Cellules Th2, mastocytes	Éosinophiles	Prolifération et différenciation
IL-6	Macrophages, Cellules Th2	Cellules plasmatiques, lymphocytes B	Différenciation et sécrétion d'anticorps
IL-8	Moelle osseuse, thymus	Neutrophiles	Chimiotaxie
IL-9	Cellules Th2	Cellules Th, mastocytes, éosinophiles	Induit la réponse inflammatoire

¹ Adaptation libre du tableau *Types of cytokines* du site web <https://www.sinobiological.com/Types-of-cytokines.html>.

IL-10	Cellules Th2	Macrophages, APC	Anti-inflammatoire
IL-11	Moelle osseuse	Progéniteurs de lymphocytes B	Différenciation
IL-12	Macrophages, lymphocytes B	Cellules Tc, NK	Prolifération et différenciation en synergie avec IL-2
IL-13	Cellules Th	Macrophages, lymphocytes B	Inhibition des cytokines proinflammatoires
IL-16	Lymphocytes	Cellules Th	Chimiotaxie
IL-18	Cellules hématopoïétiques et cellules non hématopoïétiques	Cellules T, NK	Pro inflammatoire; facteur induisant l'IFN- γ
IFN- α	Leucocytes		Inhibition de la réplication virale
IFN- β	Fibroblastes		Inhibition de la réplication virale
IFN- γ	Cellules Th1, Tc, NK	Plusieurs cellules dont macrophages	Inhibition de la réplication virale, inhibition de la prolifération cellulaire, inhibition du changement de classe d'isotype
TNF- α	Macrophages	Cellules tumorales, polymorphonucléaires, leucocytes, macrophages	Cytotoxique, induit la sécrétion de cytokine
TNF- β	Cellules T	Cellules tumorales, neutrophiles, macrophages	Cytotoxique, favorise la phagocytose

Les cellules du système immunitaire inné agissent comme sentinelles et sont les médiateurs de la réponse adaptative via les cellules présentatrices d'antigènes (APC) [22-27].

6.1.1 Rôle dans la transplantation

Le système immunitaire inné joue d'autres rôles que la présentation des antigènes dans la transplantation. Les cellules du système immunitaire inné comme les granulocytes, les macrophages et les cellules dendritiques sont les premiers répondants

aux signaux envoyés par l'organe transplanté. Lors de la transplantation, des cellules de l'organe du donneur sont endommagées (trauma, ischémie, reperfusion, etc.) [28, 29]. Ces dommages libèrent dans le milieu extracellulaire des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP)[29]. Ceux-ci sont reconnus par les PRR des cellules du milieu environnant et mènent à la production et l'activation de molécules de la cascade du complément. Les molécules de la cascade du complément peuvent également pousser les cellules endothéliales vasculaires à s'activer et à produire des médiateurs de l'inflammation, tel le TGF- β , l'IL-6 et l'IL-8. La production de cytokines et chimiokines attire neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes au site. Elles favorisent également la diapédèse et permettent l'infiltration de cellules immunitaires dans l'espace interstitiel [10, 27]. Les DAMP vont également servir à activer les cellules dendritiques naïves en cellules dendritiques effectrices via l'expression élevée de co-récepteurs B7 contribuant à l'activation des lymphocytes T naïfs [23-27, 29]. Les DAMPs joueront également un rôle dans l'activation de fibroblastes et de pericytes contribuant à une fibrose cellulaire menant à la perte de fonctions du greffon [9]. Les cellules NK possèdent des ligands permettant la reconnaissance des fragments Fc des IgG et sont capables, suivant cette liaison, d'activer la cascade du complément. L'endocytose par les macrophages M1 suivant l'apoptose des neutrophiles contribue à diminuer l'inflammation par le changement de phénotypes des macrophages [25]. Il est important de préciser que l'implication du système immunitaire inné dans la transplantation n'est pas qu'à court terme après la transplantation. Tout dommage à l'organe transplanté mènera à une réponse semblable [29].

6.2 Système immunitaire adaptatif

6.2.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité

C'est en 1958 que Jean Dausset, un immunologiste français, découvre les gènes codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité, appelé HLA (*human leukocyte antigens*). Le système HLA est situé sur le chromosome 6 comprenant l'ensemble des

gènes codant les antigènes des classes du complexe majeur d'histocompatibilité, le CMH de classe I, divisé en loci A, B et C, et le CMH de classe II, divisé principalement en loci DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA, DQB, DPA et DPB. La polygénie, le polymorphisme ainsi que la codominance de ces gènes font de tous les individus, à l'exception des jumeaux homozygotes, des êtres uniques d'un point de vue immunologique. Il s'agit de l'ensemble de gènes le plus polymorphe chez l'espèce humaine. Le tableau 2 dénombre le nombre d'allèles inventoriés par classe. Les deux allèles des gènes maternels et paternels s'expriment en codominance. Le complexe majeur d'histocompatibilité est divisé en trois classes [30].

Tableau 2: Polymorphisme des gènes HLA²

Numbers of HLA Alleles	
HLA Class I Alleles	17,191
HLA Class II Alleles	6,716
HLA Alleles	23,907
Other non-HLA Alleles	186

Les molécules HLA de classe I, comprenant les antigènes A, B et C, sont présentes sur toutes les cellules nucléées. Elles sont composées d'une chaîne α à trois domaines et d'une sous-unité, la β 2-microglobuline, non polymorphe. Les domaines α 1 et α 2 forment la niche peptidique. Il s'agit d'une cavité permettant la liaison stable d'un peptide de 8 à 10 acides aminés. Le peptide est principalement lié à la molécule de classe I par ses extrémités, nommé résidus d'ancrage. Ces résidus d'ancrage vont varier selon l'allèle et le locus, permettant à une grande variété d'antigènes de se lier et d'être exportés à la surface cellulaire. Les CMH de classe I présentent normalement les antigènes intracellulaires, mais, dans des cas particuliers, chez des APC, il est possible par transport rétrograde que le CMH de classe I présente des antigènes extracellulaires. Les molécules HLA de classe I induisent généralement une réponse par les lymphocytes

² Extrait du site internet : <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>. Consulté le 12 sept 2019.

T CD8. Le CMH de classe I agit également comme inhibiteur de l'activation des cellules NK. En absence de CMH de classe I, les cellules NK provoqueront l'apoptose de cette cellule nucléée [22].

Les molécules HLA de classe II, comprenant les antigènes DR, DQ et DP, sont présentes sur les APC ainsi que sur des cellules épithéliales et endothéliales en milieu inflammatoire. Elles sont composées d'une chaîne α à deux domaines et d'une chaîne β également à deux domaines. Ces chaînes forment un hétérodimère lié de façon non covalente. Les chaînes alpha et bêta sont également polymorphes. Les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment la niche peptidique. Cette cavité n'étant pas fermée à ses extrémités, la longueur des peptides pouvant s'y lier n'est théoriquement pas limitée. Par contre, les peptidases présentes dans le milieu vont cliver les extrémités pour laisser un peptide d'entre 13 à 17 acides aminés. Les résidus d'ancrages sont moins limités, l'approche consensuelle les définit comme ceci : notons en position 1 : un acide aminé hydrophobe, en position 4 : un acide aminé chargé négativement et en position 9 : un autre acide aminé hydrophobe. Les molécules HLA de classe II présentent des antigènes issus de l'espace extracellulaire et apprêtés dans l'endolysosome des APC. Les molécules HLA de classe II induisent une réponse par les lymphocytes T CD4 [31, 32].

Les gènes de la classe III du complexe majeur d'histocompatibilité codent essentiellement pour quelques protéines de la cascade du complément. Ces gènes sont peu polymorphes et, à ce jour, ils ne semblent pas jouer de rôle majeur dans la transplantation [1].

La nomenclature moléculaire des gènes codant le HLA suit la logique suivante : le locus du gène associé est d'abord indiqué, suivi d'un astérisque (HLA-A*). L'allèle codant pour une protéine distincte est ensuite identifié par un minimum de 2 et un maximum de 4 champs distincts, séparés par deux points et ayant chacun une signification précise. Le premier champ correspond au groupe sérologique de l'allèle (HLA-A*02). Le deuxième champ indique la spécificité de la protéine exprimée (HLA-A*02:01). Le troisième champ réfère aux différents allèles présentant des mutations silencieuses dans la région

codante (HLA-A*02:01:01). Finalement, le quatrième champ est utilisé pour identifier des différences dans la région non codante (HLA-A*02:01:01:02), ainsi que des variants dont l'expression est anormale (HLA-A*02:01:01:02N) [33, 34].

Le polygénisme et l'expression en codominance de même que la grande diversité allélique des CMH dans la population rendent chaque individu pratiquement unique. La sélection thymique des cellules T et la tolérance centrale des cellules B mènent à la tolérance spécifique de tout peptide du soi et donc de leurs propres HLA. En héritant d'un chromosome 6 de chacun des parents, seuls les jumeaux monozygotes sont immunologiquement identiques. La polygénie et le polymorphisme des gènes HLA rendent la diversité théoriquement infinie, mais un phénomène la limite : le déséquilibre de liaison. Celui-ci est défini par une conservation préférentielle de deux gènes à travers les générations qui ne peut être expliquée par le hasard. L'association entre ces deux gènes s'explique en partie par la proximité de ces deux gènes sur un même chromosome et la probabilité plus faible d'une recombinaison entre ces deux gènes [33].

6.2.2 Développement thymique

Issus de la moelle osseuse, les précurseurs des lymphocytes T doivent passer par plusieurs étapes avant d'entrer dans la circulation systémique. En effet, il est primordial qu'ils possèdent à leur entrée des fonctions effectrices spécifiques à un antigène du non-soi. Il est possible d'arriver à ce résultat grâce aux capacités de réarrangement des gènes codant pour les récepteurs des thymocytes. Le TCR est composé d'une chaîne bêta (structure de segments VDJC) et d'une chaîne alpha (VJC) permettant plusieurs tentatives d'assemblages de TCR fonctionnels. L'enzyme *terminal desoxynucleotidyl transferase* (TdT) ajoute aléatoirement des nucléotides aux jonctions des segments V-J et V-D-J contribuant grandement à la diversité des récepteurs de cellules T. Les cellules épithéliales du cortex thymique expriment les CMH de classe I et II, permettant la sélection positive des thymocytes. Par la suite, il y a sélection négative ; la reconnaissance spécifique par le TCR d'un complexe constitué d'un peptide du soi et d'un CMH du soi entraîne l'apoptose de ces thymocytes immatures autoréactifs. Les

lymphocytes T naïfs vont ensuite se retrouver dans la circulation systémique et préférentiellement dans la rate et dans les ganglions lymphatiques suite à l'attraction par des chimiokines [22, 34-36].

6.2.3 La présentation d'antigène

Les cellules dendritiques, issues de la lignée myéloïde, forment une population hétérogène responsable de la surveillance de la présence de pathogènes par la capture via le PRR, la dégradation dans le lysosome par des enzymes protéolytiques ainsi que dans le transport des molécules présentatrices d'antigène à la surface cellulaire menant à la présentation des antigènes aux cellules du système immunitaire adaptatif [22, 27]. Bien que d'autres types cellulaires puissent jouer le rôle d'APC (macrophages, lymphocytes B), les cellules dendritiques sont celles qui favorisent la meilleure réponse à l'antigène présenté [22, 26, 34].

La présentation d'antigène peut se faire par trois voies. La première, la voie endogène dégrade des protéines intracellulaires via le protéasome et présente les antigènes à la surface par des CMH de classe I. La voie exogène présente les molécules du milieu extra cellulaire via le CMH de classe II. La voie croisée présente des molécules d'origine exogène, mais par le CMH de classe I. Dans le cadre de la transplantation, c'est la présence de CMH allogénique indépendamment de l'antigène présenté qui provoque le rejet. Bien que jouant un rôle marginal dans la physiologie menant au rejet, les antigènes exogènes des cellules du donneur présenteront éventuellement des antigènes issus de la dégradation de ses CMH aux cellules lymphocytaires du receveur, menant à l'activation de la réponse adaptative et, en absence de traitement, au rejet cellulaire. La deuxième voie est exogène et limitée aux APC [34]. L'endocytose de molécules solubles par les APC mène à la présentation d'antigène via des CMH de classe II. Dans le cadre de la transplantation, des CMH (solubles, sur exosome, sur débris cellulaires ou intacts sur des cellules du donneur) peuvent être présentés via les CMH de classe II et mener à la réponse humorale. De même, la présentation croisée peut se faire chez les APC [34]. Il s'agit de fragments cellulaires libérés dans la circulation suite à la nécrose cellulaire,

entre autres. Ces débris sont endocytés, mais la présentation de certains antigènes s'effectue via le CMH de classe I. Lors d'une transplantation, de nombreuses cellules de l'organe transplanté sont endommagées, augmentant la prévalence de la présentation croisée [34].

Les molécules d'adhésions cellulaires sont un système redondant qui est présent à la surface des APC. Il permet de stabiliser une liaison (APC)CMH-Tc de faible affinité. Si le TCR reconnaît un antigène présenté par le CMH auquel il est restreint, il s'y lie de façon stable. Il s'agit du premier signal. La maturation de cellules T naïves en cellules T activées dépend de deux autres signaux, essentiels pour la prolifération clonale. Les molécules de costimulation envoient un signal de survie, ce qui promeut l'activation de gènes codant entre autres pour IL-2 et BCL-2, favorisant ainsi la survie et la prolifération des lymphocytes T. La présence de cytokines pro-inflammatoires dans le milieu permet la prolifération cellulaire des cellules T activées en cellules T effectrices. Les cellules T naïves CD8 nécessitent une concentration élevée de molécules de costimulation pour être activées [22, 34-36].

6.2.4 Réponse cellulaire

Les Tc CD8+ effectrices sécrètent une combinaison de perforine/granzyme sur toutes les cellules exprimant l'antigène spécifique présenté par le CMH de classe I et ce, même en l'absence de molécule costimulatrice. L'activité granzyme perforine force la cellule ciblée à entrer en apoptose. En transplantation, un rejet médié par les lymphocytes T est causé par la reconnaissance directe des HLA de classe I à la surface des cellules épithéliales. Ce type de rejet est caractérisé par une infiltration de lymphocytes T activés ainsi que de macrophages dans l'espace interstitiel. Des lymphocytes T infiltrés, seule une minorité est spécifique de l'antigène. Une grande libération d'IFN- γ dans le milieu active les cellules épithéliales vasculaires qui surexprimeront les CMH de classe I et exprimeront les CMH de classe II. Cette réponse augmente la susceptibilité à l'alloreconnaissance [22, 34].

Les T CD4⁺ se lient au CMH de classe II sur les APC. Les différentes cytokines sécrétées par les cellules du système immunitaire inné moduleront leurs différenciations en cellules T CD4⁺ effectrices selon le type de cytokines de leur troisième signal de survie. [27, 34].

En présence d'IFN- γ et d'IL-12, ils deviennent des CD4-Th1. Ces CD4-Th1 produisent de l'IL-2 et de l'IFN- γ , contribuant à activer les cellules du système immunitaire inné, tels les macrophages, et contribuent à la sécrétion de chimiokine d'attraction. En transplantation, ils augmentent le rejet par la réponse cellulaire [22].

En présence d'IL-4, ils deviennent des CD4-Th2. Ces CD4-Th2 sécréteront de l'IL-4, qui contribue à activer les lymphocytes B, et favoriseront un développement d'anticorps spécifiques. En transplantation, l'activation préalable de Th2 spécifiques aux peptides d'un antigène HLA allogénique auquel le receveur est exposé (grossesse, transfusion ou greffe préalable) favorisera la production d'anticorps spécifiques contre ces HLA [34].

En présence d'IL-6 et de TGF- β , mais en l'absence d'IL-4 et d'IL12, ils deviennent des CD4-Th17. Ces CD4-Th17 produisent de l'IL-17, favorisant le recrutement de neutrophiles [22, 27].

6.3 Réponse humorale

6.3.1 Développement des lymphocytes B

Les lymphocytes B sont issus des progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse. À partir d'un précurseur lymphoïde, les chaînes lourdes d'immunoglobuline μ se réarrangent et sont co-exprimées avec les chaînes de substitution légère, pour devenir une cellule Pro-B précoce. Si le réarrangement initial est inefficace, l'autre chromosome

servira. Si ce dernier est également non efficace, la cellule Pro-B entrera en apoptose. Lors d'une recombinaison réussie des segments V-DJ (Pro-B tardif), le réarrangement de la chaîne lourde de l'autre chromosome s'arrête. Il s'agit de l'exclusion allélique. Lors du réarrangement DJ et V-DJ, l'enzyme *terminal desoxynucleotidyl transferase* (TdT) ajoute aléatoirement des nucléotides aux jonctions contribuant grandement à la diversité des récepteurs de cellules B. La cellule entre au stage Pre-B et, à ce stade, la chaîne lourde μ se lie à la chaîne de substitution légère et forme le Pre-BCR (*B-cell receptor*) à la surface cellulaire. Ensuite, les gènes de la chaîne légère des Ig se réarrangent au niveau des segments VJ pour se lier à une chaîne μ et produire un IgM. À ce stade, la cellule se nomme lymphocyte B immature. Ces cellules sont exposées via leurs récepteurs de cellules B aux molécules du soi environnantes. Les cellules non réactives mûrissent et peuvent quitter la moelle osseuse et rejoindre la circulation sanguine. Cette sélection se nomme tolérance centrale. Les cellules autoréactives peuvent tenter de réarranger les gènes de la chaîne alpha pour modifier la spécificité ou l'avidité de leur récepteur. Les cellules autoréactives seront éliminées. Les lymphocytes B naïfs rejoignent la circulation et se retrouvent principalement dans les ganglions lymphatiques suite à l'attraction [1, 3-5].

6.3.2 Activation des lymphocytes B

L'activation des lymphocytes B naïfs peut se faire de deux façons. La première est indépendante du thymus (TI). Il s'agit principalement d'une activation par des débris microbiens reconnus par le récepteur des cellules B et reconnus également par des PAMPs à la surface cellulaire. Il est aussi possible pour les lymphocytes B TI d'être activés lorsque plusieurs récepteurs sont activés par liaison croisée provoquée par un épitope microbien répétitif.

L'activation des lymphocytes B par la voie dépendante du thymus requiert la présence de cellules T CD4⁺ activées reconnaissant le même antigène. Cette liaison se fait principalement à la bordure des zones des cellules B et des zones des cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires. La liaison est alors stabilisée par LFA-1 et

ICAM-1. La synapse immunologique se forme. Elle comprend les trois signaux d'activations TcR-BcR, CD40L-CD40 et IL4-IL4R respectivement. Ces signaux activent le lymphocyte B qui se met à se diviser en plasmablastes et en lymphocytes B mémoires. Les plasmablastes secrètent initialement des IgM. Lorsqu'ils changent de classe sous l'effet des molécules de costimulation et de cytokines, ils se divisent tout en sécrétant des IgG. Des mutations somatiques se produisent aléatoirement dans la région V des IgG lors de la division des lymphocytes B. Les plasmablastes ayant une meilleure affinité pour l'antigène sont conservés et se multiplieront à leur tour. La compétition pour l'antigène augmente l'affinité des anticorps produits. Lorsque le plasmablaste perd sa capacité à se diviser ainsi qu'à exprimer le CMH de classe II, il devient un plasmocyte. Les plasmocytes produisent massivement des anticorps IgG (ou autres isotypes) ayant une grande affinité pour l'antigène. Ils peuvent rester dans les organes lymphoïdes, où leur demi-vie sera réduite, ou retourner dans la circulation systémique, préférentiellement la moelle osseuse. À chaque stade du développement des plasmablastes et des plasmocytes, des cellules mémoires sont produites et conservées. Cette mémoire immunologique rend possible une réponse rapide ultérieure face à une nouvelle exposition à l'antigène en question.

6.3.3 Rôles des anticorps

Les différentes classes d'immunoglobulines ont différents rôles et une distribution aux sites physiologiques propres à chacun de ces rôles [22]. Le tableau 3 résume leurs différences. L'activité immunologique des anticorps se distingue en plusieurs rôles : l'opsonisation, la neutralisation, l'activation des mastocytes, l'activation de la cascade du complément et le recrutement de monocytes, l'activation des cellules NK via leur fragment Fc ainsi que l'activation des cellules endothéliales par liaison des anticorps aux CMH de classe II. La figure 1 schématise le rôle des DSA dans la transplantation [22].

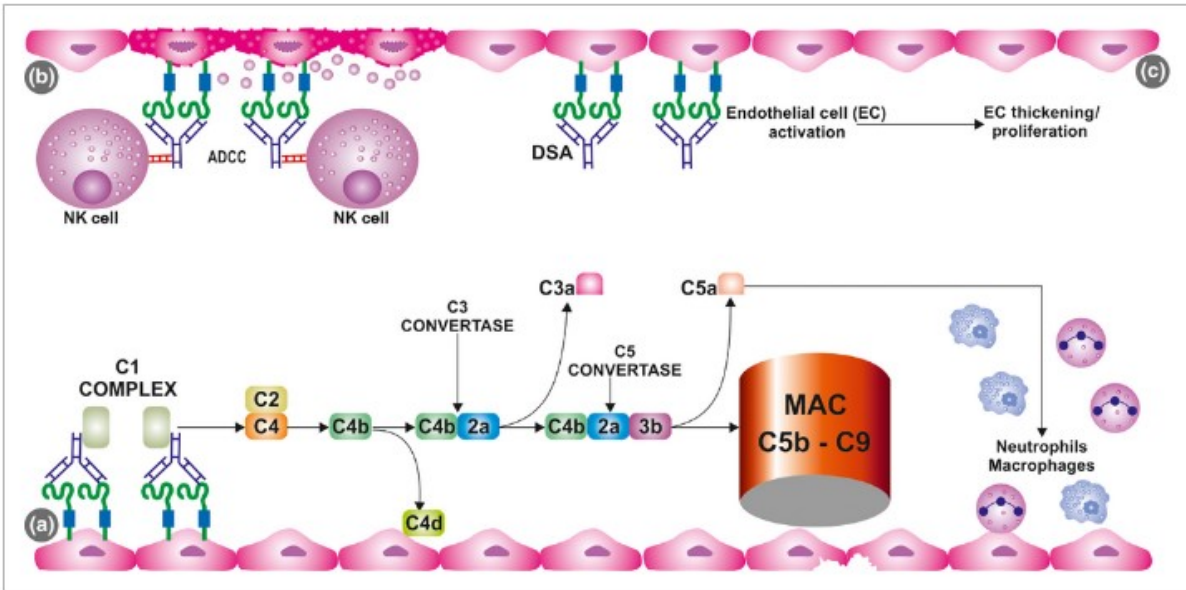


Figure 1 : Physiologie des dommages causés par les DSA³

L'opsonisation permet aux monocytes d'internaliser des bactéries pathogènes ou des fragments de particules étrangères. Les anticorps se lient à la surface du pathogène ou du fragment pour lequel ils sont spécifiques. Les récepteurs Fc à la surface des monocytes reconnaissent les fragments constants des anticorps et activent l'endocytose menant à leur internalisation [22].

La neutralisation est l'effet d'empêcher la liaison de molécules potentiellement dangereuses à leurs cellules cibles. Certaines bactéries relâchent des toxines qui ont un effet délétère sur le milieu environnant. La liaison anticorps/toxines empêche la liaison de la toxine à un récepteur cellulaire. De la même façon, des anticorps spécifiques aux protéines virales de surface peuvent empêcher l'internalisation de ces virus en se liant [22].

L'activation de la cascade du complément peut se faire de trois façons : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. Dans le cas des anticorps, c'est principalement la voie classique qui est empruntée. Tel que vu à la figure 1, le complexe

³ Figure 1 : 37. Mehra, N.K. and A.K. Baranwal, *Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation*. Int J Immunogenet, 2016. 43(6): p. 351-368.

C1q se lie sur le fragment constant de deux anticorps physiquement rapproché. Une cascade s'ensuit, menant au dépôt de C4b à la surface de l'endothélium et à la formation du complexe d'attaque membranaire. Le complexe d'attaque membranaire forme un pore à travers la cellule menant à l'apoptose de celle-ci. Également, des sous-produits de la cascade du complément ne prenant pas part à la formation du MAC, entre autres les anaphylatoxines C3a et C5a, agissent comme chimiokine pour les monocytes. En transplantation, un dépôt de C4d est associé à un rejet causé par des anticorps [18, 23].

Tableau 3 : Fonctions et propriétés biologiques des différentes classes et sous-classe d'anticorps⁴

	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralisation	+	-	++	++	++	++	++	-
Opsonisation	+	-	+++	-	++	+	+	-
ADCC	-	-	++	-	++	-	-	-
Allergie	-	-	+	-	+	-	-	+++
MAC	++	-	++	+	+++	-	+	-
Traverse épithélium	+	-	-	-	-	-	+++	-
Traverse barrière placentaire	-	-	+++	+	++	+/-	-	-
Diffusion extravasculaire	+/-	-	+++	+++	+++	+++	++	+

⁴ Adaptation libre de la figure 9.19 de *Janeway's Immunobiology*. Page 401. 22. Murphy, *Janeway's Immunobiology*, ed. 7. Vol. 7. 2008. 887.

7 DIAGNOSTIC ET PRÉVENTION DU REJET

7.1 Les critères de Banff

Les critères de Banff sont une nomenclature pour le diagnostic par biopsie du rejet rénal. Suivant une réunion tenue en 1993 dans la ville de Banff au Canada, les premiers outils de mesures de diagnostic ont été établis par les participants de cette réunion. Inspirés par la nomenclature du rejet cardiaque, ces critères visaient à uniformiser les standards pour le diagnostic. Les critères de 1993 ont fait l'objet de nombreuses révisions et adaptations depuis. On distingue présentement six classements des formes du rejet. L'évaluation repose sur la région rénale atteinte ainsi que sur l'intensité de la réaction [38-40].

1. Biopsie normale, aucun rejet
2. Rejet causé par les anticorps
3. Rejet limite, suspicion plus ou moins forte d'un rejet cellulaire
4. Rejet cellulaire
5. Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire, étiologie inconnue
6. Autre cause (par exemple, toxicité médicamenteuse)

Le diagnostic du rejet permet à l'équipe de médecins traitants de cibler le bon moyen de lutter contre le rejet. Par exemple, le traitement pour un rejet cellulaire est l'augmentation de la médication immunosuppressive. Ce traitement, dans le cas d'un rejet associé à une toxicité médicamenteuse, aura pour conséquence d'amplifier le problème.

7.2 La pharmacopée immunosuppressive

De nombreux agents immunosuppressifs se sont succédé avec les années, augmentant la durée de vie des greffons [41] et des greffés. Un protocole

immunosuppresseur fiable avec des contrôles fréquents d'évaluation de niveaux circulants est nécessaire pour la tolérance de l'organe transplanté. Toutefois, la majorité de ces agents immunosuppresseurs ont des effets secondaires puissants et puisque le patient devra généralement être sous médication jusqu'à la fin de sa vie, les dosages doivent être optimisés.

7.2.1 Inhibiteurs de calcineurine

Le tacrolimus ou FK506 est une lactone macrocyclique hydrophobe. Il fut découvert en 1987 par une équipe de chercheurs japonais durant l'étude de l'actinomycète *Streptomyces tsukubaensis* [42].

La cyclosporine est un polypeptide cyclique isolé en 1971 du champignon *Tolypocladium inflatum*. Il fut approuvé en 1983 comme molécule pharmacologique immunosuppressive [34].

La calcineurine est une phosphatase ayant pour cible le facteur de transcription NFAT. Le tacrolimus est un inhibiteur de la calcineurine plus efficace que la cyclosporine à la même dose [43]. Il apparaît de 10 à 100 fois supérieur pour bloquer la synthèse d'IL-2 que la cyclosporine [44].

La structure cyclique du tacrolimus comprend 23 éléments ; la cyclosporine est, quant à elle, composée de 11 acides aminés. Leurs états lipophiles leur permettent de se retrouver dans le cytosol des lymphocytes T et ainsi bloquer leur prolifération [43-45]. Le mode d'action immunosuppresseur du tacrolimus s'exerce lorsque ce dernier se lie à une immunophiline, la FKBP [43]. L'action de la cyclosporine s'exerce par liaison à la cyclophiline A [43]. Ces liaisons respectives favorisent alors la liaison de leur immunophiline à un complexe comprenant entre autres la calmoduline et la calcineurine. C'est l'action de ce complexe qui inhibe l'activité phosphatase de la calcineurine [45]. Comme le transport des facteurs nucléaires des cellules T activées (NFATc) dépend de leur état de phosphorylation, l'inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine

empêche la migration de NFATc à travers la membrane nucléaire. Il en résulte que NFATc ne peut aller se lier aux facteurs de transcription AP-1. Comme le complexe NFATc:AP1 est responsable de l'activation de la transcription de gènes requis pour l'activation des lymphocytes T (dont l'interleukine 2, le ligand de CD40 et le ligand de Fas, FasL), l'inhibition de l'activité phosphatase de la calcineurine par le tacrolimus ou la cyclosporine empêche la prolifération cellulaire et bloque les fonctions effectrices des cellules T. Ce mode d'action est schématisé à la figure 2. Plus spécifiquement chez le lymphocyte T, le tacrolimus ou la cyclosporine réduisent l'expression d'IL-2 ainsi que de l'IL-3, l'IL-4, le GM-CSF et du TNF- α . Ils réduisent également la prolifération cellulaire des lymphocytes T et inhibent l'apoptose induite par l'antigène [22]. Indirectement, les inhibiteurs de la calcineurine agissent également sur les lymphocytes B en diminuant leur prolifération suite à une réduction de la présence de cytokines (normalement produites par les lymphocytes T activés). Comme la calcineurine est présente ailleurs dans plusieurs types cellulaires de l'organisme humain, l'action du tacrolimus et de la cyclosporine s'exerce également dans ces milieux. Ce qui en fait un bon agent immunosuppresseur est en lien avec le faible taux de calcineurine à l'intérieur des lymphocytes T comparativement aux autres cellules contenant de la calcineurine. À faible dose, les inhibiteurs de la calcineurine agissent sur les lymphocytes T sans trop perturber l'activité des autres cellules contenant la calcineurine [22, 34]. Les principaux effets secondaires des inhibiteurs de calcineurine sont énumérés dans le tableau 4.

7.2.2 Inhibiteurs de mTOR

La rapamycine est issue d'une bactérie filamenteuse se retrouvant sur l'île de Pâques, *Streptomyces hygroscopicus*. Elle a été isolée vers la fin des années 70 par des chercheurs montréalais de chez Ayerst [46]. La rapamycine se lie à MTORC1 inhibant la sérine-thréonine kinase mTOR. Cette inhibition empêche la phosphorylation de P70S6K1 et de 4E-BP1, causant l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire des lymphocytes T [43]. Elle diminue également la production d'interféron par les cellules dendritiques. Un des avantages de la rapamycine est son absence de néphrotoxicité [43].

7.2.3 Agents antiprolifératifs

L'azatropine fut l'un des plus importants agents immunosuppresseurs des années 1960 à 1990. L'AZA libère du 6-mercaptopurine. Son métabolite actif, le 6-TGN, s'intègre à l'ADN et l'ARN comme étant une purine, interférant dans le cycle de division cellulaire. Ce mode d'action est illustré à la figure 2. D'autres études ont permis de démontrer que l'un de ses métabolites, le 6-thio-GTP, remplacerait le GTP dans la voie de signalisation de la molécule co-stimulatrice CD28, inhibant ainsi le signal. L'absence de signal de co-stimulation induirait l'apoptose [47]. Cette molécule inhibe également la réplication des lymphocytes B et T activés et réduit le nombre de monocytes en inhibant l'activité des promyélocytes dans la moelle osseuse. Sa forte toxicité et le développement de nouvelles molécules ont rendu son utilisation marginale [34, 43]. Les principaux effets secondaires sont énumérés dans le tableau 4.

L'acide mycophénolique, molécule active du mycophénolate mofetil, agit par blocage de la synthèse *de novo* des purines en inhibant l'activité enzymatique de l'IMPDH (inosine monophosphate déshydrogénase), qui est de catalyser la production de guanosine monophosphate à partir d'inosine monophosphate, également précurseur de l'adénosine monophosphate. La diminution de guanosine monophosphate et l'augmentation d'adénosine monophosphate débalancent le niveau des purines et empêchent la production *de novo* des purines. La réplication s'arrête en phase S1 [34, 43].

7.2.4 Corticostéroïdes

Les glucocorticoïdes ont un effet à la fois sur l'inhibition des facteurs pro-inflammatoires IL-1, IL-2, GM-CSF, INF- γ et TNF- α et l'activation des facteurs anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β . Ils agissent en se liant aux protéines du noyau, activant ou inhibant la transcription des gènes associés [34]. Ils sont principalement utilisés à haute dose dans les premières semaines après la transplantation et sont graduellement

diminués. Certaines équipes de suivi post-transplantation en arrêtent l'administration et d'autres maintiennent une dose faible à vie. Les effets néfastes à long terme de la prise de ces molécules à haute dose dépassent les bénéfiques (déminéralisation, rétention d'eau, enflure, diabète, etc.) [41, 43, 48].

7.2.5 Les anticorps monoclonaux et protéines de fusion

Ce sont des anticorps spécifiques dirigés contre des cibles moléculaires présentes sur des lymphocytes. Les anticorps sont développés chez une autre espèce puis humanisés pour permettre leur reconnaissance et la destruction de leur cellules cibles via le mode d'action habituel des anticorps.

Alemtuzumab : Il s'agit d'anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre le CD52. Principalement utilisé dans les cas de leucémie récalcitrante, il est parfois également utilisé dans le protocole immunosuppresseur d'induction au moment de la greffe [34].

Basiliximab : Il s'agit d'anticorps IgG monoclonaux chimériques souris/humain ciblant le CD25, une sous-unité du récepteur IL-2 des cellules T activées. Il est utilisé dans le protocole immunosuppresseur d'induction au moment de la greffe [3, 34, 43]

Belatacept : Il s'agit d'une protéine de fusion combinant les gènes CTLA-4 au fragment Fc des IgG. Il se lie aux molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 des cellules présentatrices d'antigènes et empêche la liaison avec le CD28. L'absence de co-stimulation empêche l'activation des cellules T naïves [34, 49].

Antithymocytes : Il s'agit d'anticorps IgG polyclonaux purifiés issus de l'immunisation de chevaux et/ou lapins avec des lignées lymphocytaires humaines. Il est utilisé dans le protocole immunosuppresseur d'induction au moment de la greffe causant une lymphopénie [49].

Les principaux effets secondaires des anticorps monoclonaux sont énumérés dans le tableau 4.

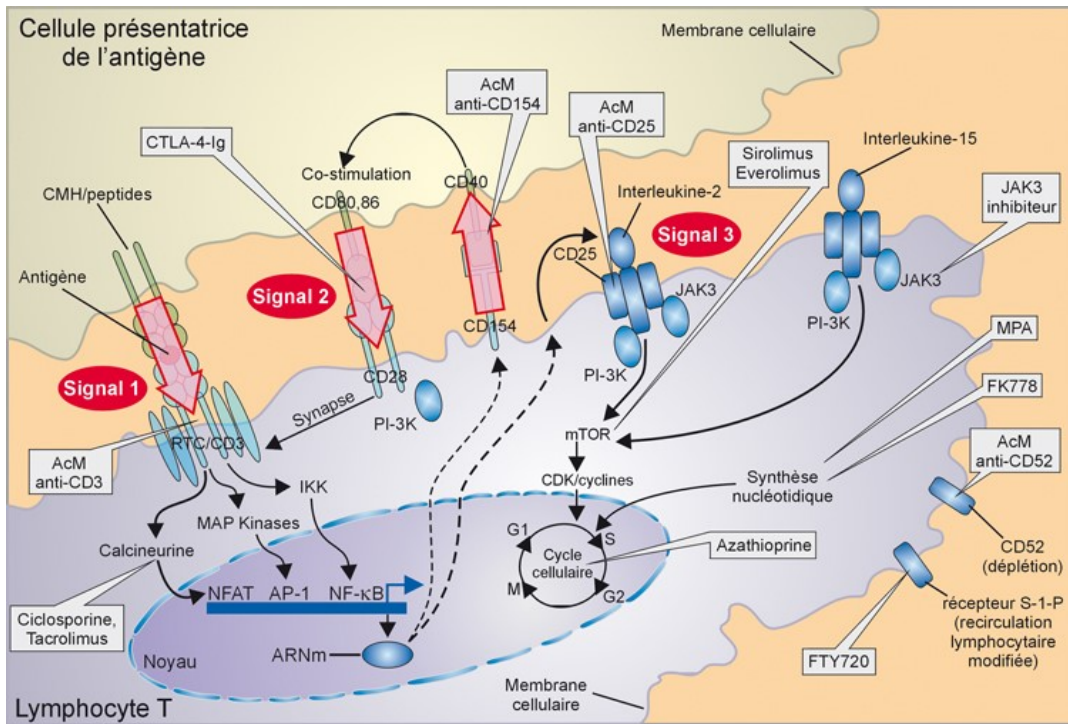


Figure 2 : Cibles et mode d'action des immunosuppresseurs⁵

⁵ Figure 2 : 50. Inserm., E.c., *Transplantation d'organes - Quelles voies de recherche ?*, l.n.d.l.s.e.d.l.r.m.-. INSERM, Editor. 2009: Paris. D'après : 41. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. N Engl J Med, 2004. **351**(26): p. 2715-29.

Tableau 4 : Résumé des principaux agents immunosuppresseurs, mécanismes et effets secondaires⁶

Agent pharmacologique	Description	Mécanismes	Effets secondaires
<i>Cyclosporine</i>	Peptide cyclique de 11 acides aminés issus de <i>Tolypocladium inflatum</i>	Se lie à la cyclophiline pour inhiber l'action de la phosphatase calcineurine, ce qui prévient l'activation des lymphocytes T	Hypertension Néoplasie Hyperlipidémie Diabète mellitus Néphrotoxicité : syndrome hémolytique-urémique Neurotoxicité Hyperplasie des gencives Hirsutisme
<i>Tacrolimus</i>	Antibiotique macrolide issu de <i>Streptomyces tsukubaensis</i>	Se lie à FKBP pour inhiber l'action de la phosphatase calcineurine, ce qui prévient l'activation des lymphocytes T	Semblable à la cyclosporine avec incidence moindre (Hirsutisme non présent)
<i>Sirolimus (rapamycine)</i>	Antibiotique macrolide triène issu de <i>S. hygroscopicus</i>	Se lie à FKBP et inhibe l'activité de mTOR, ce qui empêche la traduction par les ribosomes des facteurs de croissance cellulaire, empêchant l'expansion clonale	Hyperlipidémie Guérison tardive de blessures Augmente la toxicité des CNI (inhibiteur de calcineurine) Ulcères buccaux Thrombocytopénie Pneumonie Pneumopathie interstitielle Néoplasie

⁶ Adaptation libre des tableaux 10.2 et 10.4 du livre *Transplant Immunology* pages 247-252. 34. Li, X.C., *Transplantation immunology*, ed. AST. 2016: Wiley Blackwell.

<i>Acide mycophenolique</i>	Acide mycophenolique issu de moisissure de pénicillines	Inhibe IMPDH, ce qui débalance l'équilibre GMP-AMP nécessaire à la synthèse <i>de novo</i> des purines, ce qui inhibe la prolifération des lymphocytes T et B	Syndrome gastro-intestinal Neutropénie Anémie légère Néoplasie
<i>Azathioprine</i>	Libère du 6-mercaptopurine	Les 6-mercaptopurine intègrent l'ADN comme thioguanine, ce qui interfère avec la répllication d'ADN et perturbe les purines <i>de novo</i>	Leucopénie Diminution de moelle osseuse Macrocytose Toxicité hépatique
<i>Prednisone</i>	Convertie par le foie en prednisonolone	Action dose dépendante Ils agissent en se liant aux protéines du noyau, activant ou inhibant la transcription des gènes associés	Cataractes Hypertension Hyperglycémie Ostéoporose Symptôme de type Cushing Croissance perturbée
<i>Antithymoglobuline</i>	IgG de lapin IgG de chevaux	Anticorps cytotoxiques contre les antigènes de surface des lymphocytes T, inhibition de leurs activations	Syndrome de relâchement de cytokine sévère Œdème pulmonaire Insuffisance rénale aiguë Syndrome gastro-intestinal Perturbation du système nerveux central PTLD
<i>Basiliximab</i>	Anticorps chimériques monoclonaux contre IL-2R	Blocage sélectif du récepteur IL-2 des cellules T activées, inhibe l'action d'IL-2	Problèmes gastro-intestinaux Réaction d'hypersensibilité

<i>Belatacept</i>	Protéine de fusion ; CTLA-4 combiné avec la fraction FC des IgG	Il se lie aux molécules Co- stimulatrice CD80 et CD86 des cellules présentatrices d'antigènes et empêche la liaison avec le CD28	Augmente le risque associé au CNI pour PTLD Non conseillé au Pt EBV négatif Augmente le risque de rejet médié par les lymphocytes T Multifocal leuco-encéphalopathie tardive Risque de tuberculose en population endémique
-------------------	---	---	--

7.2.6 Les effets secondaires et risques associés

Tous les immunosuppresseurs présentent des effets secondaires qui ne sauraient être ignorés. Sans être une liste exhaustive, notons des tremblements, des migraines, de l'insomnie, de la diarrhée, une hyperglycémie, le diabète sucré, de l'hypertension et surtout une fonction rénale perturbée. De plus, il existe un risque plus grand chez une personne immunosupprimée de contracter des maladies dites « opportunistes » telles les infections virales, bactériennes et fongiques ainsi que certains types de cancer, notamment du système lymphatique et du cancer de la peau [51]. Les inhibiteurs de calcineurine sont nettement néphrotoxiques. Les effets néphrotoxiques peuvent être aigus ou chroniques. L'insuffisance rénale aiguë se développe conséquemment à l'augmentation des résistances vasculaires rénales par l'augmentation de la sécrétion d'endothéline, un vasoconstricteur, et par une diminution de facteurs vasodilatateurs suite à l'exposition aux inhibiteurs de calcineurine, ce qui, à terme, diminue le flux sanguin rénal. Les effets des inhibiteurs de calcineurine sur l'expression rénale de la cyclooxygénase-2 affectent le métabolisme de l'ACH, ce qui perturbe l'équilibre entre les agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs [44]. Une autre explication se trouve dans la mise en marche du système rénine angiotensine aldostérone par effet direct des inhibiteurs de calcineurine sur les cellules juxtaglomérulaires [42, 45, 51]. L'effet net est la réduction du flux sanguin menant à l'établissement d'un cercle vicieux accélérant les effets néfastes. [51] En plus, il apparaît que l'exposition aux inhibiteurs de la calcineurine augmentera la contractilité des muscles lisses en modifiant les flux calciques. Il peut

également se produire un artériolithe aiguë. Cette pathologie provoque un syndrome hémolytique et urémique [34, 43, 51]. L'artériolithe aiguë n'est pas dose dépendante et nécessite l'arrêt immédiat des inhibiteurs de calcineurine. Dans le cas d'une néphrotoxicité chronique, la pathologie vasculaire mène à une hyalinose artériolaire, la pathologie tubulo-interstielle, à une fibrose tubulo-interstitielle à atrophie tubulaire. L'atteinte glomérulaire mène à un gonflement de la capsule de Bowman et probablement une hyalinose segmentaire et focale. Le retour à l'hémodialyse ou une seconde greffe rénale s'impose. Il existe également un risque pour le développement d'un syndrome lymphoprolifératif post-transplant (PTLD). Le PTLD est une atteinte du système lymphatique associé au développement de tumeur ganglionnaire ou extra-ganglionnaire. La prévalence de cette pathologie chez les greffés est d'environ 10 % et la présence du virus EBV y est fortement associée [34] [51].

7.2.7 Recherches et développement de molécules immunosuppressives

Les recherches actuelles sur les molécules immunosuppressives s'efforcent d'explorer les différents liens entre le polymorphisme de gènes clés (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*) impliqués dans la cinétique et le dynamisme des molécules actuellement sur le marché, mais aussi sur les gènes pouvant diminuer la toxicité du produit (*CAV1*, codant une protéine de la fibrose tissulaire) [42, 44, 52, 53]. La forte toxicité associée aux molécules des inhibiteurs de calcineurine nécessite un contrôle de dosage des niveaux sanguins extrêmement rigoureux afin d'éviter les effets cytotoxiques (en particulier pour les reins) chez le patient. L'identification des allèles ayant un rôle dans la clairance et la biodisponibilité du produit de même que dans certains gènes codant pour des protéines effectrices permettra peut-être de prédire la vitesse de métabolisation et ainsi ajuster le dosage initial en fonction de l'association du profil génétique du donneur avec celui de son greffon [42, 44, 52, 53]. La grande diversité des agents immunosuppressifs permet aujourd'hui aux cliniciens d'établir des protocoles pour favoriser la tolérance pharmacologique de l'organe transplanté tout en cherchant à diminuer les effets secondaires potentiels. Dans le cas de la transplantation rénale, l'approche typique actuelle consiste en une combinaison de type inhibiteur de calcineurine avec un agent

antiprolifératif. Actuellement pour les patients du CHUM, la combinaison la plus souvent retrouvée parmi les patients est tacrolimus avec mycophenolate mofetil [34, 54]. Les stratégies médicamenteuses varient plus particulièrement au moment de la transplantation. L'induction à l'aide d'agents ou de mécanismes de déplétion d'anticorps va varier selon le degré d'immunisation de chaque patient et sera décidée par le clinicien. Certains vont privilégier l'ajout de corticostéroïdes au moment de la transplantation suivi d'un retrait rapide (≤ 7 jours) ou tardif (≥ 6 mois) [34]. Concernant la stratégie de minimisation à long terme de l'utilisation des CNI, trois stratégies sont reconnues : la réduction des doses, la substitution de l'agent et l'évitement. Des trois stratégies, seule la réduction des doses a démontré un effet bénéfique sur la fonction rénale à long terme [55]. Il est important de noter que les agents pharmacologiques actuels ne peuvent empêcher les effets d'une immunisation préalable contre les antigènes du donneur [51, 56].

7.3 Méthodes d'évaluation de compatibilité tissulaire

7.3.1 Les premiers pas

En 1969, Patel et Terasaki ont jeté les bases de ce qu'allaient devenir les tests de compatibilité croisée sérologiques : des lymphocytes T et B prélevés chez un donneur potentiel sont mis en contact avec le sérum d'un receveur. Les lymphocytes expriment les antigènes HLA et le sérum contient (ou non) des anticorps anti-HLA [8]. En présence d'anticorps anti-HLA spécifiques au donneur, les protéines du complément se fixent aux anticorps, ce qui permet la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC). Le pore formé par le MAC permet l'infiltration d'un colorant ajouté au milieu rendant possible l'interprétation du test de compatibilité [8]. Les tests de compatibilité croisée sérologiques ont gagné en sensibilité grâce à l'ajout d'anticorps anti-immunoglobulines humaines (AHG) [57, 58]. L'ajout d'AHG permet de repérer les DSA présents en plus faible concentration en augmentant la densité de fragments Fc à la surface cellulaire, essentielle dans le recrutement des protéines du complément [20, 58].

Il faut comprendre que les méthodes sérologiques décrites précédemment étaient également utilisées pour l'identification sérologique des antigènes HLA des patients et des donneurs. Par l'emploi d'un panel de sérum contenant des anticorps anti-HLA préalablement caractérisés et couvrant l'ensemble des spécificités susceptibles d'être retrouvées dans la population locale [59], il est possible d'identifier les différents antigènes HLA exprimés à la surface cellulaire. De même, avec un panel de cellules dont les antigènes HLA sont connus, il est également possible d'identifier sérologiquement la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques dans un sérum donné [59]. Par contre, ces tests sont limités en terme de sensibilité, les anticorps circulant doivent être en plus grande concentration pour être détectables. Il se peut donc que des subtilités alléliques du typage ou de la spécificité des anticorps anti-HLA ne puissent être résolues à ces niveaux de sensibilité.

7.3.2 Les nouvelles méthodes

Depuis, les tests de compatibilité croisée ont été améliorés en distinguant des concentrations de plus en plus faibles d'anticorps anti-HLA circulants. Ces améliorations impliquent entre autres l'utilisation de tests de compatibilité croisée sérologiques utilisant la cytométrie en flux [59]. Cette méthode nécessite une incubation du sérum du receveur avec des lymphocytes du donneur potentiel et l'utilisation d'anticorps spécifiques aux lymphocytes T (anti-CD3), lymphocytes B (anti-CD19) et d'un anti-IgG humaines, chacun de ces anticorps étant couplé à un fluorochrome particulier. L'excitation de leurs fluorochromes respectifs à l'aide de lasers permet d'identifier une incompatibilité et même de discriminer une incompatibilité causée par des anticorps contre les molécules HLA de classe II. Ce test a été raffiné par la suite avec l'ajout d'enzymes protéolytiques permettant de réduire la liaison non spécifique d'immunoglobulines à la surface des lymphocytes B exprimant des récepteurs de portion Fc [60]. Ces méthodes ont permis de mieux apparier donneur et receveur et d'augmenter ainsi la survie du greffon [1, 59-62].

Avec les avancées du domaine de la biologie moléculaire et la découverte des procédés de réaction en chaîne par polymérase (PCR), des méthodes génomiques ont vu le jour, entraînant l'identification des antigènes HLA à un niveau allélique [63, 64]. Les méthodes de génotypage se sont constamment améliorées et se sont étendues à l'ensemble des loci codant des molécules HLA de classes I et II. Parallèlement, des méthodes de détection d'anticorps en phase solide ont vu le jour. Des antigènes HLA uniques sont produits dans des systèmes d'expression eucaryotes, purifiés et liés individuellement dans un puits d'une microplaque de support (dans le cas des méthodes utilisant la technologie ELISA) ou sur des microsphères identifiables par une concentration unique de deux colorants (dans le cas des méthodes utilisant la cytométrie en flux) [59, 65-69].

7.3.3 La complexité de l'identification des anticorps anti-HLA

Les avancées technologiques permettent aujourd'hui une sensibilité accrue dans la détection d'anticorps anti-HLA spécifiques et permettent d'estimer leur concentration relative dans le sérum [12]. Ces analyses permettent de détecter une présence certaine d'anticorps anti-HLA sans que celui-ci ne cause de réaction positive dans les tests de compatibilités classiques. De nombreuses études se sont penchées sur les conséquences de greffes effectuées en présence de ces anticorps anti-HLA [11, 15, 17, 18, 70-72]. La majorité de ces études conclut à un impact négatif des DSA sur la fonction ou la survie du greffon rénal. Certaines se sont notamment penchées sur les risques et les bénéfices de considérer ces anticorps comme étant inacceptables ainsi que les coûts associés [73]. Après tout, durant des années, les transplantations ont été effectuées dans l'ignorance de ces DSA présents en faible concentration. D'autres études ont démontré une variabilité des résultats obtenus entre les différents lots de trousse utilisées, selon les laboratoires et en fonction de l'expérimentateur, rendant difficile l'interprétation adéquate des résultats obtenus [68, 74, 75]. Certains se sont aussi attardés à discriminer les DSA nuisibles selon l'isotype [10], leur titre relatif [18] et une pléiade d'autres facteurs [21, 30, 76, 77], sans toutefois faire consensus dans le milieu. Ces études avaient pour but de faciliter la réponse aux objectifs dualistes des

laboratoires d'histocompatibilité et des équipes de transplantation, soit permettre et faciliter l'accessibilité à la transplantation pour tout patient se qualifiant pour une telle chirurgie, tout en assurant la sécurité du patient et la viabilité à long terme de l'organe offert. Augmenter le nombre de spécificités d'anticorps anti-HLA inacceptables à ces patients réduit les opportunités de leur trouver un donneur compatible [21, 78]. Il est donc important d'identifier les DSA ayant un effet réel sur la survie du greffon.

8 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette étude rétrospective sur une cohorte de patients Québécois est à notre connaissance la première de ce genre. La recherche d'anticorps anti-DSA et leurs diagnostics s'est de plus en plus raffinée avec le temps. Les critères et les moyens d'investigations pour l'attribution d'organe depuis 2006 sont différents de ceux de 1994-2006 au Québec. Les critères du Québec et la population sont également différents de ceux des États-Unis. Il nous apparaît essentiel d'investiguer le rôle que des anticorps anti-DSA non détectés au moment de la greffe peuvent avoir joué sur la survie du greffon rénal. L'objectif de cette étude est d'identifier des patients ayant reçu un greffon rénal entre les années 1994 et 2006 inclusivement et d'analyser leur serum pré-greffe prélevé le plus près avant la greffe à la recherche d'anticorps anti-HLA. Avec les anticorps anti-HLA retrouvés, nous allons effectuer une analyse de compatibilité croisée virtuelle contre les antigènes HLA de leur donneur. Nous envisageons que les patients ayant des anticorps anti-HLA contre leur donneur (DSA) présentent un pourcentage de survie du greffon dans le temps inférieur aux autres patients. Nous aimerions également investiguer le rôle des DSA contre les antigènes de la classe I *versus* ceux de la classe II, de même que le rôle des DSA dirigés contre les antigènes des différents loci. Nous envisageons que les DSA dirigés contre les antigènes de classe I provoquent une perte de greffon plus précoce que ceux ayant des DSA contre les antigènes de classe II. Nous aimerions également comparer les traitements immunosuppresseifs reçus car durant la période de temps à l'étude, de nouvelles molécules immunosuppressives ont été mises sur le marché. Nous comparerons la survie du greffon rénal selon le type de traitements reçus. Comme les nouvelles générations de ces molécules présentent moins d'effets secondaires que leurs prédécesseures, nous envisageons un pourcentage de survie du greffon rénal plus élevé.

8.1 Identification et recrutement des patients

Une cohorte d'environ 406 patients greffés rénaux de l'hôpital Notre-Dame entre 1994 et 2006 inclusivement et ayant un donneur typé à l'INRS-IAF a été identifiée.

Environ 305 patients étaient vivants au 31 décembre 2015. Ces patients, qui ont été suivis en clinique post-greffe pour un minimum de cinq ans, ont été contactés pour cette étude rétrospective. Nous avons tenté de contacter par téléphone un maximum de trois fois l'ensemble des patients ciblés pour les recruter dans cette étude. Les patients rejoints se sont fait lire un verbatim (voir annexe 13.1) d'acceptation de communication par la poste. Les patients n'ayant pas été rejoints durant cette période ont reçu par la poste les documents explicatifs de notre étude (voir annexe 13.2) ainsi qu'un formulaire d'adhésion (voir annexe 13.3) avec enveloppe de retour prépayée. Cent-soixante-seize patients ont accepté de participer à notre étude.

La consultation du dossier médical du patient a permis de compiler certaines informations pertinentes à notre étude. La *non-adhérence* au traitement a été établie et documentée par le médecin traitant. Le délai de la reprise de fonction rénale (*delayed graft function*, DGF) est défini comme « le besoin de dialyse dans les 168 premières heures (7 jours) post greffe ». La fin de vie du greffon est définie comme « le premier recours à la dialyse chronique post greffe et une greffe subséquente ». La présence de rejet humoral (*antibody-mediated rejection*, AMR) ou de rejet cellulaire a été déterminée par les valeurs cliniques obtenues suite à une biopsie et classées en fonction des critères de Banff. Dans le cadre de cette étude rétrospective, les évaluations invasives complétées et jugées nécessaires au bon suivi clinique du patient ont été utilisées aux fins d'analyses de la fonction rénale menant au diagnostic d'AMR. Les évaluations sanguines et urinaires complétées et jugées nécessaires au bon suivi clinique du patient ont été utilisées pour le suivi de la fluctuation du taux de filtration glomérulaire dans le temps. Les autres valeurs ont été obtenues par révision du dossier médical du patient. Aucune autre comorbidité n'a été extraite des dossiers médicaux des patients. Les patients ne souhaitant pas participer à l'étude n'ont fait l'objet d'aucune analyse.

8.2 Recherche d'anticorps

Dans le cadre de cette étude, nous avons été approchés par une compagnie souhaitant implanter leur nouvelle gamme de produits de détection d'anticorps anti-HLA

en phase solide. Sans être le seul facteur dans la prise de décision, les prix de cette compagnie étaient avantageux et nous avons considéré utiliser leurs produits. De plus, l'éventail d'anticorps anti-HLA identifiables par cette méthode est légèrement différente d'un point de vue allélique de celle utilisée au laboratoire. Cette différence peut nous permettre de mieux caractériser l'étendue de l'immunisation des patients. Nous avons donc décidé d'évaluer leurs produits et leurs méthodes afin de pouvoir éventuellement les utiliser.

Le principe et la méthode de *LIFECODES LSA™* sont ceux-ci : un panel de microbilles couvertes d'antigènes HLA purifiés et ayant une concentration unique de deux colorants pour chaque antigène est fourni pour chaque classe d'antigènes HLA. Le sérum est incubé avec les microbilles sur microplaque pendant 30 minutes à température pièce puis subit quatre lavages par aspiration inverse avec un tampon. Un conjugué d'anticorps caprin anti-IgG humain couplé à de la phycoérythrine est ajouté et incubé 30 minutes. Les microplaques ont été lues à l'aide du Luminex 200 fluoroanalyzer. Les résultats ont ensuite été analysés avec le logiciel Match IT-Ab.

Trois méthodes utilisant chacune leurs valeurs seuils sont disponibles pour l'identification des anticorps anti-HLA présents :

1. BCM: Valeur en MFI (*mean fluorescence antibodies*) corrigée par le bruit de fond (*Background corrected MFI value*) -- Valeur en MFI brute des données moins la valeur du bruit de fond en MFI.
2. BCR : Ratio corrigé par le bruit de fond (*background corrected ratio*) -- Ratio obtenu par le quotient de l'équation suivante : BCM divisé par le MFI du témoin calculé (*CalcCON*) du locus de l'antigène.
3. AD-BCR : Ratio corrigé par le bruit de fond et ajusté à la densité d'antigène sur les billes (*antigen density background corrected ratio*) -- Ratio obtenu par le quotient

de l'équation suivante : BCR divisé par la quantité relative d'antigène pour chaque bille (fourni par le fabricant dans les feuilles explicatives spécifiques du lot).

Un minimum de deux de ces méthodes doit donner un résultat positif pour l'identification d'anticorps anti-HLA inacceptables, soit un anticorps pouvant causer le rejet humoral si le patient recevait un greffon portant l'antigène spécifique. Nous avons donc cherché à corréliser les résultats obtenus entre la méthode préalablement validée à notre laboratoire et cette nouvelle méthode. Nous avons parallèlement évalué 43 patients aux différents profils d'immunisation anti-HLA et identifié les meilleures valeurs seuils pour chaque méthode et chaque classe d'anticorps anti-HLA.

La présence et l'abondance relative d'anticorps anti-HLA ont été mesurées pour les deux classes d'antigènes (I & II) pour chaque patient par des analyses de détection d'anticorps en phase solide à partir de sérum pré-greffe le plus près de la date de transplantation. Leurs sérums pré-greffe étaient conservés à une température maximale de -40 °C et aucun sérum n'était antérieur à quatre mois avant la greffe. Les anticorps anti-HLA spécifiques du donneur ont été classés DSA selon des valeurs seuils préétablies [18, 21]. Les analyses de détection d'anticorps ont été effectuées à l'aide de réactifs vendus par la compagnie Immucor Lifecodes. En bref, les spécificités HLA pour chaque classe se retrouvent à la surface de microsphères identifiables par une concentration unique de deux colorants. Dix microlitres de sérum pré-greffe sont mis en incubation pour 30 minutes sur une plaque rotative et à température pièce avec 40 µl de microsphère en suspension. Après trois lavages avec un tampon phosphaté par aspiration inverse, 50 µl d'une solution contenant un conjugué d'anti-IgG-PE à une dilution de 1/10 est ajouté puis incubé pendant 30 minutes sur une plaque agitatrice, à l'abri de la lumière et à température pièce. L'échantillon est ensuite lu au fluoro-analyseur Luminex et interprété par le logiciel Match-It AB (voir figure 3).

Cette méthode de détection d'anticorps a été validée dans notre laboratoire et ajustée pour que les seuils de détection représentent les critères utilisés pour le diagnostic d'anticorps anti-HLA. Lorsqu'une ou des spécificités d'anticorps anti-HLA

étaient présentes, une comparaison avec les HLA du receveur a été effectuée pour discriminer la présence d'anticorps contre le soi. Par la suite, la comparaison s'effectuait avec son donneur pour identifier des anticorps HLA spécifiques au donneur. Le donneur ayant été préalablement typé lors de son inscription comme donneur potentiel.

Si des anticorps anti-HLA étaient dirigés contre un locus non analysé, nous effectuons un génotypage pour le locus manquant par SSO (voir 8.1.3 pour description).

The figure displays two side-by-side windows from a medical software application. The left window is titled 'Patient No. [redacted]' and the right window is titled 'Donor No. [redacted]'. Both windows have a 'Patient Info' or 'Donor Info' section on the left with various fields like Last, First, MRN, SSN, UNOS ID, Gender, Race, DOB, Status, ABO, Rh, Maiden, Category, Diagnosis, UNOS Ctr, Location, Other ID, and Patient ID. The main area of each window contains a table with three columns: 'Molecular', 'Equivalent', and 'Serology'. In the patient window, the row for 'DQB1' has values '02:XX', '02:XX', '2', '2', '2', '2', with the last four cells circled in black. In the donor window, the row for 'DQB1' has values '03:01', '-', '7', '-', with the last three cells circled in black.

Figure 3 :Exemple d'identification d'anticorps DSA 1/2

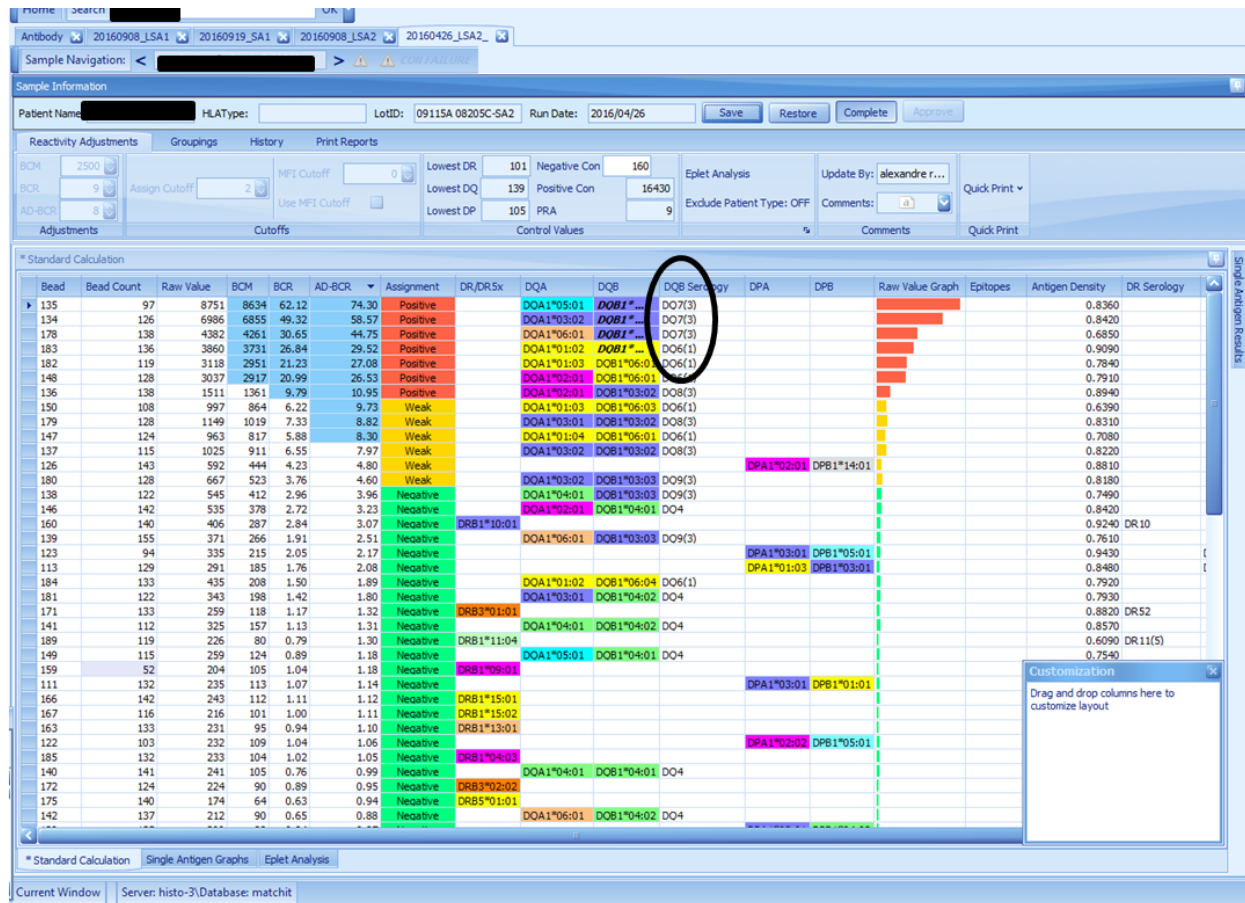


Figure 4 :Exemple d'identification d'anticorps DSA 2/2

Légende : sérum de patient testé pour ces spécificités d'anticorps anti-HLA de classe II par *SAB Lifecodes LSA™ class II*. Les données HLA du patient et de son donneur ont été extraites à partir de la base de données du laboratoire d'histocompatibilité INRS-IAF. Les images des génotypes du receveur (gauche) et du donneur (droite) sont issues du logiciel Histotrac. L'image du dépistage d'anticorps anti-HLA provient du logiciel *Match-IT Antibody*.

La figure 3 permet de montrer un exemple d'identification de DSA. Les valeurs de la partie supérieure sont extraites de nos bases de données et affichées avec le logiciel HistoTrac. La partie supérieure gauche expose diverses informations d'un des receveurs à l'étude, la partie supérieure droite est réservée au donneur de ce patient. Cette juxtaposition permet de repérer les différences au niveaux des HLA entre eux. Les valeurs encadrées mettent l'emphase sur un *mismatch* au niveau des antigènes du locus DQ. La partie inférieure démontre le panel de la réactivité des anticorps anti-HLA contre les antigènes de la classe II présent dans le sérum analysé. Après les avoir organisés du

plus réactif au moins réactif selon la valeur AD-BCR, il est possible d'observer que ce receveur était préalablement sensibilisé contre des antigènes spécifiques des DQ7.

8.3 Génotypage de HLA

Les génotypages de donneurs ont été effectués avec la méthode *Lifecodes HLA SSO Typing - rapid* de chez Immucor pour compléter le génotypage manquant HLA A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 et DQA1 DQB1, DPA1 et DPB1. L'amplification de séquences spécifiques correspondant à la spécificité allélique du locus a été effectuée par PCR-SSO (*sequence-specific oligonucleotide*) en utilisant des amorces couplées à la biotine. Suivant l'extraction de l'ADN, 80ng d'ADN est mis en présence de 1U d'ADN polymérase et de 6 µl de solution principale contenant, entre autres, des amorces spécifiques, des nucléotides et du MgCl₂, pour un total de 20 µl. L'échantillon d'ADN est ensuite amplifié dans un thermocycleur via des cycles de changement de température (voir ci-dessous).

Tableau 5 : Température d'amplification d'ADN par la méthode *Lifecodes SSO HLA Typing -Rapid*

Étape	Température (°C)	Temps (secondes)	Cycle
1	95	90	1
2	95	15	12
	60	30	
	72	30	
3	95	10	28
	63	30	
	72	30	

4	72	60	1
5	4	∞	

L'hybridation des amplicons se fait via dénaturation des doubles fragments d'ADN suivie d'hybridation aux fragments complémentaires présents sur une gamme de microbilles ayant une concentration unique de deux colorants les rendant identifiables par lecture au Luminex. Par la suite, l'ajout de SAPE (streptavidine-phycoérythrine) permet la liaison streptavidine-biotine et la phycoérythrine permet de les détecter par lecture de la fluorescence au Luminex. Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel *Match-IT DNA*. L'ensemble des billes positives et négatives permettent l'identification des allèles de l'échantillon. Le tableau ci-dessous décrit les températures utilisées par le thermocycleur pour l'hybridation sur microbilles.

Tableau 6 : Température d'hybridation d'ADN complémentaire par la méthode *Lifecodes SSO HLA Typing -Rapid*

Étape	Température (°C)	Temps (minutes)	Cycle
1	97	1	1
2	47	10	
3	47	8	
4	56	8	

8.4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques test de Log-Rank, test de courbe ROC (*Receiver Operator Characteristics*), régression de Cox, analyse de survie Kaplan-Meier et Anova de même que leurs graphiques associés ont été produit avec le logiciel MEDCALC® v18.6.

9 RÉSULTATS

Les analyses de recherche d'anticorps anti-HLA de cette étude, tel que préalablement décrite dans la section 8.1.2 du matériels et méthodes, ont été effectuées avec des trousse de détection d'anticorps anti-HLA d'une compagnie différente (Lifecodes) de celle utilisée principalement dans notre laboratoire d'histocompatibilité (One Lambda). Une des raisons de ce choix répondait aux contraintes monétaires liés a cette étude. Ces nouvelles trousse sont moins dispendieuses tout en ayant quelques spécificités antigéniques distinctes. Afin de s'assurer de la validité des résultats à obtenir, nous avons analysé en parallèle différents sérums avec les deux méthodes puis nous avons calibré les valeurs seuils afin que le résultat obtenu soit au plus près identique avec la méthode One Lambda.

9.1 Validation de détection d'anticorps LSAI et LSAII *LIFECODES* LSA™

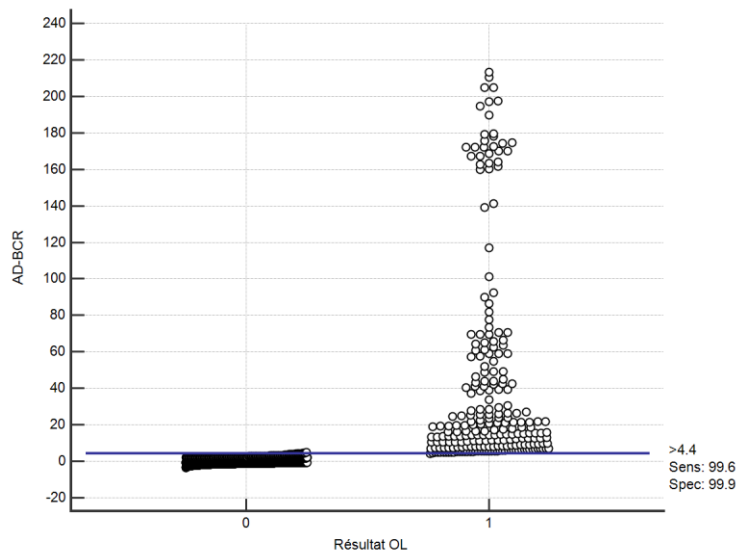


Figure 5 : Validation de la valeur seuil AD-BCR pour les anticorps anti-HLA de classe I en se basant sur les résultats obtenus par LABScreen

Légende : 43 sérums de patients différents ont été testés pour leurs spécificités d'anticorps anti-HLA de classe I par SAB LABScreen® Single Antigen (Résultat OL) ainsi que par SAB Lifecodes LSA™ class I. En se basant sur les résultats obtenus par LABScreen® Single Antigen pour le groupe de sérum négatif (0, n=4225), et le groupe de sérum positif (1, n=236), nous avons identifié la meilleure valeur seuil applicable à

SAB Lifecodes LSA™ class I AD-BCR. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

La Figure 5 nous permet d'observer, pour les anticorps anti-HLA de classe I, une sensibilité de 99,6 % et une spécificité de 99,9 % pour une valeur seuil AD-BCR de 4,4. Ceci nous permet d'affirmer que les résultats obtenus par SAB LIFECODES LSA™ Classe I sont fidèles à ceux obtenus par SAB LABScreen® Single Antigen.

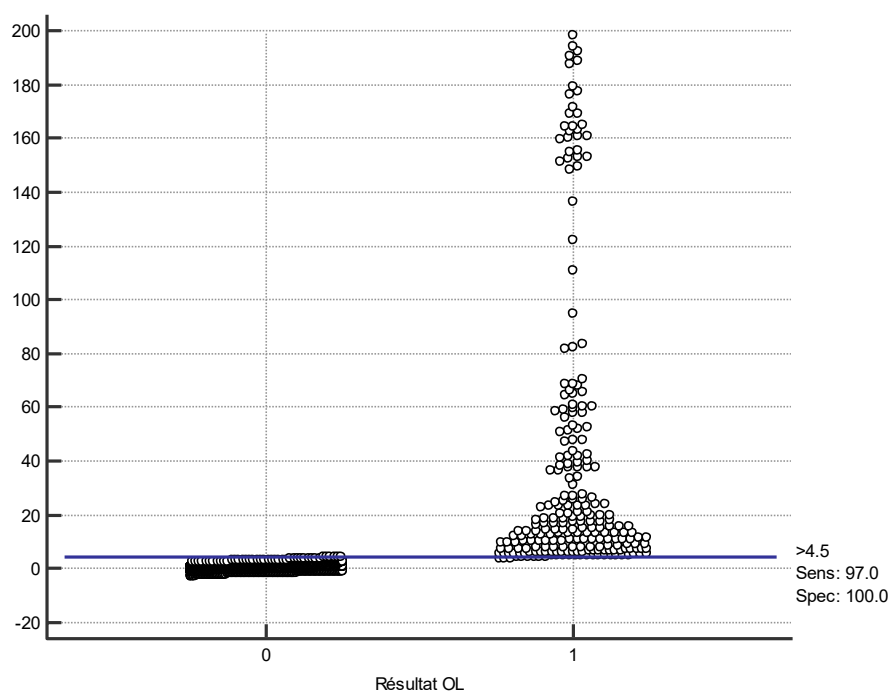


Figure 6 : Validation de la valeur seuil BCR pour les anticorps anti-HLA de classe I en se basant sur les résultats obtenus par LABScreen

Légende : 43 sérums de patients différents ont été testés pour leurs spécificités d'anticorps anti-HLA de classe I par SAB LABScreen® Single Antigen (Résultat OL) ainsi que par SAB Lifecodes LSA™ class I. En se basant sur les résultats obtenus par LABScreen® Single Antigen pour le groupe de sérum négatif (0, n=4225), et le groupe de sérum positif (1, n=236), nous avons identifié la meilleure valeur seuil applicable à SAB Lifecodes LSA™ class I BCR. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Avec une sensibilité de 97,0 % et une spécificité de 100 %, l'utilisation de la valeur seuil BCR de 4,5 pour les anticorps anti-HLA de classe I nous permet d'affirmer que les

résultats obtenus par *SAB Lifecodes LSA™ class I* sont fidèles à ceux obtenus par *SAB LABScreen® Single Antigen*, selon la Figure 6.

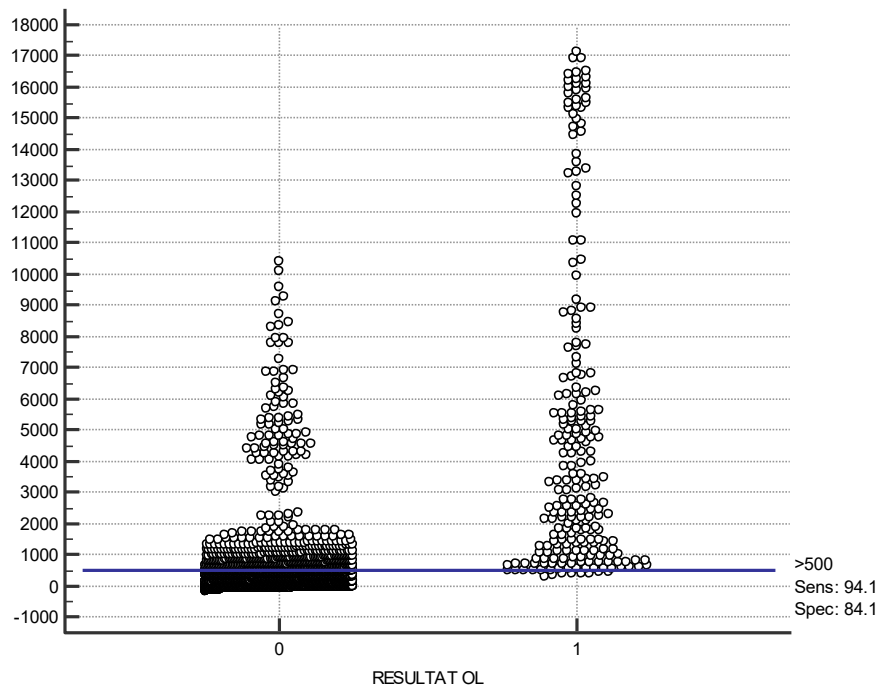


Figure 7 : Validation de la valeur seuil BCM pour les anticorps anti-HLA de classe I en se basant sur les résultats obtenus par LABScreen

Légende : 43 sérums de patients différents ont été testés pour leurs spécificités d'anticorps anti-HLA de classe I par *SAB LABScreen® Single Antigen* (Résultat OL) ainsi que par *SAB Lifecodes LSA™ class I*. En se basant sur les résultats obtenus par *LABScreen® Single Antigen* pour le groupe de sérum négatif (0, n=4225), et le groupe de sérum positif (1, n=236), nous avons identifié la meilleure valeur seuil applicable à *SAB Lifecodes LSA™ class I* BCM. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel *MEDCALC® v18.6*.

Avec une sensibilité de 94,1 % et une spécificité de 84,1 %, l'utilisation de la valeur seuil BCM de 500 MFI pour les anticorps anti-HLA de classe I nous permet d'affirmer que les résultats obtenus par *SAB LIFECODES LSA™ classe I* sont quasiment représentatifs de ceux obtenus par *SAB LABScreen® Single Antigen* selon la Figure 7. Notons un 16% de discordance au niveau de la spécificité. Des trois méthodes de diagnostic, la valeur BCM est la moins rigoureuse.

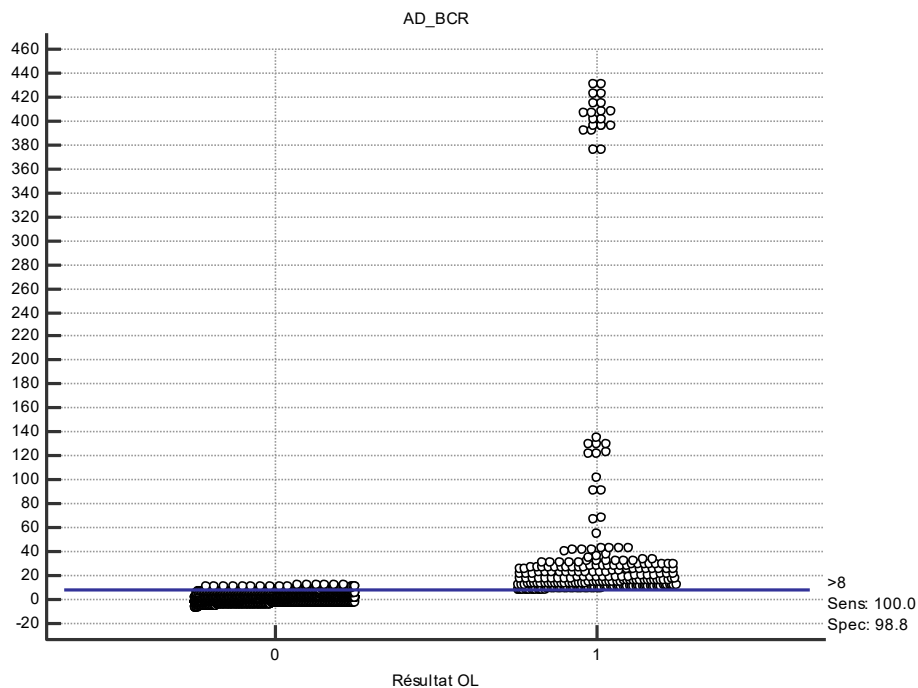


Figure 8 : Validation de la valeur seuil AD-BCR pour les anticorps anti-HLA de classe II en se basant sur les résultats obtenus par LABScreen

Légende : 43 sérums de patients différents ont été testés pour leurs spécificités d'anticorps anti-HLA de classe II par SAB LABScreen® Single Antigen (Résultat OL) ainsi que par SAB Lifecodes LSA™ class II. En se basant sur les résultats obtenus par LABScreen® Single Antigen pour le groupe de sérum négatif (0, n=6142), et le groupe de sérum positif (1 ,n=256), nous avons identifié une valeur seuil applicable à SAB Lifecodes LSA™ class II AD-BCR. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 98,8 %, l'utilisation de la valeur seuil AD-BCR de 8 pour les anticorps anti-HLA de classe II nous permet d'affirmer que les résultats obtenus par SAB LIFECODES LSA™ classe II à la Figure 8 sont représentatifs de ceux obtenus par SAB LABScreen® Single Antigen.

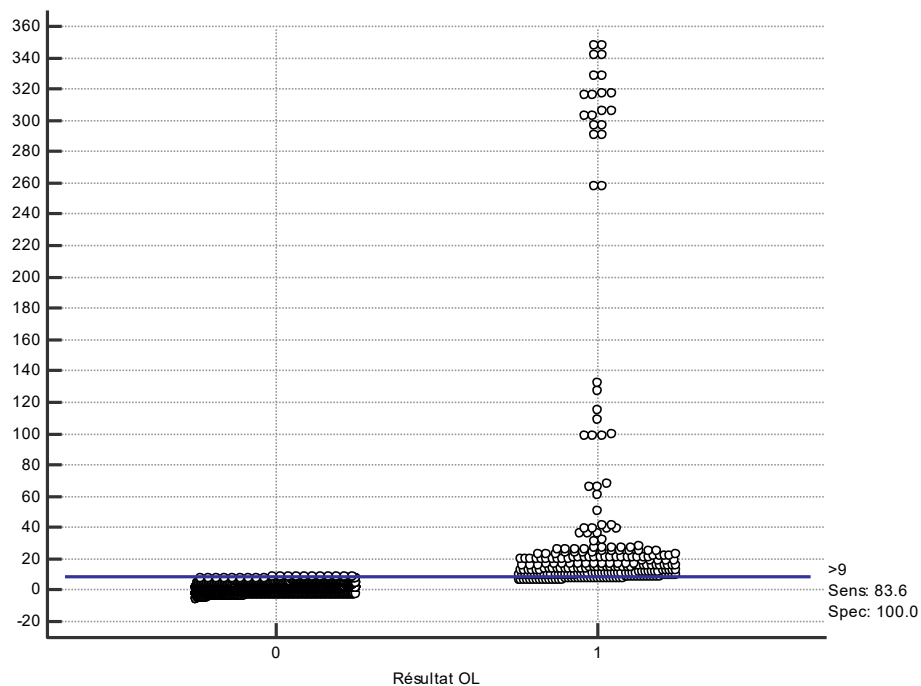


Figure 9 : Validation de la valeur seuil BCR pour les anticorps anti-HLA de classe II en se basant sur les résultats obtenus par LABScreen

Légende : 43 sérums de patients différents ont été testés pour leurs spécificités d'anticorps anti-HLA de classe II par SAB LABScreen® Single Antigen (Résultat OL) ainsi que par SAB Lifecodes LSA™ class II. En se basant sur les résultats obtenus par LABScreen® Single Antigen (pour le groupe de sérum négatif (0, n=6142), et le groupe de sérum positif (1, n=256), nous avons identifié une valeur seuil applicable à SAB Lifecodes LSA™ class II BCR. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Avec une sensibilité de 83,6 % et une spécificité de 100 %, l'utilisation de la valeur seuil BCR de 9 pour les anticorps anti-HLA de classe II nous permet d'affirmer que les résultats obtenus par SAB LIFECODES LSA™ classe II à la Figure 9 sont représentatifs de ceux obtenus par SAB LABScreen® Single Antigen.

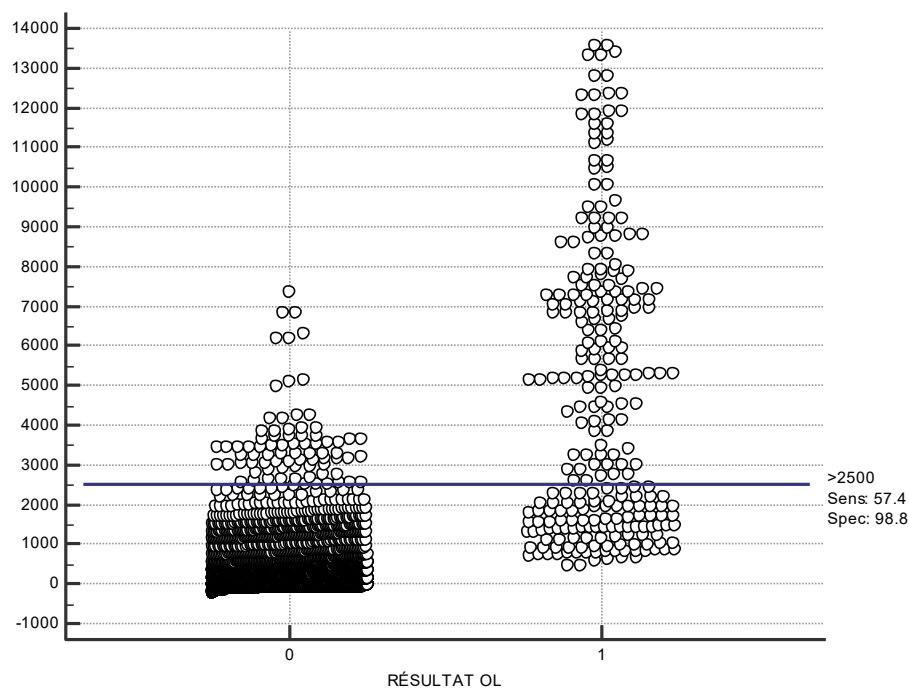


Figure 10 : Validation de la valeur seuil BCM pour les anticorps anti-HLA de classe II en se basant sur les résultats obtenus par LABScreen

Légende : 43 sérums de patients différents ont été testés pour leurs spécificités d'anticorps anti-HLA de classe II par SAB LABScreen® Single Antigen (Résultat OL) ainsi que par SAB Lifecodes LSA™ class II. En se basant sur les résultats obtenus par LABScreen® Single Antigen pour le groupe de sérum négatif (0, n=6142), et le groupe de sérum positif (1, n=256), nous avons identifié une valeur seuil applicable à SAB Lifecodes LSA™ class II BCM. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Avec une sensibilité de 57,3 % et une spécificité de 98,8 %, l'utilisation de la valeur seuil BCM de 2500 pour les anticorps anti-HLA de classe II nous permet d'affirmer que les résultats obtenus par SAB Lifecodes LSA™ classe II sont faiblement représentatifs de ceux obtenus par SAB LABScreen® Single Antigen selon la Figure 10. Pour être considérée anticorps anti-HLA indésirable, une spécificité d'anticorps contre la classe II doit être positive pour AD-BCR et BCR inclusivement. La mesure de BCM ne sera jamais utilisée pour le diagnostic des anticorps indésirables.

Il existe quelques différences mineures entre les résultats des 43 sérums testés, mais ces discordances sont toujours très près des valeurs seuils. En tenant compte des résultats obtenus, nous avons choisi de poursuivre avec les trousse du nouveau

fournisseur en utilisant les valeurs seuils AD-BCR et BCR pour chaque classe d'anticorps.

9.2 Caractéristique de la population à l'étude

Parmi les 305 patients vivants identifiés, 176 ont accepté de participer à l'étude (57%). Pour ce qui est de la détection d'anticorps anti-HLA effectuée, nous avons identifié 91 patients qui n'avaient aucun anticorps décelable et 68 patients possédaient des anticorps anti-HLA non spécifiques à leur donneur. Enfin, 17 patients possédaient des anticorps spécifiques de leur donneur au moment d'être greffés. Le résumé des caractéristiques des patients et donneurs peut être trouvé dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques et immunologiques de la cohorte de patients transplantés de l'étude

CRITÈRES	N	VALEUR MINIMALE	VALEUR MAXIMALE	MOYENNE	IC	MEDIANE	IC
					MOYENNE 95 %		MÉDIANE 95 %
ÂGE À LA GREFFE	175	10	74	44.38	42.40 à 46.35	46	43.00 à 47.00
ÂGE DONNEUR	170	4	73	40.95	38.46 à 43.44	45	40.00 à 46.25
SURVIE GREFFON (mois)	176	0	240	145.18	136.39 à 153.97	146.5	140.52 à 154.00
ISCHÉMIE (minutes)	171	50	1890	716.14	664.91 à 767.39	736	696.00 à 780.00
<i>Mismatch</i> HLA A-B-DR	176	0	5	2.869		3.000	

<i>Mismatch locus A</i>	176	0	2	1.21		1	
<i>Mismatch Locus B</i>	176	0	2	1.1429		1	
<i>Mismatch Locus DR</i>	176	0	2	0.5327		0	

Légende : L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les informations personnelles des patients ont été extraites à partir de la base de données du laboratoire d'histocompatibilité IAF-INRS et de la base de données *Transplantation* de l'équipe de transplantation rénale du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, site Notre-Dame. Les analyses statistiques ont été complétées par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques et immunologiques de la cohorte de patients de l'étude suite...⁷

CRITÈRES	CRITÈRES SPÉCIFIQUES	Nombre	POURCENTAGE
DSA	DSA ANTI-A	5	20.80
	DSA ANTI-B	6	25.00
	DSA ANTI-DR	7	29.20
	DSA ANTI-DP	1	4.20
	DSA ANTI-DQ	5	20.80
TOTAL		24	100
ANTI-HLA non DSA	Homme avec	38 (70)	35.18 (64.82)
	Femme avec	37 (31)	54.41 (45.59)
TOTAL		65 (111)	36.91 (63.09)
TYPE D'ANTICORPS ANTI-HLA	AUCUN	91	51.7
	ANTI-HLA+	68	38.63
	DSA+	17	9.65
TOTAL		176	100
GREFFON	FONCTIONNEL ⁸	133	75.56
	PERTE	43	24.43
TOTAL		167	100
SEXE	Homme	101	57.4
	Femme	75	42.6
TOTAL		176	100

⁷ Les nombres entre parenthèses représentent l'inverse de la condition

⁸ Au 31 décembre 2015

SEXE DSA	Homme DSA	9 (92)	8.91 (91.9)
	Femme DSA	8 (67)	10.66 (89.34)
TOTAL		17 (169)	9.66
DONNEUR	CADAVÉRIQUE	154	87.50
	VIVANT	22	12.50
TOTAL		176	100
INCOMPATIBILITÉ HLA (SUR 6)	0	7	4.00
	1	10	5.70
	2	42	23.90
	3	71	40.30
	4	32	18.20
	5	11	6.20
	6	3	1.70
TOTAL		176	100
ABO	O	55	31.25
	A	88	50.00
	B	19	10.80
	AB	14	7.95
TOTAL		176	100

Légende : L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les informations des patients ont été extraites à partir de la base de données du laboratoire d'histocompatibilité IAF-INRS et de la base de données *Transplantation* de l'équipe de transplantation rénale du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, site Notre-Dame. Les analyses statistiques ont été complétées par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Parmi les données les plus intéressantes des tableaux Tableau 7Tableau 8, notons le taux de survie du greffon moyen de 145 mois, soit un peu plus de 12 ans. À la fin de cette étude en 2015, plus de 75 % des patients de cette étude possédaient un greffon fonctionnel.

9.3 Probabilité de survie du greffon

La survie du greffon rénal chez un patient dépend de plusieurs éléments. En plus des facteurs post-greffe comme l'âge, la génétique, les différentes molécules d'immunosuppresseur ou l'adhérence du patient aux traitements etc., d'autres paramètres doivent être évalués avant la greffe. Les antigènes HLA du patient doivent avoir été identifiés, de même que ceux du donneur potentiel. Il faut également bien connaître le niveau d'immunisation d'un patient contre les antigènes HLA de sa

population. Ces anticorps anti-HLA peuvent se développer suite à une transfusion sanguine, une grossesse ou une greffe préalable. C'est l'identification de ces anti-HLA qui est l'enjeu de cette étude. Comme mentionné précédemment, les techniques de détections se sont améliorées avec les années, au point où il est désormais possible d'identifier des anticorps anti-HLA sans que ceux-ci ne provoquent un résultat positif lors d'une analyse de compatibilité croisée sérologique. C'est dans cette optique que nous réévaluons les sérums utilisés au moment de la greffe de chacun des patients avec une méthode de détection d'anticorps anti-HLA plus sensible que celle utilisée à l'époque de leur greffe respective. Nous souhaitons identifier des patients ayant été greffés avec un ou des DSA afin d'observer les effets de ces derniers.

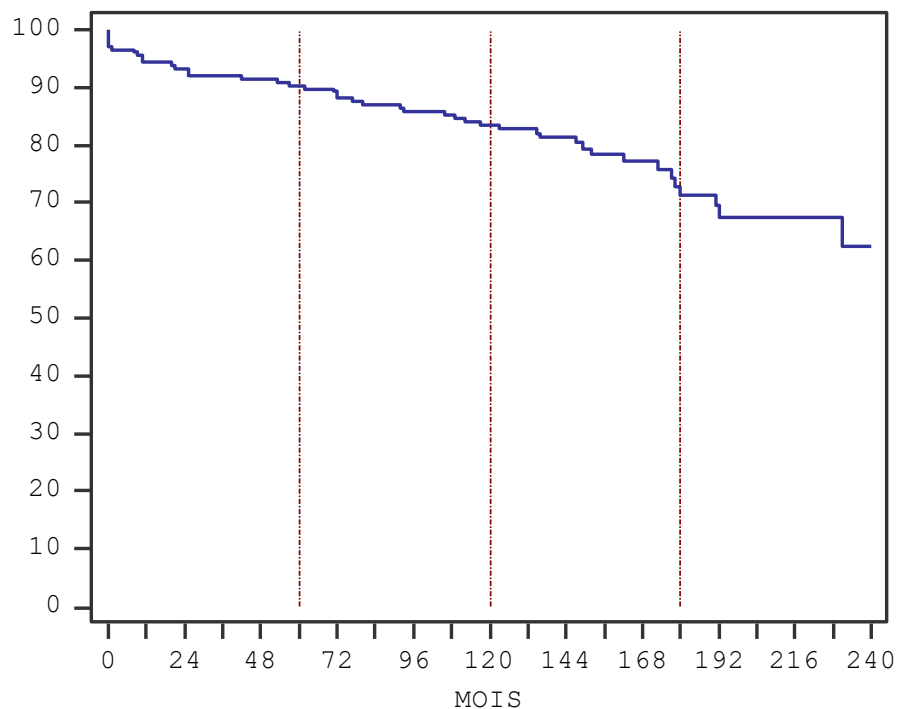


Figure 11 : Probabilité de survie du greffon pour l'ensemble de la cohorte de 176 patients greffés entre 1994 et 2006

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients greffés entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque tranche de 5 ans. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Cette régression permet de visualiser la survie des greffons de notre cohorte de patients sur une période de 20 ans divisée par mois. La probabilité de survie du greffon de l'ensemble des patients de notre cohorte a été déterminée par une analyse Kaplan-Meier. Tel que montré à la Figure 11, la survie moyenne des greffons est de 90,3 % à 5 ans, 83,4 % à 10 ans, 71,2 % à 15 ans, et finalement 62,4 % à 20 ans.

9.4 Facteurs associés à la survie du greffon – Analyses univariées

Afin de bien discriminer le rôle des DSA *versus* celui des anticorps anti-HLA non spécifiques au donneur, nous avons étudié la survie du greffon entre les groupes n'ayant jamais été sensibilisés au HLA, et donc dépourvus d'anticorps anti-HLA, de ceux y ayant été exposé sans que ces anticorps soient spécifiques de leur donneur respectif.

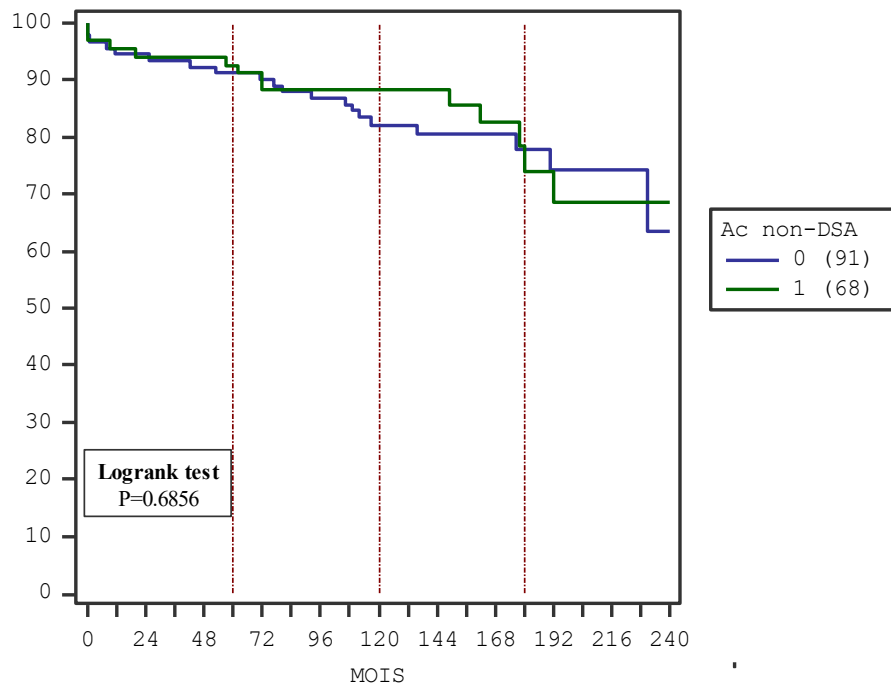


Figure 12 : Probabilité de survie du greffon non significativement différente entre le groupe sans anti-HLA et le groupe avec anti-HLA non-DSA

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 159 patients sans DSA effectués entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. L'événement modélisé, la fin de vie du

greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque tranche de 5 ans. Les patients ont été divisés deux groupes : les patients sans anticorps (groupe 0, n=91) et les patients avec anticorps anti-HLA non DSA (groupe 1, n=68). Les anticorps anti-HLA ont été détectés par une méthode de détection d'anticorps en phase solide sur microbilles à antigène unique (*single antigen beads*) et analysés par le logiciel Match-IT Antibody™. Les HLA des patients et des donneurs ont été obtenus au moment de la greffe par des méthodes diverses et complétés au besoin par typage moléculaire LIFECODES HLA SSO™ (*sequence-specific oligonucleotide*). Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Cette analyse univariée permet de comparer la présence d'anti-HLA non DSA à ceux sans anti-HLA. La différence de probabilité de survie du greffon entre les patients avec anti-HLA non-DSA (n=68) et les patients sans anti-HLA (n=91) de notre cohorte a été déterminée non significative (P = 0.6856) par une analyse statistique *Log Rank* des courbes de Kaplan-Meier. Tel que démontré à la Figure 12, la présence d'anticorps anti-HLA non spécifiques du donneur n'est pas un facteur de risque en soi.

Il y a un large consensus chez les spécialistes de greffe d'organe voulant que la présence de DSA prégreffe influence négativement la survie du greffon. Afin de les éviter, Patel et Terasaki ont mis au point les premiers tests de compatibilité croisée. Depuis, tel que mentionné précédemment, il est possible d'identifier des anticorps anti-HLA DSA circulants sans que ceux-ci ne soient en mesure de provoquer un résultat positif dans les tests de compatibilités classiques, nous évaluons donc leur impact sur la survie du greffon.

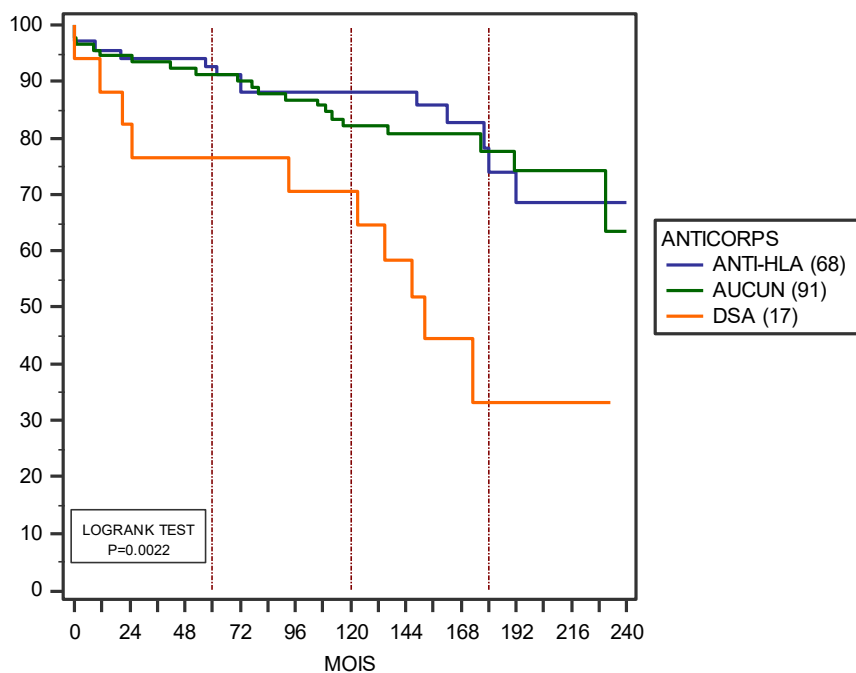


Figure 13 : Probabilité de survie du greffon significativement différente entre les groupe sans anticorps, avec anti-HLA non DSA, et avec DSA

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients transplantés entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les patients ont été divisés trois groupes : les patients sans anticorps (groupe Aucun, n=91), les patients avec anticorps anti-HLA non DSA (groupe Anti-HLA, n=68) et les patients avec des DSA prégreffe (groupe DSA, n=17). Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les anticorps anti-HLA ont été détectés et analysés tel que décrit précédemment. Les HLA des patients et des donneurs ont été obtenus au moment de la greffe et complétés au besoin par les méthodes décrites précédemment..

La Figure 13 permet d'évaluer le rôle des DSA dans un analyse univariée en comparant la survie en mois des patients DSA+, Anti-HLA+ et aucun anti-HLA. La survie en mois est caractérisée par la perte du greffon. La différence de probabilité de survie du greffon entre les patients avec DSA+ (n=17), Anti-HLA+ (n=68) et sans Anti-HLA (n=91) est significative (P=0.0022), démontré par une analyse statistique *Log Rank* des courbes de Kaplan-Meier. Une combinaison des groupes « Anti-HLA non DSA » et « aucun anti-HLA » a produit le groupe de référence témoin. La différence de probabilité de survie du greffon entre les patients avec DSA (n=17) et les patients du groupe témoin (n=159) de notre cohorte a été déterminée hautement significative (P=0.005) par une analyse statistique *Log Rank* des courbes de Kaplan-Meier (figure non présenté). La Figure 13

permet de confirmer pour notre cohorte de patients l'impact négatif de la présence de DSA prégreffes non détectés par les méthodes sérologiques sur la survie du greffon rénal. Dès la deuxième année postgreffe, il est possible d'observer une différence de presque 20 % entre le pourcentage de survie du greffon des trois groupes de patients. Après la dixième année postgreffe, l'écart se creuse pour atteindre une différence d'environ 40 % à la quinzième année.

Les antigènes HLA ne sont pas exprimés de la même manière à la surface cellulaire. Les protéines des loci de classe I sont exprimés de façon constitutive sur toutes les cellules nucléées et donc constamment exposés aux DSA. Dans cette optique, nous envisageons que les patients possédant des DSA contre la classe I aient une survie du greffon plus faible que l'ensemble des autres patients.

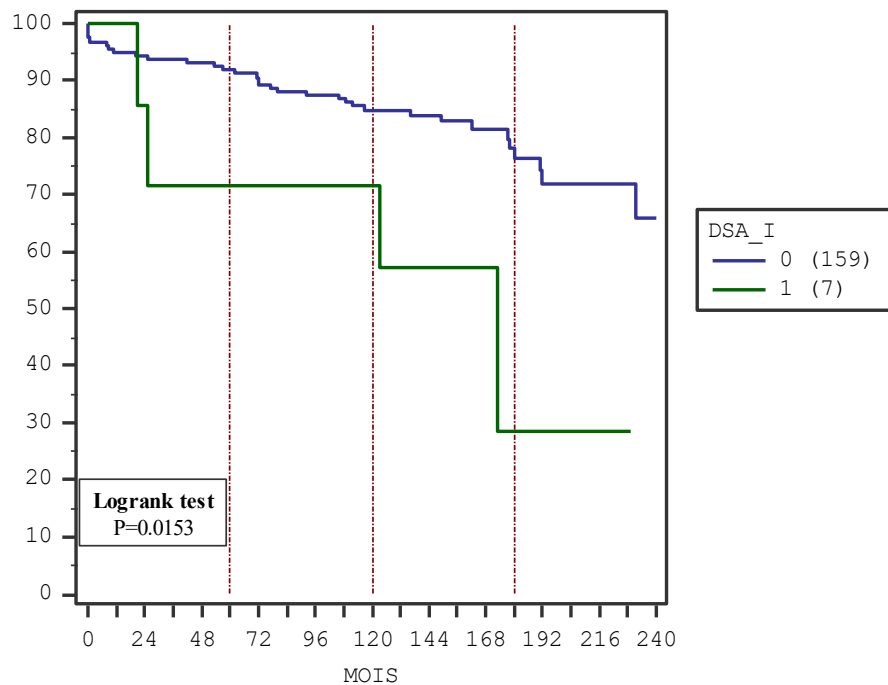


Figure 14 : Probabilité de survie du greffon significativement différente entre le groupe témoin et le groupe avec DSA contre HLA classe I

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients effectués entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les patients ont été divisée deux groupes : les patients sans DSA contre la classe I (groupe 0, n=159) et les patients avec des DSA prégreffe contre la classe I (groupe 1, n=7). L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les

lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les anticorps anti-HLA ont été détectés et analysés tel que décrit précédemment. Les HLA des patients et des donneurs ont été obtenus au moment de la greffe et complétés au besoin par les méthodes décrites précédemment. Les patients possédant des DSA contre la classe II ont été enlevés de cette analyse.

La Figure 14 permet d'évaluer le rôle des DSA contre la classe I en comparant dans un analyse univariée les patients en possédant de ceux n'en possédant pas. La différence de probabilité de survie du greffon entre les patients avec DSA spécifique aux antigènes de la classe I (n=7) et les patients du groupe témoin (n=159) de notre cohorte a été déterminée significative (P=0.015) par une analyse statistique *Log Rank* des courbes de Kaplan-Meier. Les patients DSA+ contre les antigènes de la classe I sont plus à risque de perdre leur greffon que l'ensemble de la population à l'étude.

Contrairement aux antigènes de classe I, les antigènes de classe II sont exprimés principalement dans un contexte inflammatoire sur les cellules endothéliales. Il est intéressant d'investiguer le rôle de ces DSA contre les antigènes de classe II en comparaison avec des patients sans DSA. Nous envisageons que la survie du greffon sera différente entre les groupes.

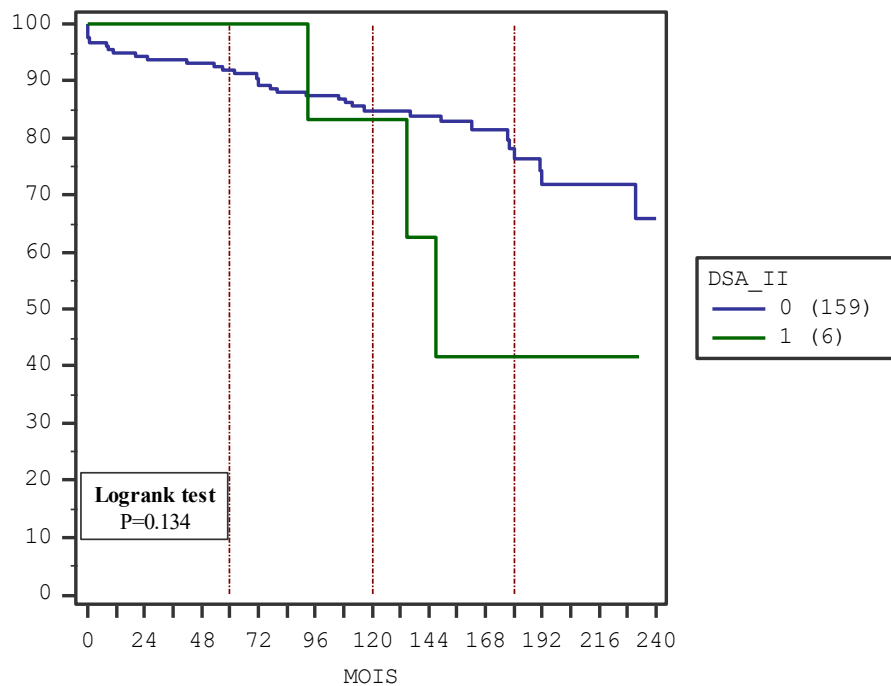


Figure 15 : Probabilité de survie du greffon non significativement différente entre le groupe témoin et le groupe avec DSA contre HLA classe II

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients effectués entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les patients ont été divisés en deux groupes : les patients sans DSA contre la classe II (groupe 0, n=159) et les patients avec des DSA prégreffe contre la classe II (groupe 1, n=6). L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'accent sur chaque bond de 5 ans. Les anticorps anti-HLA ont été détectés et analysés tel que décrit précédemment. Les HLA des patients et des donneurs ont été obtenus au moment de la greffe et complétés au besoin par les méthodes décrites précédemment. Les patients possédant des DSA contre la classe I ont été enlevés de cette analyse.

La Figure 15 permet d'évaluer le rôle des DSA contre la classe II en comparant dans une analyse univariée les patients en possédant de ceux n'en possédant pas. La différence de probabilité de survie du greffon entre les patients avec DSA spécifique aux antigènes de la classe II (n=6) et les patients du groupe témoin (n=159) de notre cohorte a été déterminée non significative ($P=0.134$) par une analyse statistique *Log Rank* des courbes de Kaplan-Meier. Malgré ce résultat, la courbe des patients avec DSA contre les antigènes de classe II semble bien différente à partir de la 10^{ème} année de greffe.

Nous savons que les DSA prégreffes sont un facteur diminuant la survie du greffon rénal. Nous avons voulu investiguer pour voir si les patients avec des DSA dirigés contre une spécificité avaient une survie du greffon différente de ceux en ayant au moins deux. Nous soupçonnons que les patients avec plus d'une spécificité de DSA, indépendamment de leur classe visée, auront une survie du greffon inférieure à ceux n'en possédant qu'une seule puisque les possibilités de cibles augmentent.

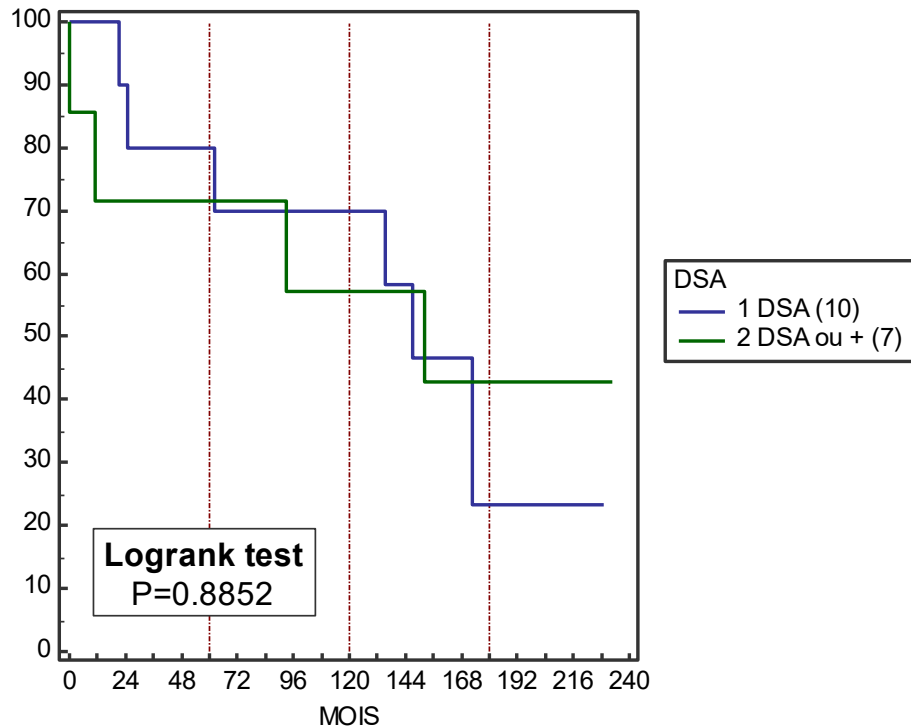


Figure 16 : Probabilité de survie du greffon non significativement différente entre les patients avec 1 DSA et les patients avec 2 DSA ou plus

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients effectués entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les patients ont été divisée deux groupes : les patients DSA+ contre une seule spécificité HLA (groupe 1 DSA, n=10) et les patients avec des DSA prégreffe contre au moins deux spécificités HLA (groupe 1, n=7). Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les anticorps anti-HLA ont été détectés et analysés tel que décrit précédemment. Les HLA des patients et des donneurs ont été obtenus au moment de la greffe et complétés au besoin par les méthodes décrites précédemment. Les patients sans DSA ont été enlevés de cette analyse.

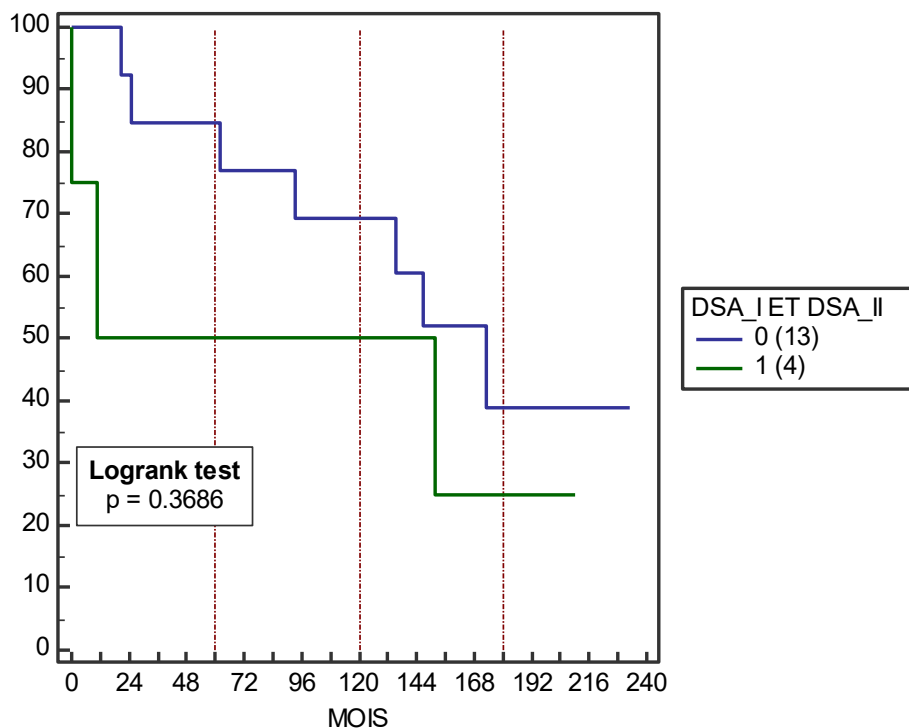


Figure 17 : Probabilité de survie du greffon non significativement différente entre les patients avec DSA contre une seule classe et le groupe avec DSA dirigé contre les classes I et II

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients effectués entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les patients ont été divisée deux groupes : les patients DSA+ sans DSA contre la classe I&II (groupe 0, n=13) et les patients avec des DSA prégreffe contre la classe I&II (groupe 1, n=4). L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les anticorps anti-HLA ont été détectés et analysés tel que décrit précédemment. Les HLA des patients et des donneurs ont été obtenus au moment de la greffe et complétés au besoin par les méthodes décrites précédemment. Les patients sans DSA ont été enlevés de cette analyse.

La Figure 16 et la Figure 17 permettent d'évaluer le rôle de la présence entre un ou plusieurs DSA chez un patient. La différence de probabilité de survie du greffon entre les patients avec un seul DSA (10) et ceux ayant deux DSA ou plus (n=7) de notre cohorte a été déterminée non significative. De même, la différence de probabilité de survie du greffon entre les patients avec DSA contre les antigènes des classes I et II (n=4) et les patients avec des DSA contre une seule des deux classes (n=13) de notre cohorte n'a pas été déterminée significative (P=0.3686) par une analyse statistique *Log Rank* des courbes de Kaplan-Meier. Par contre, pour il est intéressant de noté que la

survie du greffon des patients DSA I&II+ est grandement affectée durant la première année post-greffe.

Comme nous l'avons observé précédemment, les antigènes des deux classes de HLA ne sont pas distribuée de la même façon entre eux. De plus, la proportion des molécules des différents locus à la surface cellulaires n'est pas la même à l'intérieur même des classes de HLA. Ainsi, les allèles des locus A et B sont plus exprimés que les allèles du locus C, les antigènes du locus DR sont en plus forte expression que ceux de DP [79-83].

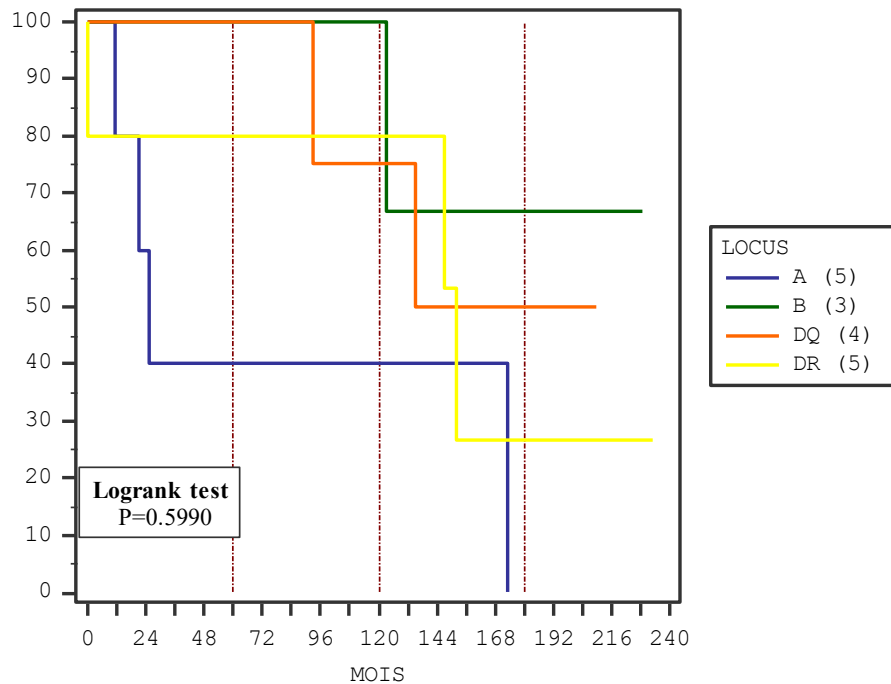


Figure 18 : Probabilité de survie du greffon non significativement différente entre les DSA dominants des différents loci

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients effectués entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les anticorps anti-HLA ont été détectés et analysés tel que décrit précédemment. Les HLA des patients et des donneurs ont été obtenus au moment de la greffe et complétés au besoin par les méthodes décrites précédemment. Les patients sans DSA ont été enlevés de cette analyse.

La Figure 18 permet d'évaluer dans une analyse univariée le rôle des DSA selon les antigènes du locus ciblé. La différence de probabilité de survie du greffon entre les patients avec DSA contre les antigènes des différents loci (n=17) a été déterminée non significative (P=0.599) par une analyse statistique *Log Rank* des courbes de Kaplan-Meier. Malgré ces résultats, il apparaît important de souligner que tous les patients ayant des DSA contre les antigènes du locus ont perdu leur greffon, dont la majorité dans les 5 premières années.

Dans un contexte de greffe, plus nous avons des différences au niveau des HLA plus grandes sont les chances d'avoir une incompatibilité. En effet, les patients possédant un ou des HLA identiques à leur donneur auront moins de possibilité de développer des anticorps contre leur donneur puisque les sentinelles du système immunitaire reconnaîtront cette molécule comme faisant parti du soi. Nous envisageons donc que plus il y aura de *mismatch*, moins longue sera la survie du greffon dans le temps.

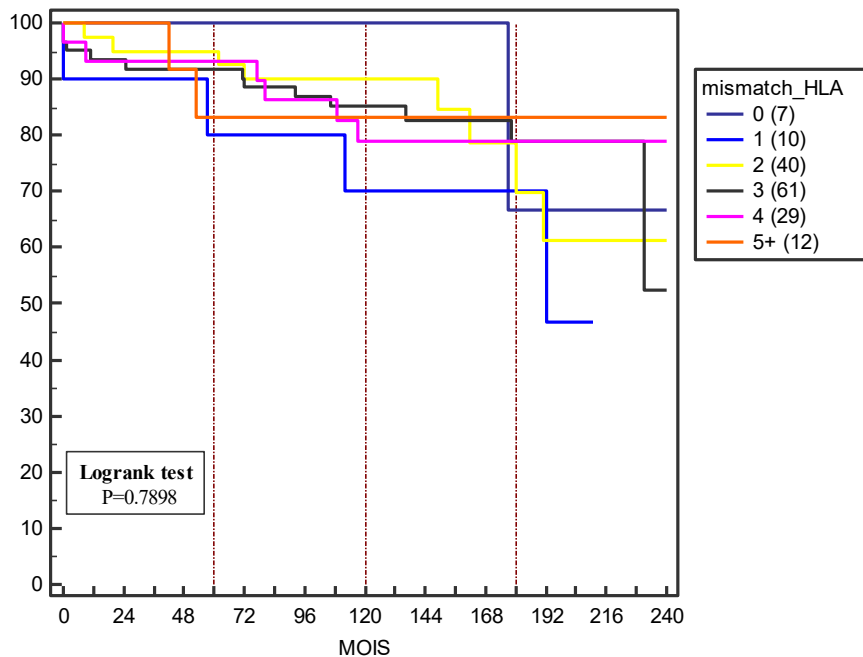


Figure 19 : Probabilité de survie du greffon non significativement différente entre le nombre de *Mismatch* A-B-DR

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients effectués entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

La Figure 19 permet d'évaluer dans une analyse univariée le rôle du nombre de *mismatch* (HLA non-identique) pour les loci HLA-A, HLA-B et HLA-DR. Le nombre de *mismatch* HLA n'a pas joué de rôle dans la survie dans le temps du greffon rénal. Par contre, la stratégie de favorisé la concordance a eu comme effet que des patients ont été greffé sans incompatibilité. De ce groupe, la première perte de greffon n'est arrivé qu'un peu avant la 15^{ème} année de greffe.

Nous avons observé une prévalence d'anticorps anti-HLA plus élevée chez les femmes de la cohorte (Tableau 8 : Caractéristiques cliniques et immunologiques de la cohorte de patients de l'étude suite...) pouvant potentiellement augmenter le risque de DSA pré-greffe et donc éventuellement la survie du greffon.

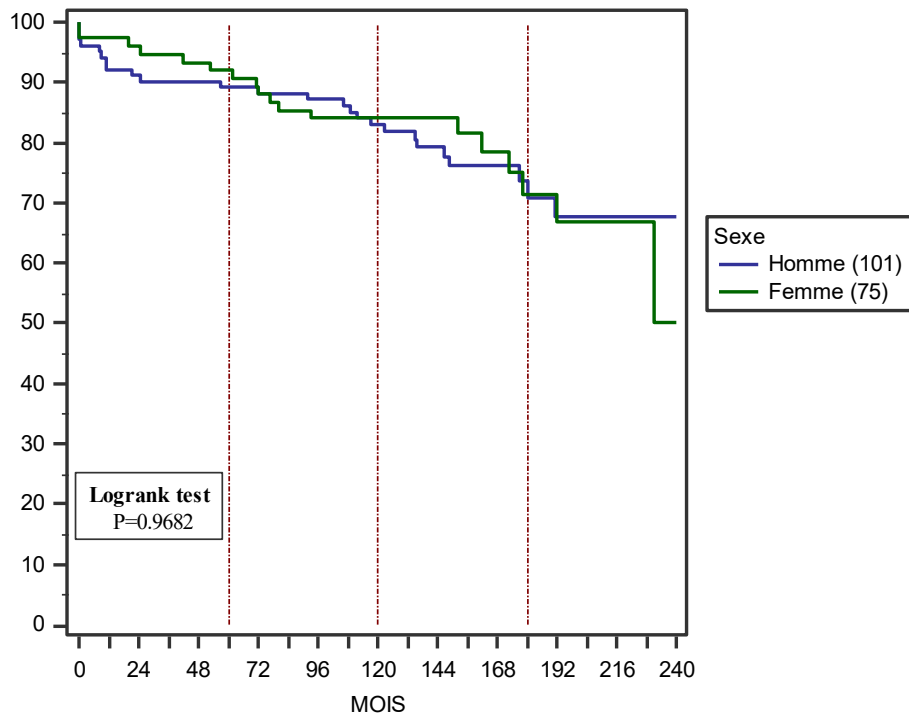


Figure 20 : Pourcentage de survie du greffon non significativement différent entre les hommes et les femmes transplantés

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients effectués entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

La Figure 20 permet de comparer la survie du greffon entre les hommes et les femmes de notre cohorte. Il n'y a pas de différence significative de survie entre les hommes et les femmes. Malgré un pourcentage plus élevé de femmes avec des anticorps anti-HLA (voir Tableau 8) en lien avec le risque supplémentaire d'immunisation aux HLA foetaux paternels, et contrairement à ce que nous pouvions anticiper, les DSA n'étaient pas plus fréquents chez les femmes que chez les hommes (P=0.6974).

Le rejet d'un organe transplanté peut être de sources diverses. Le diagnostic de ces rejets est effectué par des pathologistes selon les critères de Banff impliquant entre autres la présence ou l'absence de divers critères comme l'infiltration et le type de cellules immunitaires, la structure atteinte, les structures affectées, la nécrose des tissus ou des dépôts moléculaires. Devant le nombre de possibilités, il est vraisemblable que le destin d'un greffon suite à un diagnostic de rejet soit relié au type de rejet subit.

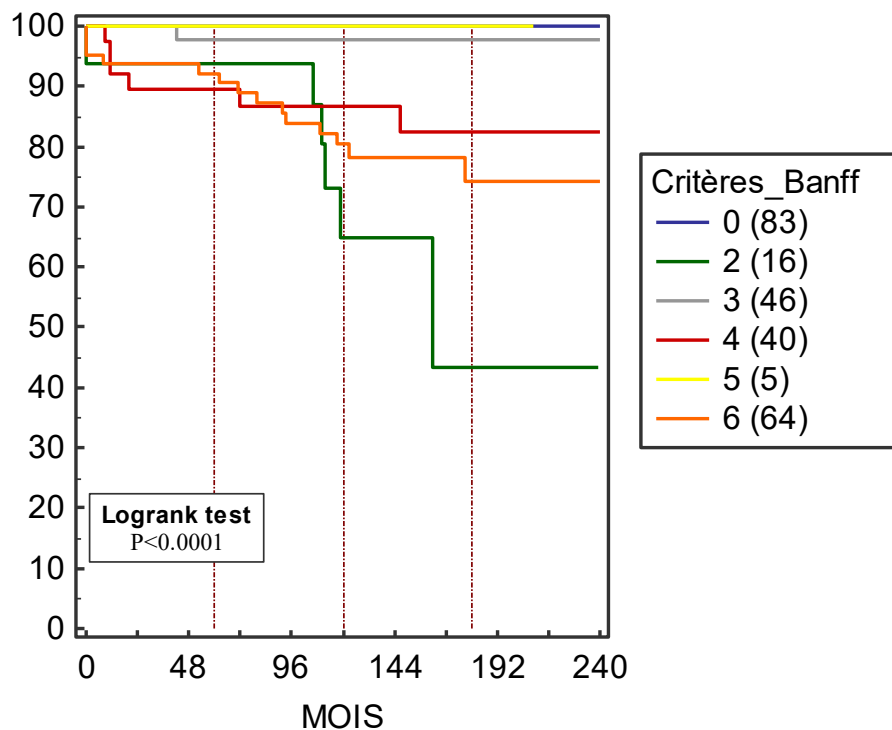


Figure 21: La survie du greffon significativement différente en fonction du type de rejet

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 93 patients pour 144 biopsies de suspicion de rejet et 83 patients sans suspicion de rejet (sans biopsie) entre 1994 et 2006 pour les patients suivis à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les informations des patients ont été extraites à partir de la base de données du laboratoire d'histocompatibilité IAF-INRS et de la base de données *Transplantation* de l'équipe de transplantation rénale du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, site Notre-Dame. L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les critères de Banff sont décrits au point 7.1. Patients par type de rejet : rejet humoral (critères Banff 2, n=13), rejet limite (critères Banff 3) n=40, rejet cellulaire (critères Banff 4, n=27), étiologie inconnu (critères Banff, n=5), autre cause (Critères Banff 6 n=52).

Nous avons comparé dans une analyse univariée les différents diagnostics obtenus par biopsie et les conséquences sur la survie du greffon rénal. Les biopsies ont été effectuées soit en cas de suspicion de rejet, soit lors d'une évaluation d'investigation périodique. Ce ne sont pas tous les patients de cette étude qui ont eu une biopsie. Il est à noter que nous comparons les diagnostics entre eux. Tel que montré à la Figure 21, la survie du greffon est différente selon le diagnostic de rejet, plus de 50% des patients diagnostiqués avec un rejet humoral ont perdu leur greffon tandis que plus de 80 % des patients ayant eu un rejet cellulaire avaient un greffon fonctionnel au 31 décembre 2015.

Certaines études comparables à la nôtre ont observé une différence significative sur la survie du greffon rénal pour les patients avec un greffon d'origine cadavérique et ceux provenant d'un greffon vivant. Le temps d'ischémie différent entre les groupes est probablement un des facteurs expliquant cette différence. Nous avons analysé ces paramètres pour notre cohorte. Les Figure 22 Figure 23 Figure 24 illustrent nos résultats.

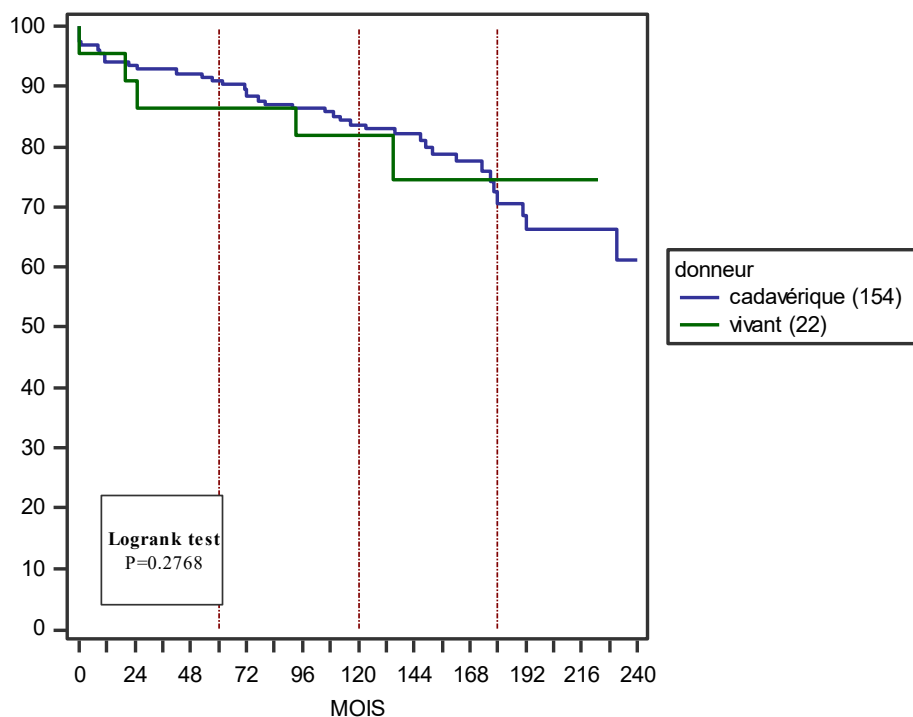


Figure 22 : Pourcentage de survie du greffon non significativement différent entre les différents types de donneurs

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients transplantés entre 1994 et 2006 à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les informations des patients ont été extraites à partir de la base de données du laboratoire d'histocompatibilité IAF-INRS et de la base de données *Transplantation* de l'équipe de transplantation rénale du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, site Notre-Dame. L'événement modélisé, la fin de vie du greffon, a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

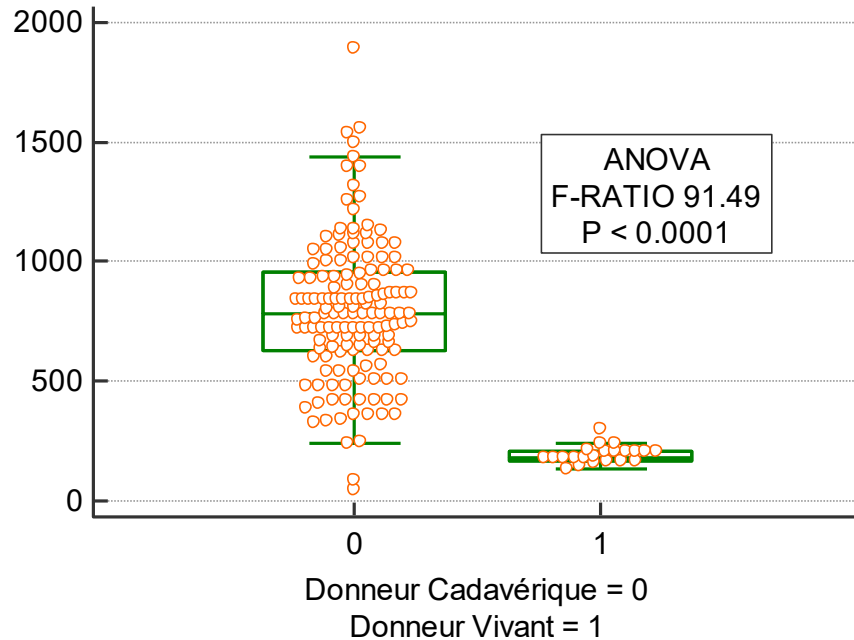


Figure 23: Temps moyens (minutes) d'ischémie significativement différents entre les patients ayant reçu un greffon de donneur vivant et ceux ayant reçu un greffon de donneur cadavérique

Légende : Ischémie moyenne de 176 patients transplantés entre 1994 et 2006 à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les informations des patients ont été extraites à partir de la base de données du laboratoire d'histocompatibilité IAF-INRS et de la base de données *Transplantation* de l'équipe de transplantation rénale du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, site Notre-Dame. Le temps d'ischémie a été observé par l'équipe soignante. Les analyses statistiques *Anova* et le graphique ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

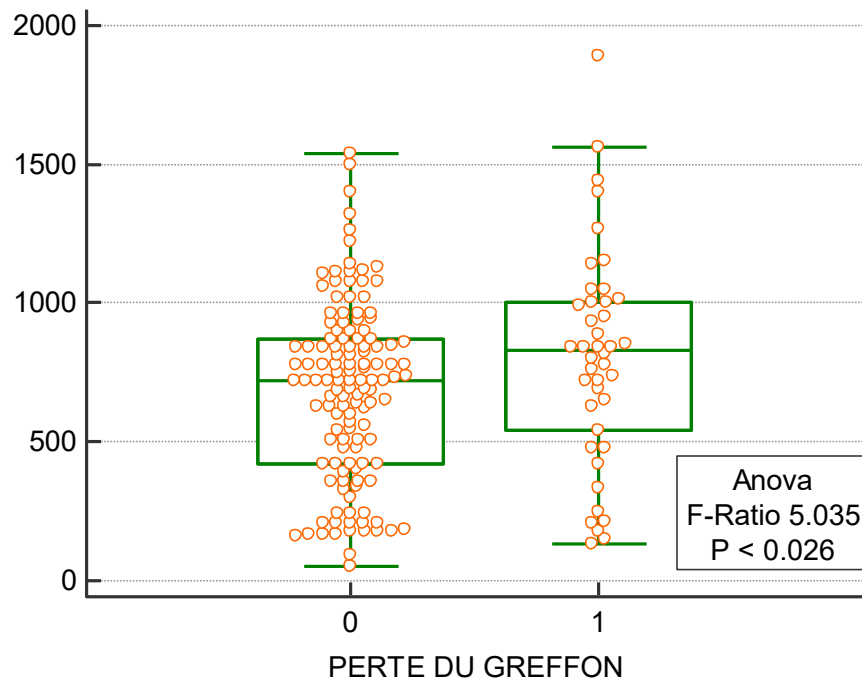


Figure 24: Temps moyens (minutes) d'ischémie significativement différents entre les patients qui avaient un greffon fonctionnel au 31 décembre 2015 et ceux l'ayant perdu pour les patients ayant reçu un greffon d'origine cadavérique

Légende : Ischémie moyenne de 154 patients transplantés entre 1994 et 2006 à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Les informations des patients ont été extraites à partir de la base de données du laboratoire d'histocompatibilité IAF-INRS et de la base de données *Transplantation* de l'équipe de transplantation rénale du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, site Notre-Dame. Le temps d'ischémie a été observé par l'équipe soignante. Les analyses statistiques *Anova* et le graphique ont été complétés par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Les Figure 22, Figure 23 et Figure 24 permettent de comparer la survie du greffon en fonction du temps d'ischémie et de la provenance de l'organe (vivant ou cadavérique). Contrairement à d'autres études, nous n'avons pas constaté que la provenance du greffon entre donneurs vivants et cadavériques affectait sa survie dans le temps (Figure 22, $p=0.2768$) malgré une différence significative entre leurs temps d'ischémie respectif (Figure 23, $p<0.0001$). Par contre, nous observons une différence significative entre les moyennes de temps d'ischémie de greffon d'origine cadavérique chez les patients ayant un greffon fonctionnel au 31 décembre 2015 et ceux l'ayant perdu durant l'étude (Figure 24, $p<0.026$). L'augmentation du temps d'ischémie est un facteur néfaste connu pour la survie du greffon [84]. Toutefois, le résultat de la figure 23 n'est pas des plus robustes.

Lorsque la valeur d'ischémie la plus élevée est enlevée (1890 minutes), la différence n'est plus significative (p=0.076).

9.5 Facteurs associés à la survie du greffon – Analyses multivariées

Tableau 9 : Analyse multivariée des facteurs influençant la survie du greffon

Covariable	P	Intervalle de confiance	Risque Relatif à 95%
Tacrolimus et MMF	0.0055	0.37	0.18 to 0.74
DSA POS	0.0476	2.18	1.00 to 4.71
AGE À LA GREFFE	0.0002	0.95	0.93 to 0.97

Légende : Pourcentage de survie du greffon de 176 patients transplantés entre 1994 et 2006 à l'hôpital Notre-Dame. L'ensemble de la cohorte de 176 patients a été suivi à partir du jour 1 de leur greffe jusqu'au plus tard le 31 décembre 2015. Variable dépendante : perte du greffon. Les covariables analysées sont la présence de DSA, l'âge à la greffe, et les patients recevant la combinaison d'immunosuppresseurs Tacrolimus et MMF. Les informations des patients ont été extraites à partir de la base de données du laboratoire d'histocompatibilité IAF-INRS et de la base de données *Transplantation* de l'équipe de transplantation rénale du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, site Notre-Dame. La fin de vie du greffon a été observée par l'équipe soignante. Les lignes rouges pointillées mettent l'emphase sur chaque bond de 5 ans. Les analyses statistiques et les graphiques ont été complétées par le logiciel MEDCALC® v18.6.

Le Tableau 9 permet de visualiser les effets significatifs combinés des différents facteurs influençant la survie du greffon. Une fois ajustée les uns pour les autres, la présence de DSA a un effet significativement néfaste sur la survie du greffon (risque relatif (HR) à 2.18, intervalle de confiance à 95% (IC) = 1.01 à 4.71). L'augmentation de l'âge à la greffe a un effet protecteur significatif sur la survie du greffon, (HR= 0.95 IC = 0.93 à 0.97). Également, la prise du duo pharmacologique tacrolimus et MMF est un facteur significativement bénéfique pour la survie du greffon (HR= 0.37, IC = 0.18 à 0.74).

10 DISCUSSION

10.1 Les défis du recrutement

Après avoir reçu l'aval des différents comités d'éthique des institutions impliquées, le recrutement des patients de cette cohorte s'est échelonné sur une période d'environ 6 mois entre le mois de juin 2015 et le mois de janvier 2016. D'abord, les patients identifiés ont reçu un appel téléphonique au cours duquel nous sollicitons leur accord pour recevoir un document explicatif de-même qu'un formulaire de consentement à nous retourner (voir section 9. Annexes). Une majorité des patients rejoints ont accepté de recevoir les documents mentionnés. Les patients n'ayant pu être rejoint à la suite de 3 tentatives de communication par téléphone ont reçu, à leur dernière adresse connue, les même documents cités plus haut. La cohorte à l'étude est donc composée de patients volontaires. Ce type de cohorte peut renfermer un déséquilibre du taux de survie du greffon entre volontaires et ceux ayant refusé (ou n'ayant pas répondu aux sollicitations). Les gens ayant eu une belle expérience suivant leur greffe pourraient être plus à même de vouloir intégrer des études comme celle-ci contrairement à ceux ayant rapidement éprouvé des « problèmes ». Certains patients nous ont clairement expliqué leur refus par divers grief envers l'équipe soignante. Toutefois, les refus clairement exprimés ne sont pas nombreux. La majorité des non-participants font partie des patients que nous ne sommes pas arrivés à rejoindre par téléphone. Des patients greffés correspondant aux critères d'inclusion de cette étude mais décédés avant le 1 janvier 2007 ne sont pas représentés dans cette étude. La majorité des études semblables incluaient la totalité des greffes de la période à l'étude. Les résultats obtenus dans cette étude sont donc à considérer avec un regard critique. Ceci dit, le taux de survie des greffons pour les patients participant à l'étude se compare avantageusement aux taux retrouvés dans la littérature : plus de 90 % après 5 ans, près de 85 % après 10 ans et plus de 70 % après 15 ans [15]. En comparaison, les patients greffés du rein (donneur cadavérique) en 2010 aux États-Unis avaient un taux de survie de plus ou moins 70 % à 5 ans postgreffe [85].

10.2 La survie du greffon et les DSA

Nous avons obtenu un plus faible pourcentage de patients ayant des DSA au moment de la greffe (9.6%) en comparaison avec d'autres études semblables (14 % DSA+ 2003-2007 [18] & 35 % DSA+ 1990-2009 [12]). À première vue, cela est tout de même surprenant puisque les méthodes de détection d'anticorps dans les premières années à l'étude n'étaient pas aussi sensibles qu'aujourd'hui. En revanche, les études semblables incluaient la totalité des transplantations de la période à l'étude et elles se terminaient bien avant la nôtre. Aussi, elles n'utilisaient pas nécessairement les mêmes valeurs seuils pour le diagnostic de la présence d'un anticorps anti-HLA chez le patient. Cette étude nous permet de valider que la présence de DSA prégreffe non détecté au moment de la greffe a eu un effet néfaste sur la survie à long terme du greffon rénal. La population de cette étude n'avait jamais été incluse dans ce type d'étude rétrospective et nous pouvons maintenant confirmer les effets délétères des DSA prégreffe non détectés par les analyses de détection d'anticorps de cette période.

La Figure 12 démontre l'absence de relation entre la survie du greffon rénal et la présence d'anticorps anti-HLA non spécifiques du donneur. Les anticorps anti-HLA ont pour cible des épitopes spécifiques présents sur une ou des protéines HLA distinctes. Comme le donneur ne possède pas ces cibles antigéniques, les anti-HLA non DSA ne sont pas en mesure de s'ancrer et n'ont donc aucun effet.

La Figure 13 permet de confirmer, pour notre cohorte de patients, l'impact négatif de la présence de DSA prégreffes non détectés par les méthodes sérologiques sur la survie du greffon rénal. Bien que les patients DSA+ n'aient pas un titre d'anticorps suffisamment élevé pour être révélé lors d'analyses sérologiques, les cellules B mémoires peuvent être réactivées, se multiplier et ces anticorps DSA conduisent à des épisodes de rejet humoral chronique difficilement contrôlable par la médication actuelle. Ces DSA prégreffe peuvent donc mener à la perte du greffon.

Les Figure 14 Figure 15 tendent à démontrer le rôle des DSA spécifiques des différentes classes d'HLA. Les antigènes HLA de classe I étant exprimés de façon constitutive, nous pensions que les conséquences se révéleraient plus rapidement que les DSA contre les antigènes de la classe II. Bien que non prouvée par ces analyses, cette tendance semble se révéler probable puisque la première perte de greffon liée à un DSA dirigé contre les antigènes de classe II n'intervient pas avant la septième année après la greffe contre la deuxième année pour les DSA dirigés contre les antigènes de la classe I.

La Figure 16 permet de constater que ce n'est pas l'augmentation du nombre de DSA et donc des cibles antigéniques potentielles mais bien la présence en elle-même de DSA qui serait néfaste pour la survie du greffon. Par contre, en se basant sur la Figure 17, la présence combinée de DSA contre les antigènes de classes I et II pourrait avoir un effet délétère sur la survie du greffon rénal. En effet, la moitié des patients présentant ce profil a perdu leur greffon dans l'année suivant leur transplantation. Le nombre patients ayant des DSA contre les antigènes des deux classes d'HLA (n=4) n'est toutefois pas assez élevé pour en tirer des conclusions convaincantes. Par contre, la présence des DSA spécifiques aux antigènes de classe I pourrait jouer le rôle de catalyseur de la réponse inflammatoire locale et pourrait induire l'expression des antigènes de classe II sur les cellules endothéliales. Ceci aurait pour effet de potentialiser l'inflammation en permettant aux DSA de classe II de se lier également [37]. Une autre explication possible, selon l'étude de Fidler en 2013, est que les patients ayant des anticorps dirigés contre les classes I et II aient également une concentration relative plus élevée d'anticorps anti-HLA que ceux ayant des anticorps seulement contre la classe I ou la classe II [15]. Il existe plusieurs manières d'affiner la détection d'anticorps et leur titre relatif (EDTA, DTT etc.) mais dans cette étude, nous nous sommes contentés de décomplémenter les sérums. Certains titres de sérums prégreffe peuvent avoir été sous- ou sur-estimés à cause de la réactivité croisée possible pour des épitopes HLA partagés ou de l'effet prozone pour les sérums de patients ultrasensibilisés.

Selon la Figure 18, la survie du greffon des patients greffés en présence de DSA ne semble pas dépendante de la spécificité antigénique associée au locus. Il est cependant intéressant de constater que tous les patients avec une spécificité contre les antigènes du locus A ont perdu leur greffon. Par contre, ce résultat devrait être interprété avec prudence étant donné le faible nombre (5) de patients présentant cette condition.

Le nombre de *mismatch* au niveau des antigènes des locus A, B et DR ne semble pas jouer de rôle dans la perte du greffon. En se basant sur la Figure 19, sans DSA prégreffe, le risque associé avec un nombre de *mismatch* supérieur est la création d'anticorps *de novo*. Il serait intéressant, si possible, d'obtenir un sérum actuel dans le but de vérifier cette hypothèse. Bien que nos résultats ne semblent pas le prouver, le fait de favoriser par algorithme un minimum de *mismatch* pour les locus A-B-DR a peut-être contribué à éviter des greffes malgré la présence de DSA indétectable. En effet, les gènes codants pour les molécules HLA-DR sont placés physiquement très près de ceux codants pour les molécules HLA-DQ. Cette proximité DR-DQ crée un déséquilibre de liaison : la conservation de cette association de deux gènes à travers les générations. Lorsque l'on attribue de la valeur à la concordance entre les DR du donneur et du receveur, ceci a comme effet possible d'obtenir des DQ identiques. Dernièrement, des études ont démontré que la production d'anticorps anti-HLA *de novo* se fait de façon préférentielle contre les antigènes des DQ [86].

Tel que démontré par la Figure 20 et malgré un pourcentage plus élevé de femmes avec des anticorps anti-HLA (voir Tableau 8) en lien avec le risque supplémentaire d'immunisation aux HLA foetaux paternels, et contrairement à ce que nous pouvions anticiper, les DSA n'étaient pas plus fréquents chez les femmes que chez les hommes ($P=0.6974$). Comme les anticorps anti-HLA n'ont pas affecté le taux de survie du greffon (Figure 12 : Probabilité de survie du greffon non significativement différente entre le groupe sans anti-HLA et le groupe avec anti-HLA non-DSA), il n'est alors nullement surprenant que le sexe du receveur ne soit pas un facteur déterminant pour la survie du greffon.

10.3 La survie du greffon et les autres problématiques

La Figure 21 permet d'évaluer les conséquences de ces types de rejet sur notre population. Les patients (1) « sans suspicion de rejet » étudiés possédaient tous un greffon rénal fonctionnel au 31 décembre 2015. Les patients ayant eu un rejet de type *borderline* (indices de rejet sans être caractérisable en 2, 4, 5 ou 6) ont un pourcentage de survie du greffon à près de 85 % à 10 ans postgreffe. Le diagnostic d'un rejet humoral (Banff 2) selon les standards de Banff est un indice de prédiction négatif par rapport à ceux sans suspicion de rejet ou ayant un rejet de type *borderline*. De même, le rejet cellulaire (Banff 4) est également un indice de prédiction négatif par rapport à ceux sans suspicion de rejet ou ayant un rejet de type *borderline*. Le rejet de type *borderline* (Banff 3) peut être le début d'un rejet aigu, cellulaire ou humoral ou l'infiltration de cellules protectrices T régulatrices en réponse à un rejet préalable. Le choix de traiter ou non ce type de rejet se prend par l'équipe soignante. Le rejet cellulaire (Banff 4) aigu ou chronique non traité mène à des lésions sur les différentes sections du greffon, diminuant ses capacités fonctionnelles et menant potentiellement à la perte du greffon. Ce type de rejet est souvent diagnostiqué à court terme après la greffe, mais peut survenir à n'importe quel moment postgreffe.

Le Tableau 9 démontre qu'un greffon plus jeune représente un facteur bénéfique pour la survie du greffon rénal. La Figure 22 démontre que contrairement à d'autres études, les patients dont le greffon provient d'un donneur vivant n'ont pas une survie significativement différente des patients dont le greffon provient d'un donneur cadavérique. Du point de vue du temps d'ischémie, la faible robustesse de nos résultats à la Figure 23 et à la Figure 24 ne permet pas des observations concluantes. Pourtant, il est reconnu que l'augmentation du temps d'ischémie froide d'un organe augmente la probabilité d'effets délétères lors de la reperfusion de l'organe. Les cellules endothéliales et épithéliales lésées libéreront davantage de messagers chimiques favorisant l'infiltration cellulaire via surexpression de VCAM-1 [82].

L'âge des patients au moment de la greffe est un facteur bénéfique à la survie du greffon. Les patients greffés à un âge plus avancé gardent leur greffon plus longtemps que les patients greffés plus jeunes. Mis à part les effets inattendus éventuels d'une cohorte de volontaires, il est décrit dans la littérature que les patients plus âgés seraient mieux disciplinés dans la prise de leur médication, donc moins sujets au développement d'anticorps *de novo* [87, 88].

Les patients ayant reçu majoritairement la combinaison tacrolimus et MMF (Tableau 9) ont gardé leur greffon plus longtemps. Il apparaît logique que cette combinaison améliore la survie à long terme du greffon puisque, comme mentionné au point 6.5.1, les effets secondaires du tacrolimus sont moindres, celui-ci étant moins cytotoxique que la cyclosporine. À noter que notre étude couvre une période durant laquelle le tacrolimus n'était pas disponible ou utilisé abondamment. Il serait intéressant de voir si cette tendance se maintient lorsque l'on augmentera le nombre de patients à l'étude et comparera en parallèle les deux inhibiteurs de calcineurine. Le rejet cellulaire est le plus souvent observé dans la première année post greffe. Lorsque ce type de rejet arrive tardivement, il est souvent associé à la non-adhérence aux agents immunosuppresseurs prescrits [89]. Le rejet humoral, à l'exception du rejet hyperaigu provoqué par des DSA, se présente normalement plus tardivement. Le patient est exposé aux antigènes de son greffon pour lequel il a des cellules B mémoires capables de se réactiver. Le rejet humoral est chronique et se traite difficilement. Les rejets associés aux autres causes varient de par leur nature. Par contre, la cause primordiale de ce type de rejet est la toxicité médicamenteuse. En effet, les immunosuppresseurs sont néphrotoxiques et une exposition prolongée peut mener à la perte de fonctionnalité du greffon. Le traitement de ce type de rejet se réduira à changer de type d'agents immunosuppresseurs ou d'en diminuer les doses, ouvrant potentiellement la porte à des rejets cellulaires et humoraux.

Dans le futur et pour le bien de la recherche, il pourrait être pertinent que l'ensemble des patients sur les listes de receveurs d'organes se voit proposer de signer un accord pour que leur historique médical et les prélèvements corporels non utilisés

puissent être utilisés dans la recherche sur le don d'organe, même advenant leur décès. Ceci permettrait d'avoir une vision globale de l'ensemble des transplantations et du succès ou de l'échec de l'implantation de nouvelles méthodes d'attribution ou de diagnostic divers. La participation à cette étude étant volontaire, le nombre de patients inclus est relativement faible. Cette faible participation nous a empêché de creuser à travers l'ensemble des paramètres que nous souhaitons investiguer, par exemple l'étude des classes et l'intensité relative ajustée et des loci de DSA. De même, les analyses multivariées n'ont pas été concluantes par faute d'événements comparables.

Il semble bien avisé pour les laboratoires d'histocompatibilité de toujours bien identifier les anticorps anti-HLA prégreffe, car nous savons que ceux-ci peuvent avoir des effets qui limiteront la survie à long terme du greffon. De nos jours, de nombreuses techniques se sont ajoutées pour bien faire la discrimination des anticorps anti-HLA inacceptables ; parmi celles-ci, l'identification des anticorps capables d'activer le complément par la détection de protéines issues de sa cascade, la capacité d'éluder la présence d'anticorps non pertinents pouvant interférer dans la liaison anticorps-antigènes. Ces méthodes, espérons-le, permettront de faire augmenter le taux de survie à long terme des greffons.

Le nombre de patients avec DSA est insuffisant pour pouvoir tirer des conclusions sur les rôles de la spécificité antigénique des loci. Nous avons tout de même validé une nouvelle méthode de détection par anticorps nous permettant l'identification d'une plus grande bibliothèque d'anticorps anti-HLA spécifiques de même que de nouvelles combinaisons *alpha bêta* pour mieux discriminer les anticorps contre les molécules de la classe II.

11 CONCLUSION

La présence d'anticorps anti-HLA spécifiques au donneur a été confirmée comme étant un facteur diminuant la survie du greffon rénal. C'est, à notre connaissance, la première étude sur le rôle des DSA pour la population du Québec et, en particulier, celle du grand Montréal. Certains points que nous voulions étudier, tels l'étude des classes, de l'intensité relative ajustée et des loci de DSA ne furent pas possibles par manque d'événements comparables. Afin de valider les observations effectuées, il est essentiel de poursuivre l'étude en y ajoutant des patients greffés durant la période 1994-2006 inclusivement. Le faible taux de recrutement (moins de 50 %) représente un réel obstacle. En ce sens, nous avons approché de nouveaux collaborateurs associés à un autre centre de transplantation rénale de la grande région montréalaise. Cette approche multicentrique nous permettrait de minimalement doubler le nombre de patients inclus. De plus, nous prévoyons modifier l'approche pour le recrutement des patients afin de maximiser l'enrôlement. Nous envisageons d'approcher nos futurs patients lors de leurs suivis externes à l'hôpital pour créer un climat de confiance.

12 RÉFÉRENCES

1. Murphy, K.e.a., *Janeway's Immunobiology*, ed. 7. Vol. 7. 2008. 887.
2. Ponticelli, C., [*Innate immunity and transplantation*]. *G Ital Nefrol*, 2015. **32 Suppl 64**.
3. Spahn, J.H., W. Li, and D. Kreisel, *Innate immune cells in transplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2014. **19**(1): p. 14-9.
4. Farrar, C.A., J.W. Kupiec-Weglinski, and S.H. Sacks, *The innate immune system and transplantation*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(10): p. a015479.
5. Li, X.C., *Transplantation immunology*, ed. AST. 2016: Wiley Blackwell.
6. Chen, W., R.M. Ghobrial, and X.C. Li, *The Evolving Roles of Memory Immune Cells in Transplantation*. *Transplantation*, 2015. **99**(10): p. 2029-37.
7. Cucchiari, D., M.A. Podesta, and C. Ponticelli, *The Critical Role of Innate Immunity in Kidney Transplantation*. *Nephron*, 2016. **132**(3): p. 227-37.
8. Quiroga, I., et al., *Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(6): p. 1689-96.
9. Georgel, P., *Innate immune receptors in solid organ transplantation*. *Hum Immunol*, 2016. **77**(11): p. 1071-1075.
10. Monteverde, M.L., et al., *Donor-specific anti-HLA antibodies in pediatric renal transplant recipients with creeping creatinine: Prevalence, histological correlations, and impact on patient and graft survival*. *Pediatr Transplant*, 2015. **19**(7): p. 684-90.
11. Badders, J.L., et al., *Variable HLA expression on deceased donor lymphocytes: Not all crossmatches are created equal*. *Hum Immunol*, 2015. **76**(11): p. 795-800.
12. Schreuder, G.M., et al., *HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens*. *Hum Immunol*, 2005. **66**(2): p. 170-210.
13. Lucas, D.P., M.S. Leffell, and A.A. Zachary, *Differences in immunogenicity of HLA antigens and the impact of cross-reactivity on the humoral response*. *Transplantation*, 2015. **99**(1): p. 77-85.
14. Kalia, V., et al., *Differentiation of memory B and T cells*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(3): p. 255-64.
15. Mehra, N.K. and A.K. Baranwal, *Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation*. *Int J Immunogenet*, 2016. **43**(6): p. 351-368.
16. Wu, P., et al., *Impact of alloantibody strength in crossmatch negative DSA positive kidney transplantation*. *Clin Biochem*, 2013. **46**(15): p. 1389-93.
17. Sarhane, K.A., et al., *A critical analysis of rejection in vascularized composite allotransplantation: clinical, cellular and molecular aspects, current challenges, and novel concepts*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 406.
18. Petra, H., et al., *Molecular profiling of acute and chronic rejections of renal allografts*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 509259.
19. Haas, M., et al., *Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions*. *Am J Transplant*, 2014. **14**(2): p. 272-83.
20. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(26): p. 2715-29.

21. Op den Buijsch, R.A., et al., *Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2007. **21**(4): p. 427-35.
22. Bergan, S., S. Bremer, and N.T. Vethe, *Drug target molecules to guide immunosuppression*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 411-8.
23. Barbarino, J.M., et al., *PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways*. *Pharmacogenet Genomics*, 2013. **23**(10): p. 563-85.
24. Alghamdi, S., et al., *Cyclosporine versus tacrolimus maintenance therapy in renal transplant*. *Exp Clin Transplant*, 2011. **9**(3): p. 170-4.
25. Tiede, I., et al., *CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(8): p. 1133-45.
26. Kesiraju, S., et al., *New onset of diabetes after transplantation - an overview of epidemiology, mechanism of development and diagnosis*. *Transpl Immunol*, 2014. **30**(1): p. 52-8.
27. Stegall, M.D., et al., *Developing New Immunosuppression for the Next Generation of Transplant Recipients: The Path Forward*. *Am J Transplant*, 2016. **16**(4): p. 1094-101.
28. Wieland, E. and M. Shipkova, *Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 347-54.
29. Inserm., E.c., *Transplantation d'organes - Quelles voies de recherche ?*, I.n.d.l.s.e.d.l.r.m.-. INSERM, Editor. 2009: Paris.
30. B.V, A.P.E. *Résumé des caractéristiques du produit (advagraf)*. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000712/WC500022234.pdf.
31. Cheng, Y., et al., *Effect of CYP3A5 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus and acute rejection in renal transplant recipients: experience at a single centre*. *Int J Clin Pract Suppl*, 2015(183): p. 16-22.
32. Shi, W.L., H.L. Tang, and S.D. Zhai, *Effects of the CYP3A4*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0127995.
33. Sarwal, M.M., *Fingerprints of transplant tolerance suggest opportunities for immunosuppression minimization*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 404-10.
34. Ekberg, H., et al., *Reduced exposure a calcineurin inhibitors in renal transplantation*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(25): p. 2562-75.
35. Mengel, M., et al., *AST Cutting Edge of Transplantation 2013 Meeting Report: a comprehensive look at B cells and antibodies in transplantation*. *Am J Transplant*, 2014. **14**(3): p. 524-30.
36. Patel, R. and P.I. Terasaki, *Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation*. *N Engl J Med*, 1969. **280**(14): p. 735-9.
37. Ross, J., T. Dickerson, and H.A. Perkins, *Two techniques to make the lymphocytotoxic crossmatch more sensitive: prolonged incubation and the antiglobulin test*. *Tissue Antigens*, 1975. **6**(3): p. 129-36.
38. Fuller, T.C., et al., *HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure*. *Hum Immunol*, 1997. **56**(1-2): p. 94-105.
39. Knight, R.J., et al., *Outcomes of living donor renal transplants with a negative cross-match and pretransplant donor-specific antibody*. *Transplant Proc*, 2013. **45**(4): p. 1399-401.
40. Tinckam, K.J., *Basic Histocompatibility Testing Methods*. 2012: p. 21-42.

41. Hetrick, S.J., et al., *Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome*. Hum Immunol, 2011. **72**(4): p. 330-6.
42. Gombos, P., et al., *Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list*. Am J Transplant, 2013. **13**(8): p. 2075-82.
43. Hatzinger, M., et al., [*The history of kidney transplantation*]. Urologe A, 2016. **55**(10): p. 1353-1359.
44. <01_kidney_13-USA Rapport.pdf>.
45. Howell, W.M., et al., *The use of polymerase chain reaction (PCR) gene amplification and synthetic oligonucleotide probes for HLA-DP typing in bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1990. **5**(1): p. 66-7.
46. Tiercy, J.M., et al., [*Current approach to HLA typing for bone marrow transplantation: oligonucleotide typing by hybridization on DNA amplified by polymerase chain reaction*]. Schweiz Med Wochenschr, 1989. **119**(39): p. 1344-6.
47. Colombo, M.B., et al., *Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine*. Cytometry B Clin Cytom, 2007. **72**(6): p. 465-71.
48. Zachary, A.A., et al., *Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance*. Hum Immunol, 2001. **62**(3): p. 236-46.
49. Hutchinson, J.A., *Flow Cytometry in Transplantation*. Transplantation, 2015. **99**(7): p. 1308-9.
50. Gandhi, M.J., et al., *Lot-to-lot variability in HLA antibody screening using a multiplexed bead-based assay*. Transfusion, 2013. **53**(9): p. 1940-7.
51. Susal, C., G. Opelz, and C. Morath, *Role and Value of Luminex((R))-Detected HLA Antibodies before and after Kidney Transplantation*. Transfus Med Hemother, 2013. **40**(3): p. 190-5.
52. Otten, H.G., et al., *Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure*. Am J Transplant, 2012. **12**(6): p. 1618-23.
53. Fidler, S.J., et al., *Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death*. Transpl Immunol, 2013. **28**(4): p. 148-53.
54. Lefaucheur, C., et al., *Mastering the risk of HLA antibodies in kidney transplantation: an algorithm based on pretransplant single-antigen flow bead techniques*. Am J Transplant, 2011. **11**(8): p. 1592-8.
55. Otten, H.G., et al., *The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation*. Clin Exp Immunol, 2013. **173**(3): p. 536-43.
56. Vlad, G., et al., *Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival*. Hum Immunol, 2009. **70**(8): p. 589-94.
57. Redondo-Pachon, D., et al., *Impact of preformed and de novo anti-HLA DP antibodies in renal allograft survival*. Transpl Immunol, 2016. **34**: p. 1-7.
58. Gupta, A., et al., *Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant?* Transplantation, 2008. **85**(8): p. 1200-4.

59. Nguyen, H.T., et al., *The relative benefits and costs of solid phase bead technology to detect preformed donor specific antihuman leukocyte antigen antibodies in determining suitability for kidney transplantation*. *Transplantation*, 2015. **99**(5): p. 957-64.
60. Middleton, D., J. Jones, and D. Lowe, *Nothing's perfect: the art of defining HLA-specific antibodies*. *Transpl Immunol*, 2014. **30**(4): p. 115-21.
61. Weinstock, C. and M. Schnaidt, *The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera*. *Int J Immunogenet*, 2013. **40**(3): p. 171-7.
62. Arnold, M.L., et al., *Donor-specific HLA antibodies: evaluating the risk for graft loss in renal transplant recipients with isotype switch from complement fixing IgG1/IgG3 a noncomplement fixing IgG2/IgG4 anti-HLA alloantibodies*. *Transpl Int*, 2014. **27**(3): p. 253-61.
63. Liu, C., et al., *Cutoff values and data handling for solid-phase testing for antibodies a HLA: effects on listing unacceptable antigens for thoracic organ transplantation*. *Hum Immunol*, 2012. **73**(6): p. 597-604.
64. Tambur, A.R., et al., *Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information*. *Am J Transplant*, 2015. **15**(9): p. 2421-30.
65. Bohmig, G.A., et al., *Detection of alloantibody-mediated complement activation: A diagnostic advance in monitoring kidney transplant rejection?* *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 394-403.
66. Bostock, I.C., et al., *Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA*. *Transpl Immunol*, 2013. **28**(4): p. 154-8.
67. Kessler, M., *[The history of kidney transplantation]*. *Rev Infirm*, 2016. **65**(226): p. 20.
68. Yves, R., *Étude sur l'économie de l'insuffisance rénale*. 2012: La Fondation canadienne du rein — Division du Québec.
69. Legendre, C., G. Canaud, and F. Martinez, *Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation*. *Transpl Int*, 2014. **27**(1): p. 19-27.
70. <http://www.transplantquebec.ca/>.
71. Becker, L.E., C. Morath, and C. Suesal, *Immune mechanisms of acute and chronic rejection*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 320-3.
72. Hoshino, J., et al., *Impact of the presence and duration of donor-specific antibodies on renal function*. *Transplant Proc*, 2014. **46**(1): p. 75-80.
73. Bosch, A., et al., *HLA-C antibodies are associated with irreversible rejection in kidney transplantation: Shared molecular eplets characterization*. *Hum Immunol*, 2014. **75**(4): p. 338-41.
74. Visentin, J., et al., *Clinical impact of preformed donor-specific denatured class I HLA antibodies after kidney transplantation*. *Clin Transplant*, 2015. **29**(5): p. 393-402.
75. Higgins, R., et al., *Pregnancy-induced HLA antibodies respond more vigorously after renal transplantation than antibodies induced by prior transplantation*. *Hum Immunol*, 2015. **76**(8): p. 546-52.
76. Prendergast, M.B. and R.S. Gaston, *Optimizing medication adherence: an ongoing opportunity a improve outcomes after kidney transplantation*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010. **5**(7): p. 1305-11.
77. Sellares, J., et al., *Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence*. *Am J Transplant*, 2012. **12**(2): p. 388-99.

78. Wiebe, C., et al., *Class II HLA epitope matching-A strategy to minimize de novo donor-specific antibody development and improve outcomes*. Am J Transplant, 2013. **13**(12): p. 3114-22.
79. Zwiech, R., *Absence of C4d urinary excretion in the early post-transplant period is associated with improved long-term kidney graft survival*. Transpl Immunol, 2014. **30**(1): p. 7-11.
80. McMurtrey, C., et al., *Profiling antibodies à class II HLA in transplant patient sera*. Hum Immunol, 2014. **75**(3): p. 261-70.
81. Mujtaba, M.A., et al., *The strength of donor-specific antibody is a more reliable predictor of antibody-mediated rejection than flow cytometry crossmatch analysis in desensitized kidney recipients*. Clin Transplant, 2011. **25**(1): p. E96-102.
82. Song, E.Y., et al., *Clinical relevance of pretransplant HLA class II donor-specific antibodies in renal transplantation patients with negative T-cell cytotoxicity crossmatches*. Ann Lab Med, 2012. **32**(2): p. 139-44.
83. Boom, H., et al., *Delayed graft function influences renal function, but not survival*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 859-66.
84. Moreno, C., et al., *Predictive value of the Luminex single antigen panel for detecting flow cytometry cross-match positivity*. Hum Immunol, 2012. **73**(5): p. 517-21.
85. Guidicelli, G., et al., *The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients*. Transpl Immunol, 2013. **29**(1-4): p. 17-21.
86. Carrier, M., J.F. Lize, and P. Quebec-Transplant, *Impact of expanded criteria donors on outcomes of recipients after kidney transplantation*. Transplant Proc, 2012. **44**(7): p. 2227-30.
87. Crespo, M., et al., *Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter?* Transpl Immunol, 2013. **29**(1-4): p. 28-33.
88. Dunn, T.B., et al., *Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation*. Am J Transplant, 2011. **11**(10): p. 2132-43.
89. Duquesnoy, R.J., et al., *Retransplant candidates have donor-specific antibodies that react with structurally defined HLA-DR,DQ,DP epitopes*. Transpl Immunol, 2008. **18**(4): p. 352-60.
90. Duquesnoy, R.J., et al., *Structural aspects of HLA class I epitopes reacting with human monoclonal antibodies in Ig-binding, C1q-binding and lymphocytotoxicity assays*. Hum Immunol, 2013. **74**(10): p. 1271-9.
91. Keven, K., et al., *Kidney transplantation in immunologically high-risk patients*. Transplant Proc, 2013. **45**(3): p. 919-22.
92. Kosmoliaptsis, V., et al., *Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies*. Transplantation, 2009. **87**(6): p. 813-20.
93. Lebranchu, Y., et al., *Pretransplant identification of acute rejection risk following kidney transplantation*. Transpl Int, 2014. **27**(2): p. 129-38.
94. Lee, P.C., et al., *Reappraisal of HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation*. Transplant Proc, 2009. **41**(1): p. 95-8.

95. Zielinski, M., et al., *Modified flow cytometry crossmatch detecting alloantibody-related cytotoxicity as a way to distinguish lytic antibodies from harmless in allosensitised kidney recipients*. *Transplant Proc*, 2013. **45**(1): p. 88-

13 ANNEXES

13.1 Verbatim téléphonique

Prénom : _____
Nom : _____
Identification du patient : # _____
Numéro de téléphone : (____) _____ - _____
Date de greffe : __ / __ / _____

Appel #1 : heure : __ h __, date : __ / __ / 2015
Si appel #2 : heure : __ h __, date : __ / __ / 2015
Si appel #3 : heure : __ h __, date : __ / __ / 2015

Synopsis

Bonjour M./Mme. _____.

Je me nomme _____ et je travaille avec l'équipe du Professeur Claude Daniel à l'Institut National de la recherche scientifique. Notre équipe, avec les Drs Pâquet et Cardinal de la clinique de transplantation rénale de l'hôpital Notre-Dame, souhaite effectuer une étude rétrospective sur des individus qui ont été transplantés du rein entre le premier janvier 1994 et le 31 décembre 2005. Selon les dossiers, vous correspondez au profil recherché par notre équipe. La raison de notre appel est que nous souhaitons votre accord pour vous faire parvenir par la poste, une copie du formulaire de consentement avec l'enveloppe-réponse préalablement affranchie afin que vous puissiez prendre connaissance du cadre de notre étude.

En quelques mots, l'étude que nous désirons entreprendre requiert que nous analysions certains de vos échantillons sanguins datant d'avant votre greffe et conservés au laboratoire d'histocompatibilité, dirigé par le

Professeur Daniel. Le laboratoire d'histocompatibilité de l'INRS est le laboratoire de référence pour le CHUM-Notre-Dame et a établi votre compatibilité immunologique avec le donneur au moment de votre greffe. Depuis l'année de votre greffe, les techniques d'analyse sanguine pour établir la compatibilité donneur/receveur ont beaucoup changé et nous désirons réanalyser celle-ci avec les techniques actuelles afin de parfaire nos connaissances futures en détections d'anticorps susceptibles ou non d'être nuisible à long terme, ceci en nous basant sur votre profil d'immunité et votre historique médical. Les données obtenues ne vous procureront aucun avantage direct ni inconvénient. La recherche est financée à même les fonds de fonctionnement interne du laboratoire d'histocompatibilité de l'INRS-IAF. Les résultats générés ne permettront pas votre identification mais pourraient être utilisés pour des communications ou publications scientifiques.

Sachez que vous êtes libre de décider de recevoir ou non le formulaire de consentement. Si vous décidez de ne pas le recevoir, *nous vous retirerons de l'étude et en aucun cas vous ne subirez de préjudices*. Si vous décidez de recevoir le formulaire de consentement, vous êtes libre d'en prendre connaissance et de décider si vous désirez ou non participer. Dans le cas où vous souhaitez participer, vous devez remplir le formulaire et nous le retourner par la poste dans l'enveloppe-réponse préalablement affranchie. Dans le cas contraire, vous pouvez en disposer comme bon vous semble.

Le fait d'accepter de recevoir la documentation de cette étude n'est en aucun cas considéré comme un consentement de participation à l'étude.

Version: Le 23 avril 2015

CONFIDENTIEL

Est-ce que vous nous autorisez à vous faire parvenir le formulaire détaillant l'étude ainsi que le formulaire de consentement à votre adresse résidentielle?

OUI

NON

Raison du refus (si donné spontanément seulement)

Est-ce que vous nous autorisez, six semaines suivant l'envoi du questionnaire, à vous retéléphoner si nous n'avons pas reçu vos documents afin de valider que vous refusiez de participer à l'étude?

OUI

NON

Confirmation de l'adresse résidentielle associée au dossier médical?

OUI

NON :

Adresse, Rue : _____

Ville : _____

Province, pays : _____

Code postal : _____

Merci beaucoup pour votre temps.

Date d'envoi du formulaire : __/__/2015

Complété par : _____

Version: Le 23 avril 2015

CONFIDENTIEL

13.2 Protocole de recherche

Impact des anticorps spécifiques du donneur (DSA) prégreffe sur le rejet du greffon rénal

Principal Investigateur

Claude Daniel, Ph. D.
Laboratoire d'histocompatibilité
INRS-Institut Armand-Frappier
531 boulevard des Prairies,
Laval, QC
H7V 1B7
Téléphone : (450) 687-5010
Télécopieur : (450)-686-5501
Courriel : claudedaniel@iaf.inrs.ca

Centre de Coordination

INRS-Institut Armand-Frappier
531 boulevard des Prairies,
Laval, QC
H7V 1B7
Téléphone : (450) 687-5010

Co investigateurs principaux

- Fernando Echeverry, Ph. D.
INRS-Institut Armand-Frappier
- Michel R. Pâquet, M.D., Ph. D.
Unité de Transplantation rénale
Service de Néphrologie
CHUM - Hôpital Notre-Dame
- Héloïse Cardinal, M.D., Ph. D.
Unité de Transplantation rénale
Service de Néphrologie
CHUM - Hôpital Notre-Dame

Chargée de Projet

Alexandre Rouleau, B.Sc.
Candidat à la maîtrise en immunologie et
virologie
Téléphone : Téléphone : (450) 687-5010
poste 8810
Courriel : Alexandre.Rouleau@iaf.inrs.ca

Ce protocole contient des informations confidentielles et est la propriété de
L'INRS-Institut Armand-Frappier

PAGE SIGNATURE DU PROTOCOLE

Version: Le 23 avril 2015

CONFIDENTIEL

PROTOCOLE : Impact des anticorps spécifiques du donneur (DSA) prégreffe sur le rejet du greffon rénal **VERSION 23 mars 2015**

TITRE DU PROTOCOLE : Analyse rétrospective de l'impact des anticorps spécifiques du donneur détectés avant la greffe sur le temps d'apparition du *rejet causé par les anticorps* et sur *la durée de vie du greffon* chez une cohorte de patients greffés du rein.

Nom du chercheur principal : Claude Daniel, Ph.D

Nom du site / Adresse : INRS-Institut Armand-Frappier
531 boulevard des Prairies,
Laval, QC
H7V 1B7
Téléphone : (450) 687-5010

En tant que principal investigateur de l'étude clinique ci-haut mentionnée, j'accepte d'adhérer aux lignes directrices énoncées dans le protocole cité en référence. Cette entente est effective pour la durée de l'étude clinique

Date

Signature du chercheur principal

TABLE DES MATIÈRES

1.	Rationnel de l'étude	4
2.	Objectifs de l'étude	
	2.1 Objectif principal.....	5
	2.2 Objectifs secondaires.....	5
	2.3 Autres facteurs à considérer	6
3.	Plan de recherche (Protocole)	6
	3.1 Méthodes et mesures à effectuer	6
	3.2 Population et analyses	7
4.	Critères d'inclusion et d'exclusion	
	4.1 Critères d'inclusion pour les sujets greffés	8
	4.2 Critères d'exclusion pour les sujets greffés.....	8
5.	Aspects statistiques	9
6.	Références	10

1). Rationnel de l'étude

Identifiés en 1969 par Patel et Terasaki [8], les anticorps anti-HLA spécifiques du donneur (DSA) sont un facteur bien connu limitant le succès de la transplantation [15, 18, 91-94]. Ils se développent suite à une transfusion sanguine, une grossesse ou une greffe [18]. De nombreuses études ont démontré un lien entre la présence de DSA et une diminution sur le temps de survie du greffon [12, 15, 78, 91, 95, 96]. La découverte au milieu des années 80 des inhibiteurs de calcineurine a permis une réduction du rejet cellulaire aigu, augmentant ainsi la durée de vie fonctionnelle du greffon. [95, 97]. De même, de nombreuses pathologies sont aujourd'hui traitées en ayant recours à la transplantation d'organes. Il est reconnu que la présence de DSA provoque le rejet humoral aigu et/ou chronique et est une contre-indication de la transplantation [8, 11, 12, 15, 18, 21, 28, 78, 84, 87, 88, 90-106]. L'évolution des méthodes de détection des DSA a permis de diminuer l'incidence des rejets hyper aigus et d'améliorer les taux de succès à court et moyen terme [18, 90-94].

L'introduction de nouvelles méthodes de détection d'allo-anticorps anti-HLA en phase solide a permis d'identifier plus précisément la spécificité de ces anticorps et d'en évaluer leurs abondances relatives [11, 15, 96]. Ces nouvelles méthodes permettent la détection de niveau d'anticorps non perceptibles par les méthodes traditionnelles de crossmatch cytotoxique dépendant du complément (CDCXM) et de crossmatch par cytométrie en flux (FCXM) [15, 96]. Des études récentes ont mis en lumière les effets des DSA prétransplantation indétectés par les méthodes CDCXM et FCXM [94]. En effet, ces DSA prégreffe sont associés avec une occurrence plus élevée d'épisodes de rejet causé par des anticorps (AMR) ainsi qu'avec la perte du greffon à court et moyen terme [97, 99, 101-106]. Les effets à long terme ne sont toutefois pas encore clairement identifiés. De plus, il n'existe aucun consensus chez les spécialistes sur l'importance des différents loci de chaque classe d'HLA et/ou sur l'abondance relative (*MFI, mean fluorescence intensity*) ou la persistance dans le temps de ces DSA dans l'AMR.

Compte tenu du rôle potentiel des DSA, il apparaît pertinent d'étudier rétrospectivement une cohorte de patients transplantés rénaux suite à un CDCXM négatif et suivi par un établissement hospitalier unique afin de mettre en relation la présence des DSA prégreffe, non

détectée au moment de la greffe, en lien avec le suivi médical à court, moyen et long terme. Ces nouvelles données permettront de déterminer l'impact des DSA prégreffe indétectées par CDCXM sur la fonction rénale et la survie du greffon et du patient. De plus, ces résultats permettront de fournir de nouvelles connaissances quant aux critères à utiliser pour l'évaluation du risque immunologique, particulièrement chez les patients hautement sensibilisés [21, 78, 101, 102].

2). Objectifs de l'étude

2.1 Objectif principal

2.1.1 Identifier et mesurer les niveaux circulants d'anticorps anti-HLA pré-transplantation spécifiques contre le donneur (DSA) et leur association avec la durée de vie fonctionnelle du greffon et/ou la survie du patient en comparaison avec des patients greffés rénaux sans DSA.

2.2 Objectifs secondaires

2.2.1 Explorer l'association entre la présence et le niveau relatif en MFI de, ou des DSA et le taux d'épisodes de rejets médiés par les anticorps (AMR).

2.2.2 Explorer l'association entre la présence et le niveau relatif en MFI de, ou des DSA et le taux de filtration glomérulaire dans le temps.

2.2.3 Explorer l'association entre la présence et le niveau relatif en MFI de, ou des DSA de différents locus de chaque classe d'HLA et le taux d'épisodes de rejets médiés par les anticorps (AMR).

2.2.4 Explorer l'association entre la présence et le niveau relatif en MFI de, ou des DSA de différents locus de chaque classe d'HLA et le taux de filtration glomérulaire dans le temps.

2.2.5 Explorer l'association entre la présence et le niveau relatif en MFI de, ou des DSA de différents locus de chaque classe d'HLA et le temps entre la greffe et le premier épisode de rejet aigu (cellulaire ou médié par des anticorps).

2.3 Autres facteurs considérés

- 2.3.1 Donneur vivant/cadavérique [93, 100]
- 2.3.2 Désensibilisation préalable [93]
- 2.3.3 Suivi dans le temps de la biochimie sanguine/urinaire (urée, créatinine, albumine) [100]
- 2.3.4 Anticorps recherchés et considérés contre ces locus : HLA Classe I : A, B et C. HLA Classe II : DRB1, DRB345, DQA1, DQB1, DPA1 et DPB1. [12, 101, 103]
- 2.3.5 Temps d'ischémie froide [28]
- 2.3.6 DSA C1q+/C1q- [91, 99, 102]
- 2.3.7 Nombre de *Mismatch* HLA donneur : patient [90, 98]
- 2.3.8 Adhérence aux traitements [87, 90, 100]
- 2.3.9 Délai de la reprise de la fonction rénale (DGF) [28, 95]
- 2.3.10 Greffes Multiples [101]

3). Plan de recherche (Protocole)

3.1 Méthodes et mesures à effectuer

Une cohorte d'environ trois cent cinq patients vivants, greffés rénaux à l'hôpital Notre-Dame entre 1994-2006 inclusivement, ayant un suivi clinique postgreffe d'un minimum de 5 ans et dont le typage HLA du donneur a été effectué à l'INRS-IAF, sera considérée pour cette étude rétrospective. La présence et l'abondance relative d'anticorps anti-HLA seront mesurées pour les deux classes d'antigènes (I&II) pour chaque patient par LABScreen *Single antigen Bead* à partir de sérum prégreffe le plus près de la date de transplantation. Lorsque disponible et sans être un critère d'exclusion, les fluctuations dans le temps de la spécificité et de l'abondance relative des anticorps anti-HLA seront évaluées en analysant le sérum du patient pour chaque année précédant la greffe. Les anticorps anti-HLA spécifiques du donneur seront classés DSA selon des valeurs seuils préétablies (<500, 500-1000, >1000, >8000 MFI) [18, 21]. La *non-adhérence* au traitement sera établie et documentée par le médecin traitant. Le

délai de la reprise de fonction rénale (DGF) sera défini comme « le besoin de dialyse dans les 168 premières heures (7 jours) post greffe ». La fin de vie du greffon sera décrite comme « le premier recours à la dialyse chronique post greffe, une greffe subséquente ou la mort du patient ». La présence d'AMR ou de rejet cellulaire sera déterminée par les valeurs cliniques obtenues suite à une biopsie et classées en fonction des critères de Banff. Dans le cadre de cette étude rétrospective, les évaluations invasives complétées et jugées nécessaires au bon suivi clinique du patient seront utilisées aux fins d'analyses de la fonction rénale menant au diagnostic d'AMR dans le temps. Les évaluations sanguines et urinaires complétées et jugées nécessaires au bon suivi clinique du patient seront utilisées pour le suivi de la fluctuation du taux de filtration glomérulaire dans le temps. Les autres valeurs seront obtenues par révision du dossier médical du patient.

3.2 Population et analyses

Description de la population :

Trois cent cinq patients greffés rénaux transplantés depuis au minimum 5 ans et suivi à l'hôpital Notre-Dame dont les donneurs ont été sérologiquement et/ou moléculairement typés à l'INRS-IAF seront étudiés. Aucune visite de patient ne sera nécessaire.

Description des analyses

Les anticorps anti-HLA seront identifiés et mesurés à partir du sérum congelé du patient dans le laboratoire d'histocompatibilité du Dr Claude Daniel de l'INRS-Institut Armand-Frappier par des techniques publiées. Le sérum pré-greffe le plus rapproché de la date de transplantation sera utilisé. Le génotype HLA du donneur sera complété pour tout anticorps retrouvé contre ces loci : HLA Classe I : Locus A, B, C. HLA Classe II : DRB1 DRB345, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1.

4). Critères d'inclusion et d'exclusion

4.1 Critères d'inclusion pour les sujets greffés

- 4.1.1. Transplantation rénale depuis ≥ 5 ans
- 4.1.2. CDCXM (T) ou (T&B) négatif
- 4.1.3. Patients de l'hôpital Notre-Dame
- 4.1.4. Donneurs typés à INRS-IAF

4.2 Critères d'exclusion pour les sujets greffés

- 4.2.1. Absence de sérum pré-greffe
- 4.2.2. Perte du suivi médical
- 4.2.3. Décès non relié à l'état de santé

5). Aspects statistiques

L'incidence d'AMR et de la perte du greffon seront évaluées dans le temps par la méthode de Kaplan-Meier et comparées en utilisant le « logrank test ». Le seuil de détection optimal de la présence d'allo anticorps sera estimé par l'analyse ROC « *receiver operating characteristic* ». Les tests de comparaisons de moyennes seront faits par des tests Anova/ Tukey-Kramer, exact test de Fisher ou test de Pearson avec erreur de type I ($< 0,05$) (5, 13 [18, 21, 95]).

6). Références

1. Hatzinger, M., et al., [*The history of kidney transplantation*]. Urologe A, 2016. **55**(10): p. 1353-1359.
2. Kessler, M., [*The history of kidney transplantation*]. Rev Infirm, 2016. **65**(226): p. 20.
3. Stegall, M.D., et al., *Developing New Immunosuppression for the Next Generation of Transplant Recipients: The Path Forward*. Am J Transplant, 2016. **16**(4): p. 1094-101.
4. Yves, R., *Étude sur l'économie de l'insuffisance rénale*. 2012: La Fondation canadienne du rein — Division du Québec.
5. Legendre, C., G. Canaud, and F. Martinez, *Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation*. Transpl Int, 2014. **27**(1): p. 19-27.
6. <http://www.transplantquebec.ca/>.
7. Becker, L.E., C. Morath, and C. Suesal, *Immune mechanisms of acute and chronic rejection*. Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 320-3.
8. Patel, R. and P.I. Terasaki, *Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation*. N Engl J Med, 1969. **280**(14): p. 735-9.
9. Monteverde, M.L., et al., *Donor-specific anti-HLA antibodies in pediatric renal transplant recipients with creeping creatinine: Prevalence, histological correlations, and impact on patient and graft survival*. Pediatr Transplant, 2015. **19**(7): p. 684-90.
10. Arnold, M.L., et al., *Donor-specific HLA antibodies: evaluating the risk for graft loss in renal transplant recipients with isotype switch from complement fixing IgG1/IgG3 to noncomplement fixing IgG2/IgG4 anti-HLA alloantibodies*. Transpl Int, 2014. **27**(3): p. 253-61.
11. Lefaucheur, C., et al., *Mastering the risk of HLA antibodies in kidney transplantation: an algorithm based on pretransplant single-antigen flow bead techniques*. Am J Transplant, 2011. **11**(8): p. 1592-8.
12. Otten, H.G., et al., *Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure*. Am J Transplant, 2012. **12**(6): p. 1618-23.
13. Hoshino, J., et al., *Impact of the presence and duration of donor-specific antibodies on renal function*. Transplant Proc, 2014. **46**(1): p. 75-80.
14. Bosch, A., et al., *HLA-C antibodies are associated with irreversible rejection in kidney transplantation: Shared molecular epitopes characterization*. Hum Immunol, 2014. **75**(4): p. 338-41.
15. Fidler, S.J., et al., *Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death*. Transpl Immunol, 2013. **28**(4): p. 148-53.
16. Visentin, J., et al., *Clinical impact of preformed donor-specific denatured class I HLA antibodies after kidney transplantation*. Clin Transplant, 2015. **29**(5): p. 393-402.
17. Vlad, G., et al., *Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival*. Hum Immunol, 2009. **70**(8): p. 589-94.
18. Wu, P., et al., *Impact of alloantibody strength in crossmatch negative DSA positive kidney transplantation*. Clin Biochem, 2013. **46**(15): p. 1389-93.
19. Higgins, R., et al., *Pregnancy-induced HLA antibodies respond more vigorously after renal transplantation than antibodies induced by prior transplantation*. Hum Immunol, 2015. **76**(8): p. 546-52.

20. Knight, R.J., et al., *Outcomes of living donor renal transplants with a negative cross-match and pretransplant donor-specific antibody*. *Transplant Proc*, 2013. **45**(4): p. 1399-401.
21. Liu, C., et al., *Cutoff values and data handling for solid-phase testing for antibodies to HLA: effects on listing unacceptable antigens for thoracic organ transplantation*. *Hum Immunol*, 2012. **73**(6): p. 597-604.
22. Murphy, K.e.a., *Janeway's Immunobiology*, ed. 7. Vol. 7. 2008. 887.
23. Ponticelli, C., [*Innate immunity and transplantation*]. *G Ital Nefrol*, 2015. **32 Suppl 64**.
24. Chen, W., R.M. Ghobrial, and X.C. Li, *The Evolving Roles of Memory Immune Cells in Transplantation*. *Transplantation*, 2015. **99**(10): p. 2029-37.
25. Cucchiari, D., M.A. Podesta, and C. Ponticelli, *The Critical Role of Innate Immunity in Kidney Transplantation*. *Nephron*, 2016. **132**(3): p. 227-37.
26. Farrar, C.A., J.W. Kupiec-Weglinski, and S.H. Sacks, *The innate immune system and transplantation*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(10): p. a015479.
27. Spahn, J.H., W. Li, and D. Kreisel, *Innate immune cells in transplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2014. **19**(1): p. 14-9.
28. Quiroga, I., et al., *Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(6): p. 1689-96.
29. Georgel, P., *Innate immune receptors in solid organ transplantation*. *Hum Immunol*, 2016. **77**(11): p. 1071-1075.
30. Badders, J.L., et al., *Variable HLA expression on deceased donor lymphocytes: Not all crossmatches are created equal*. *Hum Immunol*, 2015. **76**(11): p. 795-800.
31. Granados, D.P., et al., *The nature of self for T cells-a systems-level perspective*. *Curr Opin Immunol*, 2015. **34**: p. 1-8.
32. Shrestha, D., J. Szollosi, and A. Jenei, *Bare lymphocyte syndrome: an opportunity to discover our immune system*. *Immunol Lett*, 2012. **141**(2): p. 147-57.
33. Schreuder, G.M., et al., *HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens*. *Hum Immunol*, 2005. **66**(2): p. 170-210.
34. Li, X.C., *Transplantation immunology*, ed. AST. 2016: Wiley Blackwell.
35. Lucas, D.P., M.S. Leffell, and A.A. Zachary, *Differences in immunogenicity of HLA antigens and the impact of cross-reactivity on the humoral response*. *Transplantation*, 2015. **99**(1): p. 77-85.
36. Kalia, V., et al., *Differentiation of memory B and T cells*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(3): p. 255-64.
37. Mehra, N.K. and A.K. Baranwal, *Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation*. *Int J Immunogenet*, 2016. **43**(6): p. 351-368.
38. Sarhane, K.A., et al., *A critical analysis of rejection in vascularized composite allotransplantation: clinical, cellular and molecular aspects, current challenges, and novel concepts*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 406.
39. Petra, H., et al., *Molecular profiling of acute and chronic rejections of renal allografts*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 509259.
40. Haas, M., et al., *Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions*. *Am J Transplant*, 2014. **14**(2): p. 272-83.
41. Halloran, P.F., *Immunosuppressive drugs for kidney transplantation*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(26): p. 2715-29.

42. Op den Buijsch, R.A., et al., *Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2007. **21**(4): p. 427-35.
43. Bergan, S., S. Bremer, and N.T. Vethe, *Drug target molecules to guide immunosuppression*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 411-8.
44. Barbarino, J.M., et al., *PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways*. *Pharmacogenet Genomics*, 2013. **23**(10): p. 563-85.
45. Alghamdi, S., et al., *Cyclosporine versus tacrolimus maintenance therapy in renal transplant*. *Exp Clin Transplant*, 2011. **9**(3): p. 170-4.
46. Sehgal, S.N., H. Baker, and C. Vezina, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1975. **28**(10): p. 727-32.
47. Tiede, I., et al., *CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(8): p. 1133-45.
48. Kesiraju, S., et al., *New onset of diabetes after transplantation - an overview of epidemiology, mechanism of development and diagnosis*. *Transpl Immunol*, 2014. **30**(1): p. 52-8.
49. Wieland, E. and M. Shipkova, *Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 347-54.
50. Inserm., E.c., *Transplantation d'organes - Quelles voies de recherche ?*, I.n.d.l.s.e.d.l.r.m.-. INSERM, Editor. 2009: Paris.
51. B.V., A.P.E. *Résumé des caractéristiques du produit (advagraf)*. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000712/WC500022234.pdf.
52. Cheng, Y., et al., *Effect of CYP3A5 polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus and acute rejection in renal transplant recipients: experience at a single centre*. *Int J Clin Pract Suppl*, 2015(183): p. 16-22.
53. Shi, W.L., H.L. Tang, and S.D. Zhai, *Effects of the CYP3A4*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0127995.
54. Sarwal, M.M., *Fingerprints of transplant tolerance suggest opportunities for immunosuppression minimization*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(4-5): p. 404-10.
55. Ekberg, H., et al., *Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(25): p. 2562-75.
56. Mengel, M., et al., *AST Cutting Edge of Transplantation 2013 Meeting Report: a comprehensive look at B cells and antibodies in transplantation*. *Am J Transplant*, 2014. **14**(3): p. 524-30.
57. Ross, J., T. Dickerson, and H.A. Perkins, *Two techniques to make the lymphocytotoxic crossmatch more sensitive: prolonged incubation and the antiglobulin test*. *Tissue Antigens*, 1975. **6**(3): p. 129-36.
58. Fuller, T.C., et al., *HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure*. *Hum Immunol*, 1997. **56**(1-2): p. 94-105.
59. Tinckam, K.J., *Basic Histocompatibility Testing Methods*. 2012: p. 21-42.
60. Hetrick, S.J., et al., *Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome*. *Hum Immunol*, 2011. **72**(4): p. 330-6.
61. Gombos, P., et al., *Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list*. *Am J Transplant*, 2013. **13**(8): p. 2075-82.

62. <01_kidney_13-USA Rapport.pdf>.
63. Howell, W.M., et al., *The use of polymerase chain reaction (PCR) gene amplification and synthetic oligonucleotide probes for HLA-DP typing in bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1990. **5**(1): p. 66-7.
64. Tiercy, J.M., et al., [*Current approach to HLA typing for bone marrow transplantation: oligonucleotide typing by hybridization on DNA amplified by polymerase chain reaction*]. Schweiz Med Wochenschr, 1989. **119**(39): p. 1344-6.
65. Colombo, M.B., et al., *Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine*. Cytometry B Clin Cytom, 2007. **72**(6): p. 465-71.
66. Zachary, A.A., et al., *Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance*. Hum Immunol, 2001. **62**(3): p. 236-46.
67. Hutchinson, J.A., *Flow Cytometry in Transplantation*. Transplantation, 2015. **99**(7): p. 1308-9.
68. Gandhi, M.J., et al., *Lot-to-lot variability in HLA antibody screening using a multiplexed bead-based assay*. Transfusion, 2013. **53**(9): p. 1940-7.
69. Susal, C., G. Opelz, and C. Morath, *Role and Value of Luminex((R))-Detected HLA Antibodies before and after Kidney Transplantation*. Transfus Med Hemother, 2013. **40**(3): p. 190-5.
70. Otten, H.G., et al., *The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation*. Clin Exp Immunol, 2013. **173**(3): p. 536-43.
71. Redondo-Pachon, D., et al., *Impact of preformed and de novo anti-HLA DP antibodies in renal allograft survival*. Transpl Immunol, 2016. **34**: p. 1-7.
72. Gupta, A., et al., *Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant?* Transplantation, 2008. **85**(8): p. 1200-4.
73. Nguyen, H.T., et al., *The relative benefits and costs of solid phase bead technology to detect preformed donor specific antihuman leukocyte antigen antibodies in determining suitability for kidney transplantation*. Transplantation, 2015. **99**(5): p. 957-64.
74. Middleton, D., J. Jones, and D. Lowe, *Nothing's perfect: the art of defining HLA-specific antibodies*. Transpl Immunol, 2014. **30**(4): p. 115-21.
75. Weinstock, C. and M. Schnaidt, *The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera*. Int J Immunogenet, 2013. **40**(3): p. 171-7.
76. Tambur, A.R., et al., *Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information*. Am J Transplant, 2015. **15**(9): p. 2421-30.
77. Bohmig, G.A., et al., *Detection of alloantibody-mediated complement activation: A diagnostic advance in monitoring kidney transplant rejection?* Clin Biochem, 2016. **49**(4-5): p. 394-403.
78. Bostock, I.C., et al., *Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA*. Transpl Immunol, 2013. **28**(4): p. 154-8.
79. Buhler, S., et al., *HLA-A, B and DRB1 genetic heterogeneity in Quebec*. Int J Immunogenet, 2015. **42**(2): p. 69-77.
80. Dellgren, C., J.O. Nehlin, and T. Barington, *Cell surface expression level variation between two common Human Leukocyte Antigen alleles, HLA-A2 and HLA-B8, is*

- dependent on the structure of the C terminal part of the alpha 2 and the alpha 3 domains.* PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135385.
81. Eyal, A., et al., *Variation of HLA-ABC surface antigen expression on adenocarcinoma of the colon in correlation with the degree of differentiation.* Nat Immun Cell Growth Regul, 1990. **9**(3): p. 222-7.
 82. Honger, G., et al., *Inter-individual differences in HLA expression can impact the CDC crossmatch.* Tissue Antigens, 2015. **85**(4): p. 260-6.
 83. Yarzabek, B., et al., *Variations in HLA-B cell surface expression, half-life and extracellular antigen receptivity.* Elife, 2018. **7**.
 84. Lebranchu, Y., et al., *Pretransplant identification of acute rejection risk following kidney transplantation.* Transpl Int, 2014. **27**(2): p. 129-38.
 85. Hart, A., et al., *OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Kidney.* Am J Transplant, 2017. **17 Suppl 1**: p. 21-116.
 86. Wiebe, C., et al., *The Synergistic Effect of Class II HLA Epitope-Mismatch and Nonadherence on Acute Rejection and Graft Survival.* Am J Transplant, 2015. **15**(8): p. 2197-202.
 87. Prendergast, M.B. and R.S. Gaston, *Optimizing medication adherence: an ongoing opportunity to improve outcomes after kidney transplantation.* Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(7): p. 1305-11.
 88. Sellares, J., et al., *Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence.* Am J Transplant, 2012. **12**(2): p. 388-99.
 89. Wiebe, C., et al., *Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant.* Am J Transplant, 2012. **12**(5): p. 1157-67.
 90. Wiebe, C., et al., *Class II HLA epitope matching-A strategy to minimize de novo donor-specific antibody development and improve outcomes.* Am J Transplant, 2013. **13**(12): p. 3114-22.
 91. Zwiech, R., *Absence of C4d urinary excretion in the early post-transplant period is associated with improved long-term kidney graft survival.* Transpl Immunol, 2014. **30**(1): p. 7-11.
 92. McMurtrey, C., et al., *Profiling antibodies to class II HLA in transplant patient sera.* Hum Immunol, 2014. **75**(3): p. 261-70.
 93. Mujtaba, M.A., et al., *The strength of donor-specific antibody is a more reliable predictor of antibody-mediated rejection than flow cytometry crossmatch analysis in desensitized kidney recipients.* Clin Transplant, 2011. **25**(1): p. E96-102.
 94. Song, E.Y., et al., *Clinical relevance of pretransplant HLA class II donor-specific antibodies in renal transplantation patients with negative T-cell cytotoxicity crossmatches.* Ann Lab Med, 2012. **32**(2): p. 139-44.
 95. Boom, H., et al., *Delayed graft function influences renal function, but not survival.* Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 859-66.
 96. Moreno, C., et al., *Predictive value of the Luminex single antigen panel for detecting flow cytometry cross-match positivity.* Hum Immunol, 2012. **73**(5): p. 517-21.
 97. Guidicelli, G., et al., *The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients.* Transpl Immunol, 2013. **29**(1-4): p. 17-21.

98. Carrier, M., J.F. Lize, and P. Quebec-Transplant, *Impact of expanded criteria donors on outcomes of recipients after kidney transplantation*. *Transplant Proc*, 2012. **44**(7): p. 2227-30.
99. Crespo, M., et al., *Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter?* *Transpl Immunol*, 2013. **29**(1-4): p. 28-33.
100. Dunn, T.B., et al., *Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation*. *Am J Transplant*, 2011. **11**(10): p. 2132-43.
101. Duquesnoy, R.J., et al., *Retransplant candidates have donor-specific antibodies that react with structurally defined HLA-DR,DQ,DP epitopes*. *Transpl Immunol*, 2008. **18**(4): p. 352-60.
102. Duquesnoy, R.J., et al., *Structural aspects of HLA class I epitopes reacting with human monoclonal antibodies in Ig-binding, C1q-binding and lymphocytotoxicity assays*. *Hum Immunol*, 2013. **74**(10): p. 1271-9.
103. Keven, K., et al., *Kidney transplantation in immunologically high-risk patients*. *Transplant Proc*, 2013. **45**(3): p. 919-22.
104. Kosmoliaptsis, V., et al., *Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies*. *Transplantation*, 2009. **87**(6): p. 813-20.
105. Lee, P.C., et al., *Reappraisal of HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation*. *Transplant Proc*, 2009. **41**(1): p. 95-8.
106. Zielinski, M., et al., *Modified flow cytometry crossmatch detecting alloantibody-related cytotoxicity as a way to distinguish lytic antibodies from harmless in allosensitized kidney recipients*. *Transplant Proc*, 2013. **45**(1): p. 88-94.

13.3 Formulaire de consentement



FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT

Titre du projet : Impact des anticorps spécifiques du donneur (DSA) prégreffe sur le rejet du greffon rénal

Chercheur principal : Claude Daniel, Ph. D., Directeur du laboratoire histocompatibilité, INRS-Institut Armand-Frappier

Co chercheur : Dr Michel R. Pâquet - néphrologue au CHUM

Co chercheurs hors CHUM :

Dr Fernando Echeverry - Laboratoire histocompatibilité, INRS-Institut Armand-Frappier

Alexandre Rouleau - Laboratoire histocompatibilité, INRS-Institut Armand-Frappier

Organisme subventionnaire :

Organisations parrainantes :

No. projet CHUM :

PRÉAMBULE

Nous sollicitons votre participation à un projet de recherche parce que vous avez reçu une transplantation de rein entre 1994 et 2006. Cependant, avant d'accepter de participer à ce projet et de signer ce formulaire d'information et de consentement, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent.

Ce formulaire peut contenir des mots que vous ne comprenez pas. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugerez utiles au chercheur responsable du projet ou aux autres membres du personnel affecté au projet de recherche et à leur demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

NATURE ET OBJECTIFS

À l'époque où vous avez été transplanté (e), de nombreux tests à la fine pointe du domaine ont été effectués afin de s'assurer de la compatibilité immunologique entre vous et votre greffon. L'équipe médicale qui vous suit a jugé que la compatibilité était conforme et que les

bénéfices d'une transplantation surpassaient les risques associés. Avec l'avancement constant du domaine de la biotechnologie, nous avons à notre disposition de nouveaux tests plus précis pour établir la compatibilité entre deux individus et ainsi potentialisé l'attribution d'organes en fonction des besoins des patients sur les listes d'attentes. Nous sollicitons votre autorisation pour évaluer, avec les méthodes et protocoles actuellement utilisés, certains de vos échantillons sanguins utilisés pour établir la compatibilité entre vous et votre greffon. De plus, nous sollicitons l'accès à votre dossier médical pour suivre votre état de santé ainsi que l'état de votre greffon.

La présente étude a pour but :

D'identifier l'impact des anticorps anti-HLA non détecté sur la fonction rénale et sur la survie du greffon.

De voir s'il existe des façons d'augmenter la durée de vie du greffon en établissant une meilleure attribution des organes en fonction de nouveaux paramètres de compatibilité.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la durée de vie du greffon, il est donc important pour nous d'avoir le plus grand nombre de patients greffés afin d'obtenir une évaluation juste de nos observations. Vous ne bénéficierez pas directement de cette étude, elle a pour but d'améliorer l'attribution future d'organe en fonction du profil immunologique des patients.

Nombre de participants et durée de l'étude

Environ 305 patients participeront à cette étude à l'hôpital Notre-Dame. La durée prévue de cette étude est de deux ans.

NATURE DE LA PARTICIPATION DEMANDÉE

Si vous acceptez de participer à cette étude et après avoir signé le présent formulaire d'information et de consentement, votre participation directe s'arrête ici. Aucun examen, ou analyse supplémentaire n'est demandé.

DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE

Après la signature du présent document, un de vos sérums d'avant greffe sera ré analysé par une méthode de détection d'anticorps anti-HLA. Une analyse de l'ADN de votre greffon sera également réalisée pour compléter celle effectuée au moment de votre greffe. Cette analyse nous permettra de vous classer dans un des deux groupes de l'étude : *avec anticorps spécifiques contre le donneur (DSA)* et *sans anticorps spécifiques contre le donneur*. Le groupe avec DSA sera subdivisé selon certains critères tels l'intensité relative de ce/ces DSA et/ou le (s) locus (loci) associé(s). Puis nous observons s'il existe des différences entre les groupes au niveau de la fonction du greffon, de sa durée de vie et de l'état de santé général des patients de chacun des groupes. L'évaluation de ces paramètres cliniques nous permettra alors de faire des projections sur les futurs patients transplantés. Leur faisant ainsi bénéficier des connaissances acquises par votre historique médical.

RISQUES ET INCONVÉNIENTS

Risques liés au bris de confidentialité :

Il existe un risque lié à un possible bris de confidentialité concernant vos informations personnelles et vos dossiers médicaux qui pourrait se traduire par une atteinte à votre vie

privée. Ce risque est cependant minime. Tous les efforts seront déployés pour protéger votre vie privée et assurer votre confidentialité, comme décrite dans la section «Confidentialité».

AVANTAGES

Avantages personnels

Il se peut que vous retiriez un bénéfice personnel de votre participation à ce projet de recherche, mais on ne peut vous l'assurer. À tout le moins, les résultats obtenus contribueront à l'avancement des connaissances dans ce domaine.

CONFIDENTIALITÉ

Durant votre participation à ce projet, le chercheur responsable ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements vous concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de ce projet seront recueillis.

Ces renseignements peuvent comprendre les informations contenues dans vos dossiers médicaux concernant votre état de santé passé et présent, vos habitudes de vie ainsi que les résultats de tous les tests, examens et procédures que vous avez subis depuis et avant votre transplantation. Votre dossier peut aussi comprendre d'autres renseignements tels que votre nom, votre sexe, votre date de naissance et votre origine ethnique.

Tous les renseignements recueillis demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi.

Le chercheur responsable fera parvenir à l'organisme subventionnaire ou à ses représentants, les données vous concernant. Ces données n'incluent pas votre nom ni votre adresse.

L'organisme subventionnaire utilisera les données à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques du projet décrits dans le formulaire d'information et de consentement.

Les données en elles-mêmes ou combinées aux données provenant d'autres projets pourront être partagées avec les organismes réglementaires canadiens ou d'autres pays ou avec les partenaires commerciaux de l'organisme subventionnaire. Ce transfert d'information implique que vos données pourraient être transmises dans d'autres pays que le Canada. Cependant, l'organisme subventionnaire respectera les règles de confidentialité en vigueur au Québec et au Canada, et ce, dans tous les pays. Ces données seront conservées pendant 5 ans après la fin de l'étude par le chercheur responsable.

Les données pourront être publiées dans des revues spécialisées ou faire l'objet de discussions scientifiques, mais il ne sera pas possible de vous identifier.

À des fins de surveillance et de contrôle, votre dossier de recherche ainsi que vos dossiers médicaux pourront être consultés par une personne mandatée par le comité d'éthique de la recherche du CHUM ou par l'établissement, par une personne mandatée par des organismes publics autorisés ainsi que par des représentants de l'organisme subventionnaire. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

À des fins de protection, notamment afin de pouvoir communiquer avec vous rapidement, vos noms et prénoms, vos coordonnées et la date de début et de fin de votre participation au projet seront conservés pendant un an après la fin du projet dans un répertoire à part maintenu par le chercheur responsable.

Vous avez le droit de consulter votre dossier de recherche pour vérifier les renseignements recueillis, et les faire rectifier au besoin, et ce, aussi longtemps que le chercheur responsable du projet ou l'établissement détiennent ces informations. Cependant, afin de préserver l'intégrité scientifique du projet, vous pourriez n'avoir accès à certaines de ces informations qu'une fois votre participation terminée.

PARTICIPATION VOLONTAIRE ET POSSIBILITÉS DE RETRAIT

Votre participation à cette étude est volontaire. Vous êtes donc libre de refuser d'y participer. Vous pouvez également vous retirer de ce projet en tout temps, sans avoir à donner de raisons, en faisant connaître votre décision au chercheur responsable de l'étude. Votre décision de ne pas participer à ce projet de recherche ou de vous en retirer n'aura aucune conséquence sur la qualité des soins et des services auxquels vous avez droit ni sur votre relation avec le chercheur responsable du projet et les autres intervenants.

Le chercheur responsable du projet de recherche, le comité d'éthique de la recherche du CHUM ou l'organisme subventionnaire peuvent mettre fin à votre participation, sans votre consentement, si de nouvelles découvertes ou informations indiquent que votre participation au projet n'est plus dans votre intérêt, si vous ne respectez pas les consignes du projet de recherche ou s'il existe des raisons administratives d'abandonner le projet.

Si vous vous retirez ou êtes retiré (e) du projet, l'information déjà obtenue dans le cadre de ce projet sera conservée aussi longtemps que nécessaire pour rencontrer les exigences réglementaires.

Toute nouvelle connaissance acquise durant le déroulement du projet qui pourrait affecter votre décision de continuer d'y participer vous sera communiquée sans délai verbalement ou par écrit.

COMPENSATION

Il n'y a pas de compensation offerte pour votre consentement.

INDEMNISATION EN CAS DE PRÉJUDICE ET DROITS DU PARTICIPANT À LA

RECHERCHE

Si vous deviez subir quelque préjudice que ce soit par suite de toute autre procédure reliée à l'étude, vous recevrez tous les soins et services requis par votre état de santé, sans frais de votre part.

En acceptant de participer à cette étude, vous ne renoncez à aucun de vos droits ni ne libérez les chercheurs, l'organisme subventionnaire, ou l'établissement de leurs responsabilités légales et professionnelles.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS GÉNÉRAUX

Vous pourrez connaître les résultats généraux de cette étude si vous en faites la demande au chercheur principal à la fin de l'étude ou encore via un bulletin informatif qui vous sera envoyé par courrier électronique si vous donnez à l'équipe de recherche votre adresse électronique.

FINANCEMENT DU PROJET

Le chercheur responsable du projet et l'établissement ont reçu un financement de l'organisme subventionnaire pour mener à bien ce projet de recherche.

PERSONNES-RESSOURCES

Si vous avez des questions concernant cette étude ou si vous éprouvez un problème que vous croyez relié à votre participation à l'étude, vous pouvez communiquer avec le chercheur responsable ou avec le chargé de projet du lundi au vendredi, de 8 h à 16 h, aux numéros suivants :

Claude Daniel, Ph. D., chercheur principal au (450) 687-5010, poste 4683,

Alexandre Rouleau, chargé de projet au (450) 687-5010, poste 8810.

Pour toute question concernant vos droits en tant que sujet participant à ce projet de recherche ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler, vous pouvez communiquer avec le commissaire local aux plaintes et à la qualité des services de l'Hôpital Notre-Dame du CHUM au 514-890-8000, poste 26047 ou l'Hôtel-Dieu du CHUM au 514-890-8000, poste 12761 ou l'Hôpital St-Luc du CHUM au numéro 514-890-8000, poste 36366.

SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES DU PROJET DE RECHERCHE

Le comité d'éthique de la recherche du CHUM a approuvé ce projet de recherche et en assure le suivi. De plus, il approuvera au préalable toute révision et toute modification apportée au formulaire d'information et de consentement et au protocole de recherche.

CONSENTEMENT

Avant de signer et dater le présent formulaire de consentement, j'ai reçu des explications complètes sur les méthodes et les moyens qui seront utilisés dans cette étude ainsi que sur les désagréments, les risques et les effets indésirables qui pourraient y être associés.

J'ai lu et j'ai eu suffisamment de temps pour comprendre pleinement les renseignements présentés ci-dessus concernant cette étude. J'ai eu l'occasion de poser toutes mes questions et on y a répondu à ma satisfaction. Je suis libre de poser d'autres questions à n'importe quel moment. J'accepte de plein gré de signer ce formulaire de consentement. Je recevrai un exemplaire de ce formulaire après l'avoir signé et daté. Un exemplaire sera également déposé à mon dossier médical. En conséquence, je comprends que cette information sera disponible à toute personne ou compagnie à qui je donnerai accès à mon dossier médical. En apposant ma signature sur ce formulaire, je ne renonce cependant à aucun de mes droits légaux ni ne libère les chercheurs, l'hôpital et l'organisme subventionnaire de leur responsabilité civile et professionnelle.

Nom (en lettres moulées)

Signature du participant

Date (jj/mmm/aa)

Signature de la personne qui a obtenu le consentement si différent du chercheur responsable du projet de recherche

J'ai expliqué au participant à la recherche les termes du présent formulaire d'information et de consentement et j'ai répondu aux questions qu'il m'a posées.

Nom (en lettres moulées) Signature de la personne qui obtient le consentement Date
(jj/mmm/aa)

Engagement du chercheur

Je certifie qu'on a expliqué au participant à la recherche les termes du présent formulaire d'information et de consentement, que l'on a répondu aux questions que le participant à la recherche avait à cet égard et qu'on lui a clairement indiqué qu'il demeure libre de mettre un terme à sa participation.

Je m'engage, avec l'équipe de recherche, à respecter ce qui a été convenu au formulaire d'information et de consentement et à en remettre une copie signée et datée au participant à la recherche.

Nom (en lettres moulées) Signature du chercheur responsable Date
(jj/mmm/aa)

SIGNATURE D'UN TÉMOIN

OUI NON

La signature d'un témoin est requise pour les raisons suivantes :

Difficulté ou incapacité à lire — La personne (témoin impartial) qui appose sa signature ci-dessous atteste qu'on a lu le formulaire de consentement et qu'on a expliqué précisément le projet au (à la) participant(e), qui semble l'avoir compris (se).

Incompréhension de la langue du formulaire de consentement — La personne qui appose sa signature ci-dessous a fait fonction d'interprète pour le ou la participant(e) au cours du processus visant à obtenir le consentement

Nom (en lettres moulées)

Signature du témoin

Date

