



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/nephro>



## MISE AU POINT

# Nouveaux outils en transplantation rénale

## New insights on diagnosis tools after renal transplantation

Éric Thervet\*, Christophe Legendre

*Service de transplantation rénale et de soins intensifs, hôpital Necker, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France*

Reçu le 4 décembre 2005 ; accepté le 12 avril 2006

### MOTS CLÉS

Transplantation rénale ;  
Protéomique ;  
Transcriptome ;  
Génotypage ;  
Rejet aigu ;  
Traitement  
immunosuppresseur

### KEYWORDS

Renal transplantation;  
Proteomic;  
Transcriptomic;  
Genotyping;  
Acute rejection;  
Immunosuppressive  
treatment

**Résumé** La transplantation rénale est le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique parvenue au stade terminal. La détermination du génome humain a modifié comme pour beaucoup de domaines thérapeutiques l'approche des patients vers une meilleure individualisation de la prise en charge. Le but de cet article est de faire le point sur l'apport de ces différentes techniques lors des étapes de la transplantation depuis la période de prétransplantation jusqu'au suivi à distance. Les techniques de génotypage, du transcriptome, de la protéomique et de caractérisation de l'état immunitaire sont analysées dans cet article.  
© 2006 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

**Abstract** Renal transplantation is the best treatment available for end stage renal disease. The determination of human genome has profoundly modified the possible approaches of renal transplant recipient by allowing tailoring of immunosuppressive drugs and immunologic diagnosis. The aim of this review article is to determine the role of these various techniques during the different step before and after transplantation. Genotyping, transcriptome analysis, proteomic as well as the specific immune response are analyzed in this article.  
© 2006 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

La détermination du génome humain a modifié l'approche de nombreux domaines de la médecine en particulier grâce au développement d'outils diagnostics et/ou thérapeutiques innovants. L'allogreffe consiste en l'utilisation d'un organe d'un autre individu pour suppléer la perte chronique d'une fonction de l'organisme. Compte tenu de la complexité des mécanismes impliqués, ce

domaine pourrait bénéficier de l'utilisation de ces nouveaux outils. Nous allons ici préciser la place présente ou à venir de ces différentes techniques.

La prise en charge de l'insuffisance rénale chronique arrivée à son stade terminal nécessite l'utilisation d'une méthode de suppléance. L'épuration extrarénale repose sur une technique de dialyse, hémodialyse ou dialyse péritonéale. La transplantation rénale allogénique va utiliser un organe sain provenant d'un autre individu. C'est la technique de choix puisqu'elle est associée à une amélioration de la qualité de vie et probablement de la survie des

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [eric.thervet@nck.ap-hop-paris.fr](mailto:eric.thervet@nck.ap-hop-paris.fr) (É. Thervet).

patients par rapport à l'hémodialyse. Nous allons succinctement rappeler les étapes de la greffe pour y replacer les différents outils.

Durant la période de préparation et d'attente de la transplantation, le patient bénéficie d'une évaluation pré-transplantation visant à préciser son état immunologique, infectieux, cardiovasculaire et chirurgical.

Lorsqu'un greffon lui est finalement attribué, le patient est transplanté. C'est donc l'organe d'un individu différent avec son propre capital génétique qui va être utilisé. Les caractéristiques de ce greffon sont également importantes à prendre en compte. Il peut s'agir de caractéristiques qui vont déterminer la reprise immédiate de fonction, le risque immunologique de rejet ou la fonction et la survie du greffon à long terme.

Après la transplantation, les patients reçoivent un traitement immunosuppresseur visant à prévenir les épisodes de rejet aigu. Le diagnostic de ces épisodes peut parfois être délicat, en particulier pour les différencier des effets toxiques des traitements immunosuppresseurs utilisés, comme les inhibiteurs de la calcineurine. Le patient bénéficie donc d'un suivi régulier pour adapter le traitement immunosuppresseur et prévenir ou diagnostiquer les complications immunologiques, infectieuses ou tumorales, qui peuvent survenir.

Enfin à plus long terme, cette balance risque/bénéfice existe encore avec d'un côté, le risque de dysfonction chronique du greffon d'origine immunologique et non immunologique et de l'autre les complications infectieuses, tumorales et cardiovasculaires imputables aux traitements. L'appréciation fine de la dose nécessaire et suffisante des traitements immunosuppresseurs serait donc capitale.

Nous allons reprendre à présent l'apport des techniques modernes à chacune des étapes de la vie d'un patient transplanté rénal.

## Période prétransplantation

Durant cette période, il faut préciser au mieux les risques immunologiques et non immunologiques et proposer, si possible, le traitement approprié à un patient donné.

### Caractérisation de l'état immunologique

Avant la greffe, cet état immunologique doit être défini par les caractéristiques HLA, le groupe HLA (classe I et II), mais aussi la recherche d'Ac anti-HLA. Même si l'introduction de nouveaux traitements immunosuppresseurs a diminué son poids, le bénéfice de la compatibilité HLA reste démontré dans le court et le long terme après transplantation rénale [1]. Une approche récente a consisté à définir en particulier chez des patients présentant une immunisation anti-HLA secondaire à une allo-immunisation quelqu'en soit son origine, des antigènes permis [2].

### Choix d'un traitement

Un traitement immunosuppresseur est utilisé après greffe pour prévenir les épisodes de rejet aigu. Ce traitement repose sur l'association initiale d'agents biologiques (anti-

corps antilymphocytes polyclonaux ou monoclonaux) et de traitements chimiques par corticoïdes, inhibiteurs de la calcineurine, inhibiteurs de la synthèse des bases puriques ou inhibiteurs de la mammalian Target Of Rapamycin (mTOR). Les traitements chimiques sont caractérisés par une grande variabilité interindividuelle et un index thérapeutique étroit. Lorsqu'un de ces traitements est administré, il est absorbé et distribué à son site d'action, où il va interagir avec ces cibles. Il est métabolisé et est éliminé. Chacune de ces étapes peut être modulée par des variations génétiques cliniquement significatives. Il a été en effet montré que des mutations ponctuelles de certains enzymes ou transporteurs pouvaient être responsables d'une modification de l'activité et de la pharmacocinétique des traitements utilisés. La pharmacogénétique a pour but d'élucider les bases héréditaires des différences de réponses individuelles à des médicaments en permettant ainsi d'identifier le traitement adéquat et la dose optimale pour chaque patient [3]. Les variations interindividuelles sont plus importantes que les variations intra-individuelles. Cette constatation est compatible avec la notion que l'hérédité est un des déterminants de la réponse aux traitements. Dans la population générale, il est admis que la génétique intervient pour 20 à 95 % de la variation de la biodisponibilité et des effets d'un traitement. De plus, contrairement aux tests phénotypiques dont les résultats peuvent varier avec des facteurs environnementaux tels que l'âge, les interactions médicamenteuses ou l'alimentation, le génotype d'un patient ne nécessite d'être déterminé qu'à une seule reprise pour un gène donné, puisqu'il ne change pas, à l'exception de rares mutations somatiques. Le génotypage peut être réalisé durant l'évaluation prégreffe avec des résultats disponibles lors de la transplantation elle-même. L'absorption et le métabolisme de la majorité des traitements immunosuppresseurs font intervenir deux enzymes, les cytochromes P450 de la famille 3A (CYP3A) et le transporteur P-glycoprotéine (P-gp) codé par MDR-1 [3].

Les membres de la sous-famille CYP3A sont impliqués dans le métabolisme d'endobiotiques, de médicaments et de molécules procarcinogènes de structures diverses. Des différences interindividuelles significatives contribuent à une variabilité de la biodisponibilité orale et de la clairance systémique des substrats des CYP3A [4]. Les activités CYP3A chez l'homme reflètent l'expression hétérogène d'au moins deux membres de la sous-famille CYP3A, les CYP3A4 et CYP3A5, dont les gènes sont situés de façon adjacente sur le chromosome 7q21. Des informations existent sur l'influence des polymorphismes génétiques des CYP3A sur les données pharmacocinétiques du tacrolimus, un immunosuppresseur de la famille des anticalcineurines. En ce qui concerne le gène CYP3A4, plus de 20 polymorphismes uniques de nucléotides (*single nucleotide polymorphism* ou SNP) ont été décrits. Une étude portant sur un SNP localisé dans la région 5' du gène, responsable de l'allèle CYP3A4\*1B, a montré que les patients porteurs de cet allèle ont une concentration résiduelle de tacrolimus ajustée à la dose, reflétant la dose de tacrolimus nécessaire pour obtenir la concentration cible, plus basse que les patients ayant le génotype sauvage (1\*/1\*) [5]. En ce qui concerne le CYP3A5, l'analyse de la composition en ADN complémentaire (ADNc) a montré que seuls les individus avec au

moins un allèle *CYP3A5\*1* (A à la position 6986) produisent de hauts niveaux d'ARNm et expriment la protéine CYP3A5. Celle-ci représente alors au moins 50 % du contenu total en CYP3A [6]. Les porteurs de l'allèle *CYP3A5\*3* (G en position 6986) ont une variabilité de séquence dans l'intron 3 qui crée un site d'épissage et codent pour un ARNm tronqué avec un codon stop prématuré. Nous avons montré avec d'autres que les besoins en tacrolimus sont corrélés à ce polymorphisme du *CYP3A5* [7]. La dose quotidienne nécessaire pour obtenir des taux résiduels de tacrolimus adéquats est plus élevée chez les patients ayant un génotype *CYP3A5\*1/\*1*.

La P-glycoprotéine (P-gp) est un membre de la famille des transporteurs membranaires adénosine triphosphate (ATP)-binding cassette dont le gène est appelé *ABCB1* ou *MDR1*. Une des fonctions principales de la P-gp est de permettre un efflux actif, ATP-dépendant, de substrats. Or, la cyclosporine et le tacrolimus sont des substrats de la P-gp. Des variations interindividuelles significatives d'expression et de fonction de la P-gp peuvent être secondaires à des facteurs génétiques. Compte tenu qu'il existe un déséquilibre de liaison entre différents allèles, une approche par haplotype [par exemple exon 26 3435T et allèle T du SNP G2677T de l'exon 21 (exon 21 2677G > T), qui entraîne une modification de l'acide aminé A893S, et de l'allèle T avec le SNP T1236C de l'exon 12 (exon 12 1236C > T)], pourrait être plus prédictive des modifications de réponse aux traitements qu'une analyse fondée uniquement sur les SNP pris séparément. Ainsi, chez 80 receveurs d'une transplantation rénale, nous avons montré que la dose de tacrolimus nécessaire était plus faible chez les patients qui avaient un ou deux allèles mutés dans les SNP des exons 12, 21 et 26, avec un effet de « dose de gène » [8]. Nous avons analysé nos résultats selon les deux haplotypes les plus fréquents. Nous avons alors montré qu'il existe une augmentation de 61 % des besoins en dose de tacrolimus chez les patients homozygotes pour les allèles sauvages des SNP les exons 12, 21 et 26.

### Caractérisation prétransplantation : polymorphisme génétique des donneurs

La majorité des études se sont penchées sur le rôle du polymorphisme génétique du receveur dans le devenir de la transplantation. Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés. Ces différences pourraient être expliquées par l'autre pièce du puzzle, c'est-à-dire le donneur d'organe. La réponse du tissu à des agressions d'origine immunologique ou non peut varier d'une façon extrêmement importante selon les caractéristiques de ces tissus.

Les investigateurs d'une des premières études portant sur ce sujet ont précisé chez 244 donneurs d'organes les polymorphismes des gènes de l'interleukine (IL)-2 ; IL-6, IL-10, du *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , du TGF- $\beta$ , de l'interféron (IFN)- $\gamma$  et de chémokines (CCR2, CCR5) [9].

Le polymorphisme des gènes du TGF- $\beta$  (T/C du codon 10) et de CCR5 (G/A 59029) a été faiblement associé à la survenue d'un rejet. En revanche, la présence d'un allèle T dans le gène de l'INF- $\gamma$  (+874) a été associée de façon significative à la présence d'une néphropathie chronique d'allo-greffe prouvée par biopsie.

Cette étude démontre à nouveau l'importance de certaines molécules de la réponse immunitaire ou de facteurs de croissance dans les phénomènes survenant après transplantation d'organe. Surtout, cette étude montre que les polymorphismes génétiques du donneur sont importants. Les caractéristiques du donneur d'organe moduleraient ainsi la réponse immune du receveur. En effet, les cytokines ne sont pas allospécifiques et les polymorphismes du donneur pourraient avoir une répercussion sur les événements observés chez les receveurs. Certains polymorphismes pourraient par exemple augmenter les concentrations locales d'INF- $\gamma$ . Une autre explication serait que les cellules mononucléées passagères du donneur expriment différemment des récepteurs de protéines. Cette étude ouvre une nouvelle dimension dans la compréhension des phénomènes de rejet aigu ou chronique et rappelle que c'est bien l'interaction de deux individus qui intervient après transplantation.

### Suivi post-transplantation

Après transplantation rénale, le suivi clinique et biologique a pour but de détecter des complications immunologiques (en particulier les épisodes de rejet aigu) et non immunologiques (en particulier les complications infectieuses).

En ce qui concerne les premières, le dépistage se fait de façon courante par la mesure de la créatininémie, c'est-à-dire de la fonction de filtration du greffon rénal ; cependant deux écueils existent. De nombreux phénomènes, autres que le rejet, peuvent expliquer une augmentation de la créatininémie comme la néphrotoxicité des traitements inhibiteurs de la calcineurine, un obstacle sur les voies urinaires, une infection urinaire. De plus, l'augmentation de la créatininémie est un événement assez tardif dans le processus de rejet aigu comme le montre l'existence de rejets qualifiés d'infracliniques sur les biopsies effectuées à titre systématique [10,11]. La recherche de marqueurs plus précoces est donc intéressante. Les urines sont un milieu privilégié pour ce dépistage. Les urines peuvent être facilement obtenues en clinique humaine. De plus, les urines sont en contact étroit avec les cibles principales des phénomènes de rejet aigu, c'est-à-dire les cellules tubulaires rénales. Enfin, les urines donnent une vision globale de la fonction du greffon à l'inverse d'une biopsie qui ne reflète qu'environ 0,04 % du parenchyme. Initialement des marqueurs tels que la néoptérine urinaire [12], ou l'expression d'ARNm de granzyme-B ou perforine ont été évalués [13]. C'est là que l'apport de la protéomique pourrait se révéler intéressant.

La protéomique est définie comme l'analyse systématique des protéines, de leur identité, de leur quantité et de leur fonction [14]. L'étude des protéines, plus que celle des acides nucléiques, permet une approche des phénomènes de régulation et d'adaptation du corps puisque les protéines sont responsables de la plupart des fonctions physiologiques de la cellule. De plus, l'analyse des fluides biologiques comme l'urine ne peut être réalisée qu'à travers une approche protéomique, car les acides nucléiques ne jouent pas de rôle fonctionnel direct dans les fluides extracellulaires. Enfin, les protéines sont régulées par de nombreuses voies, qui n'impliquent pas obligatoirement

de modifications de l'ARNm. L'abondance des protéines peut changer en cas de transcription ou de stabilité altérées de l'ARNm, ou par une régulation directe de la traduction ou de la demi-vie de la protéine. Des altérations des protéines par protéolyse, par des interactions protéines-protéines, des modifications post-traductionnelles ou de la régulation du trafic régulé peuvent avoir une importance. La première étape d'une étude protéomique repose sur la séparation des protéines par une électrophorèse bidimensionnelle faisant intervenir le point isoélectrique et une électrophorèse standard prenant en compte le poids moléculaire. Après coloration par le bleu de Coomassie, un « spot » peut être caractérisé en utilisant la spectrométrie de masse [MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*) ou SELDI-TOF-MS (*surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*)]. Cette dernière technique permet la caractérisation rapide et à haut débit d'échantillons cliniques multiples.

C'est cette technique qui a été utilisée en transplantation rénale [15-17]. Après validation de la technique, l'équipe de Winnipeg en particulier a décrit les modifications des profils urinaires observés selon le diagnostic (Fig. 1). Ils ont ainsi montré que les patients présentaient trois pics prédominant dans l'analyse protéomique des urines 17 fois sur 18 en cas de rejet aigu et quatre fois sur 22 dans une situation clinique normale [15]. Ces pics n'étaient pas retrouvés en cas de nécrose tubulaire aiguë après trans-

plantation, en cas de glomérulopathie d'allogreffe, d'infection urinaire basse ou d'infection à cytomégalovirus. De plus, la disparition de ces pics était associée à une guérison du rejet aigu, alors que les patients gardant ce profil ont présenté de nouveaux épisodes de rejet aigu. La caractérisation de ces protéines pourrait améliorer notre compréhension des phénomènes de rejet aigu. Cette technique pourrait aussi permettre une détection non-invasive du rejet aigu.

## Diagnostic ponctuel d'un état clinique

En cas de suspicion de rejet, le diagnostic positif et la gravité doivent être appréciés. L'examen de référence reste la biopsie rénale. La classification de Banff acceptée internationalement a permis une harmonisation des diagnostics même si la reproductibilité interobservateurs est imparfaite [18,19]. La biopsie peut être utilisée pour déterminer l'expression d'un gène ou d'une protéine. Le développement d'outils moléculaires pour l'analyse de l'expression de gènes à partir de petits échantillons de tissus humains ouvre de nouvelles opportunités pour l'analyse des biopsies. Initialement l'analyse d'expression de gènes a été réalisée en utilisant des techniques difficiles et laborieuses telles que les Northern Blot, l'hybridation in situ et des réactions de PCR reverse (RT-PCR). L'introduction de la *real-time* RT-PCR et les *microarrays* ont amélioré ces perspectives.

Profils protéiques urinaires

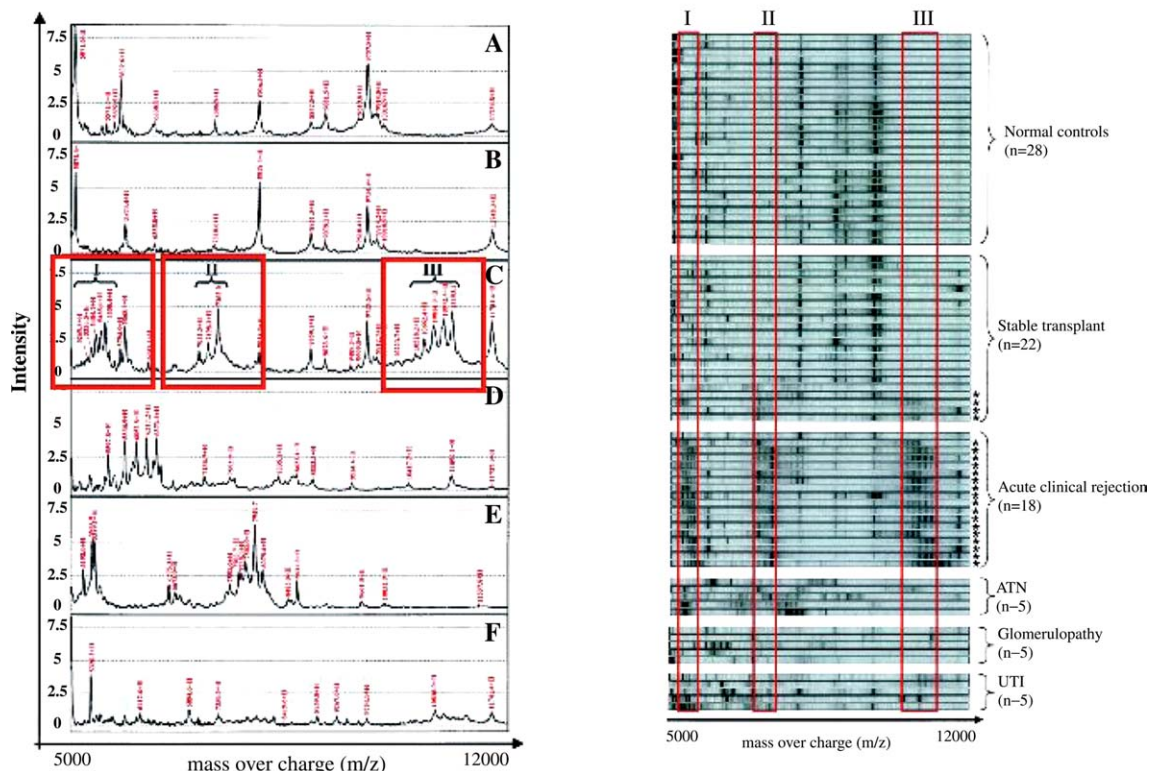


Figure 1 Schaub et al. J. Am. Soc. Nephrol. 2004 ; 15 : 219-227.



## Analyse séquentielle

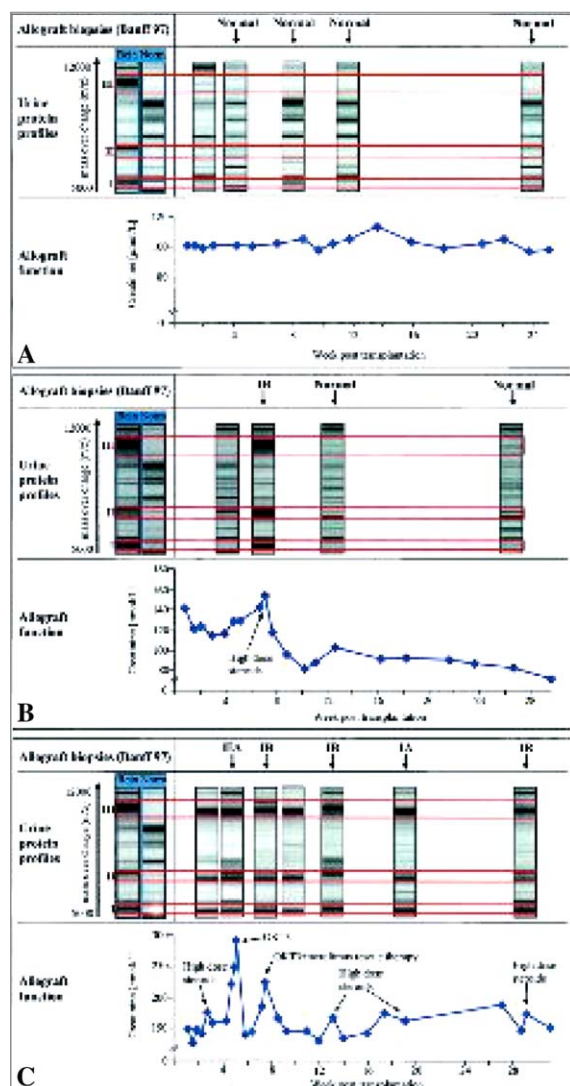


Figure 1 (suite)

La *real-time* RT-PCR associe une meilleure reproductibilité, avec une sensibilité maximale pour la mesure des ARNm à partir de fragments extrêmement limités de tissus. Cette technique a permis le développement de protocoles d'expression de gènes à partir de matériel choisi par microdissection au laser. Cette technique reste cependant limitée à la quantification d'un nombre limité d'ARNm.

En revanche, les techniques de *microarrays* (puce à ADN) offrent la possibilité de la caractérisation d'un transcriptome humain complet. Le terme de *microarray* se réfère à des tests de hautes densités utilisant des oligonucléotides ou des produits de PCR (cADN) immobilisés sur un support solide comme des lamelles de verres. L'ADN immobilisé recherche spécifiquement l'expression de gènes ou de séquences d'intérêt après hybridation avec un mélange de séquences complémentaires. L'hybridation est corrélée à la concentration et l'intensité du signal est proportionnelle à

l'abondance relative de l'ARNm dans l'échantillon à tester. En utilisant des marqueurs colorés, (rouge et vert) l'abondance relative d'ARNm est indiquée par la couleur du point : rouge pour une surexpression de l'ARNm test, vert en cas de sous-expression par rapport à un contrôle. L'expression de plus de 50 000 gènes peut être précisée sur une seule lame.

Le profil d'expression peut être utilisé pour mieux définir un diagnostic ou pour détecter de nouveaux gènes impliqués dans les phénomènes cliniques. Il convient alors de définir et de caractériser les gènes candidats. L'analyse et l'interprétation des données sont primordiales et nécessitent la normalisation et le filtrage des données, ainsi que l'identification de patterns.

Une première étape a été la réalisation du transcriptome de rein intact. En séquençant 400 000 marqueurs d'ADN complémentaire (ADNc) obtenus à partir d'un rein normal, un catalogue des gènes rénaux, incluant une estimation de

Patient stable avec PBR normale

Rejet aigu à S7 - Normal par la suite

Rejets aigus récidivants

la fréquence d'expression a été réalisé et est accessible dans une banque de données [20]. L'intérêt s'est alors porté sur la transplantation [21].

Une des approches a été d'utiliser des biopsies provenant de diverses situations cliniques et d'étudier leur transcriptome. À partir de 67 biopsies de greffon rénal de receveurs pédiatriques, trois signatures moléculaires distinctes ont été identifiées qui font intervenir plus de 1300 gènes d'expression différente [22]. Le diagnostic « rejet aigu » a pu être distingué en trois groupes (AR-I, AR-II et AR-III). Les rejets aigus de type I sont caractérisés pour une infiltration agressive de cellules T, B, *natural killers* (NK) et de macrophages. Au plan génomique, il existe une réponse forte IFN- $\gamma$  et NFK-B. Les rejets aigus de type II sont une forme plus légère de rejet aigu avec une signature d'expression génique similaire à celle observée lors d'une réponse immunitaire normale à une infection ou lors d'une toxicité médicamenteuse. Enfin, les rejets aigus de type III surviennent dans un contexte d'expression génique de quiescence immunologique malgré la présence d'une infiltration mononucléée des tubules sur la biopsie rénale. Ces résultats font discuter le caractère pathologique de ces infiltrats. D'importantes perspectives s'ouvrent à partir de cette étude initiale, si toutefois ces résultats sont confirmés (Fig. 2).

Une autre étude a porté sur l'analyse de biopsies systématiques réalisées six mois après la transplantation [23]. En comparant le profil d'expression obtenu avec la survenue ultérieure d'un rejet chronique, il a été possible de définir un ensemble de dix gènes prédisant le développement d'une néphropathie d'allogreffe un an après la transplanta-

tion. Les gènes surexprimés interviennent dans le remodelage cellulaire, la fibrogenèse et l'activation immunitaire (Fig. 3).

### Caractérisation de l'état immunitaire dans le long terme [24]

Une autre application de ces nouveaux outils est la caractérisation fine de l'état immunitaire d'un patient vis-à-vis de son greffon. Le suivi immunologique peut se définir comme la quantification ex vivo des composants pro- et anti-inflammatoires de la réponse allo-immune antidonneur. Le développement de tests in vitro pouvant permettre la quantification et la caractérisation de cette réponse est une étape nécessaire en transplantation clinique. En plus de la meilleure compréhension des phénomènes de rejet, les objectifs sont d'évaluer les stratégies d'induction de tolérance et/ou d'identifier les patients qui sont devenus tolérants à leur greffon et qui pourraient bénéficier d'un sevrage de l'immunosuppression.

Pour ce suivi, les lymphocytes du sang périphérique sont le plus souvent utilisés même si ce qui se passe en périphérie ne reflète pas obligatoirement ce qui se passe dans le greffon [25]. Ce suivi peut être utilisé avec des tests antigènes spécifiques ou non antigènes spécifiques.

### Tests spécifiques d'antigène

Plusieurs tests ont été développés pour quantifier les lymphocytes reconnaissant spécifiquement les antigènes du

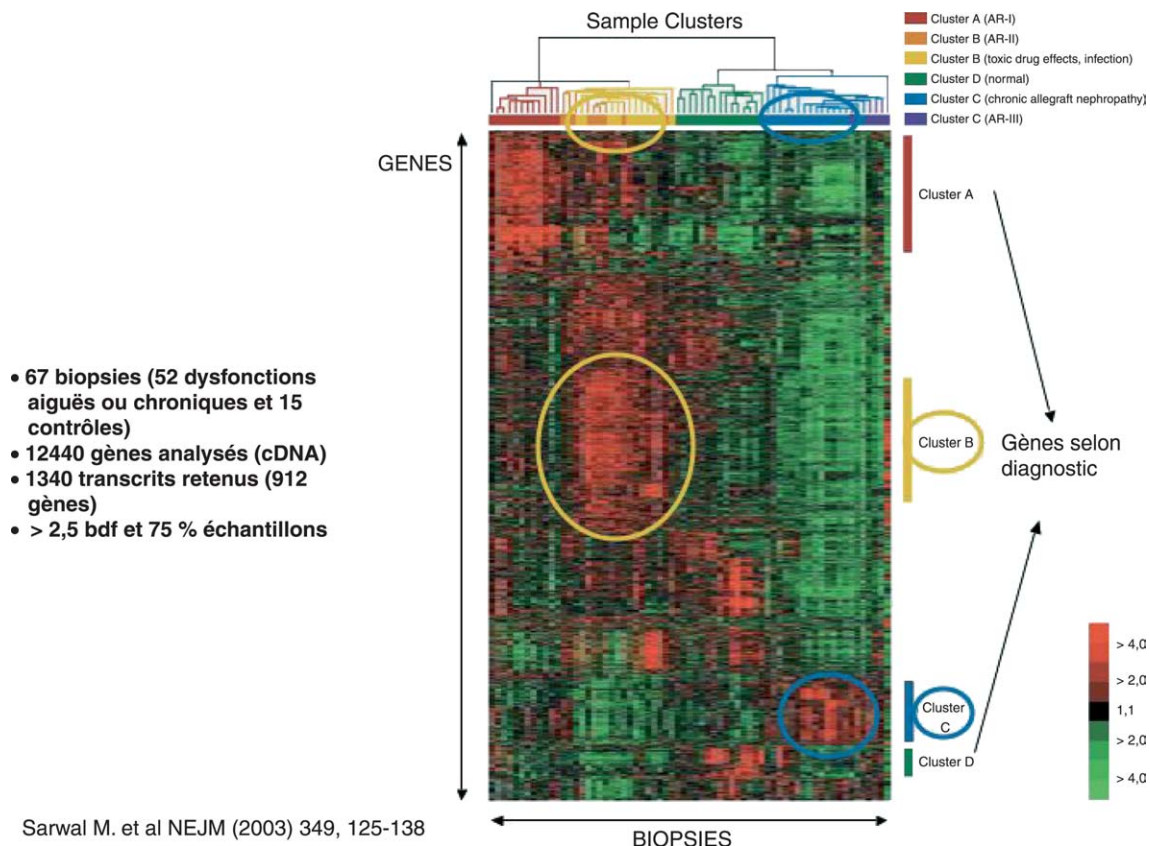


Figure 2

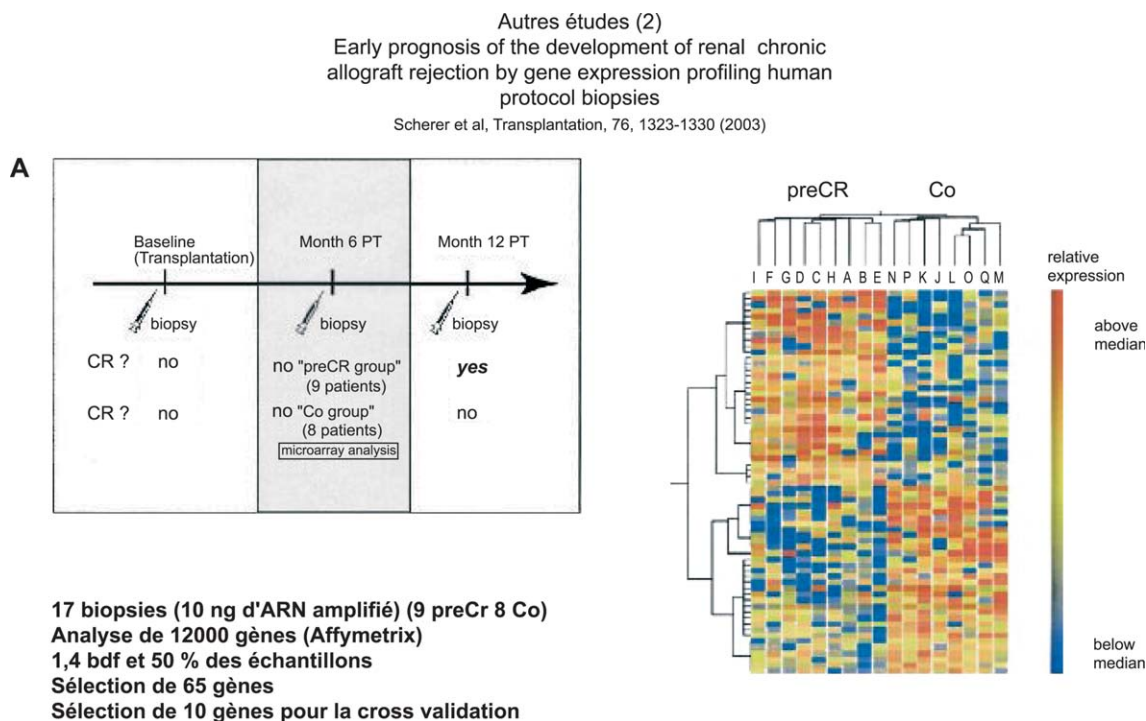


Figure 3

donneur. La réaction lymphocytaire mixte (MLR) a été la première décrite. Sous sa forme conventionnelle utilisant des cellules de panel, elle n'a qu'une faible valeur prédictive [26]. C'est pour cette raison que d'autres tests ont été décrits. Le principal défi qui est posé est la fréquence faible des cellules T impliquées dans les phénomènes de reconnaissance indirecte.

#### Tests en dilution limite

Ces tests permettent la quantification la plus précise de l'immunité à un stimulus donné. Ils permettent aussi une estimation de la fréquence de cellules spécifiques d'un antigène participant à la réponse immunitaire. La technique repose sur la quantification de la prolifération avec des dilutions progressives de cellules répondeuses (soit des lymphocytes périphériques totaux, soit des populations lymphocytaires purifiées) dans des puits contenant des cellules stimulatrices du donneur. Le nombre de puits négatifs pour chaque dilution est déterminé pour calculer une fréquence des précurseurs [27]. Plusieurs fonctions effectrices peuvent être ainsi mesurées : prolifération, sécrétion de cytokines pour déterminer les précurseurs des lymphocytes T auxiliaires (pHTL) [28-30], cytotoxicité pour déterminer les précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques (pCTL) [31]. La production de différentes cytokines peut également être mesurée à partir de ces cultures (interféron- $\gamma$ , IL-5, IL-4, IL10, IL13 ou TNF $\alpha$  par exemple) [32]. Un autre avantage de cette technique de dilution limite est de permettre l'étude de réponses complexes ou de populations cellulaires présentes en faible proportion comme les cellules CD4+CD25+ et d'étudier leur rôle régulateur lorsqu'elles sont ajoutées à des tests de prolifération de cellules CD4+CD25- [33].

#### ELIspot

Ce test est fondé sur la détection d'une cytokine produite par une cellule après stimulation par des mitogènes ou des antigènes [34]. La cytokine sécrétée est détectée par des anticorps monoclonaux spécifiques et révélée par l'apparition de spots reflétant le nombre de cellules sécrétant des cytokines [35]. Dans le contexte de la transplantation, ce test a été utilisé pour identifier la présence de cellules spécifiques du donneur avant ou après l'intervention. Plusieurs études ont montré que la fréquence des ELIspot est corrélée avec la fréquence des précurseurs en dilution limite. L'avantage de ce test est de ne pas être dépendant d'une expansion clonale, excluant ainsi une variable potentielle.

#### Étude de la division cellulaire

Il est possible d'étudier la division cellulaire, et donc la prolifération, par cytométrie de flux en utilisant un colorant réparti également entre cellules filles après division, le carboxyfluoresceine succinimidyl ester (CFSE) [36,37]. Une méthode de ce type a été récemment décrite pour quantifier les réponses alloréactives cellulaires T. Une association avec les études de dilution limite peut être réalisée permettant la mesure des fréquences spécifiques d'antigène. Un des avantages de cette technique est aussi de permettre d'étudier simultanément plusieurs sous-populations de cellules définies phénotypiquement.

#### Utilisation de tétramères HLA

Ces réactifs ont révolutionné la visualisation et la quantification des cellules T spécifiques d'antigènes [38]. Ils consistent en des complexes de 4 CMH-peptides liés de façon covalente à un fluorochrome. L'augmentation de leur affinité en raison de la tétramérisation permet une fixation forte aux cellules T. Des molécules HLA de classe II sont à

présent disponibles [39]. Ils sont en particulier utilisés pour le suivi de la réponse immunitaire à des maladies infectieuses comme le BK virus, ou le virus HHV8 (Données personnelles). Le potentiel réside dans la possibilité de suivi de cellules T spécifiques de peptides à partir de petits volumes sanguins. Avec les tétramères de classe II, il est aussi possible de mesurer directement les cellules T du donneur impliquées dans la réponse « indirecte ».

#### Mesure d'alloanticorps spécifique du donneur

La présence d'anticorps anti-HLA est associée au risque de rejet dans le court terme et la perte de greffon dans le long terme. La recherche de ces anticorps a été d'abord réalisée au moyen d'un panel de lymphocytes en utilisant une cytotoxicité dépendante du complément contre certaines spécificités HLA. De nouvelles techniques ont une meilleure sensibilité et spécificité. Une méthodologie Elisa utilise des molécules HLA solubles adsorbées sur des plaques [40]. Le sérum d'un patient peut être testé pour la présence d'IgG ou d'IgM contre les molécules adsorbées. Les techniques de cytométrie de flux utilisent des lymphocytes des donneurs ou des billes recouvertes de molécules purifiées de classe I ou classe II. Ces méthodes sont de dix à 250 fois plus sensibles que la cytotoxicité [41,42]. Même moins sensible et moins spécifique, l'Elisa présente l'avantage de permettre de tester un grand nombre de prélèvements de façon économique. Cela est important pour le suivi régulier après transplantation.

#### Tests non spécifiques d'antigène

Une approche alternative pour étudier la réponse des cellules à un antigène est le rapprochement d'un état clinique avec la détermination des phénotypes de surface ou d'un état fonctionnel.

#### Répertoire T

Le récepteur des lymphocytes T $\alpha$ B (TCR) est un hétérodimère constitué des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . La chaîne  $\beta$  est composée de différents segments géniques (VB, DB, JB, CB). Un grand nombre de TCR différents peut être généré par l'association aléatoire de ces gènes ainsi que par l'ajout de nucléotides au niveau des jonctions V(D)J. La reconnaissance de l'antigène se fait principalement au niveau de la région hypervariable CDR3 formée par le réarrangement des gènes VB, DB, JB.

L'analyse quantitative du TCR est réalisée grâce au logiciel Immunoscope® qui étudie la répartition des tailles de la région CDR3 dans les différentes familles VB. Lorsque toutes les tailles du CDR3 sont représentées dans une famille VB donnée, on observe un profil gaussien, caractéristique d'une réponse polyclonale. À l'inverse, les transcrits utilisant une taille particulière du CDR3 peuvent être majoritairement représentés dans une famille VB donnée par sélection clonale. On parle alors d'expansion oligo- ou monoclonale.

Il est possible de comparer le profil d'un échantillon par rapport au profil témoin en calculant la différence entre l'aire sous chaque pic du profil du témoin et du profil de l'échantillon. Le pourcentage de perturbation par rapport

au profil gaussien est visualisé grâce à des codes couleurs qui visualisent l'ensemble des altérations qualitatives des familles VB.

Une nouvelle méthode décrite par l'équipe de Nantes permet d'ajouter une dimension quantitative à l'étude des altérations qualitatives du répertoire du TCR des lymphocytes T [43]. Dans une étude initiale, cette technique appelée TcLandscape a permis de discriminer par leur profil d'utilisation des VB les patients tolérant leur greffon rénal en l'absence de traitement immunosuppresseur et les patients présentant des signes de rejet [44]. Les profils observés à partir du sang des patients tolérant leur greffon sont caractérisés par de rapports élevés des transcrits VB/HPRT associés à une forte altération de la distribution de taille de la région CDR3 dans plusieurs familles VB (Fig. 4). La caractérisation préalable d'une « signature immunologique » de la tolérance est fondamentale pour identifier les malades stables à distance de la greffe à qui éventuellement proposer une diminution progressive des traitements immunosuppresseurs.

#### Analyse du transcriptome des lymphocytes

L'utilisation des puces à ADN déjà décrites dans cette revue pour l'expression de gènes dans le greffon peut être réalisée sur des lymphocytes pour suivre de façon dynamique l'état de réponse immunitaire du patient. Un article récent montre que les lymphocytes circulants de patients avec un greffon rénal fonctionnellement normal ont un profil différent des patients présentant une dysfonction rénale [45]. Des phénomènes précédant la survenue de lésions histologiques pourraient exister dans les lymphocytes de patients. Les lymphocytes périphériques de patients avec des greffons fonctionnels montrent une surexpression des gènes de la réponse immune-inflammation, de croissance cellulaire et de régulation, du métabolisme protéique et de l'expression de facteurs de transcription et de régulation de gènes.

#### Conclusion

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire est en train de bouleverser le suivi potentiel des patients transplantés. Ces approches vont pouvoir être utiles à toutes les étapes de la transplantation (Fig. 5).

Avant la greffe, la meilleure caractérisation des groupes HLA et des anticorps anti-HLA pourra définir des groupes à risque immunologique et permettre une meilleure approche de la compatibilité du couple donneur-receveur. La caractérisation génomique d'un patient vis-à-vis des enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques permettra d'individualiser le traitement choisi.

Une fois le donneur choisi, les techniques de cross-match sensibilisées pourront également mieux définir la réelle compatibilité entre le donneur et son receveur. L'analyse génomique du donneur pourra préciser le risque accru de reprise retardée de fonction du greffon ou de survenue ultérieure d'un rejet.

Après la greffe, l'analyse non invasive du profil protéomique des urines permettra un dépistage plus précoce du rejet en transplantation rénale, et le suivi de son évolution (guérison ou récurrence).



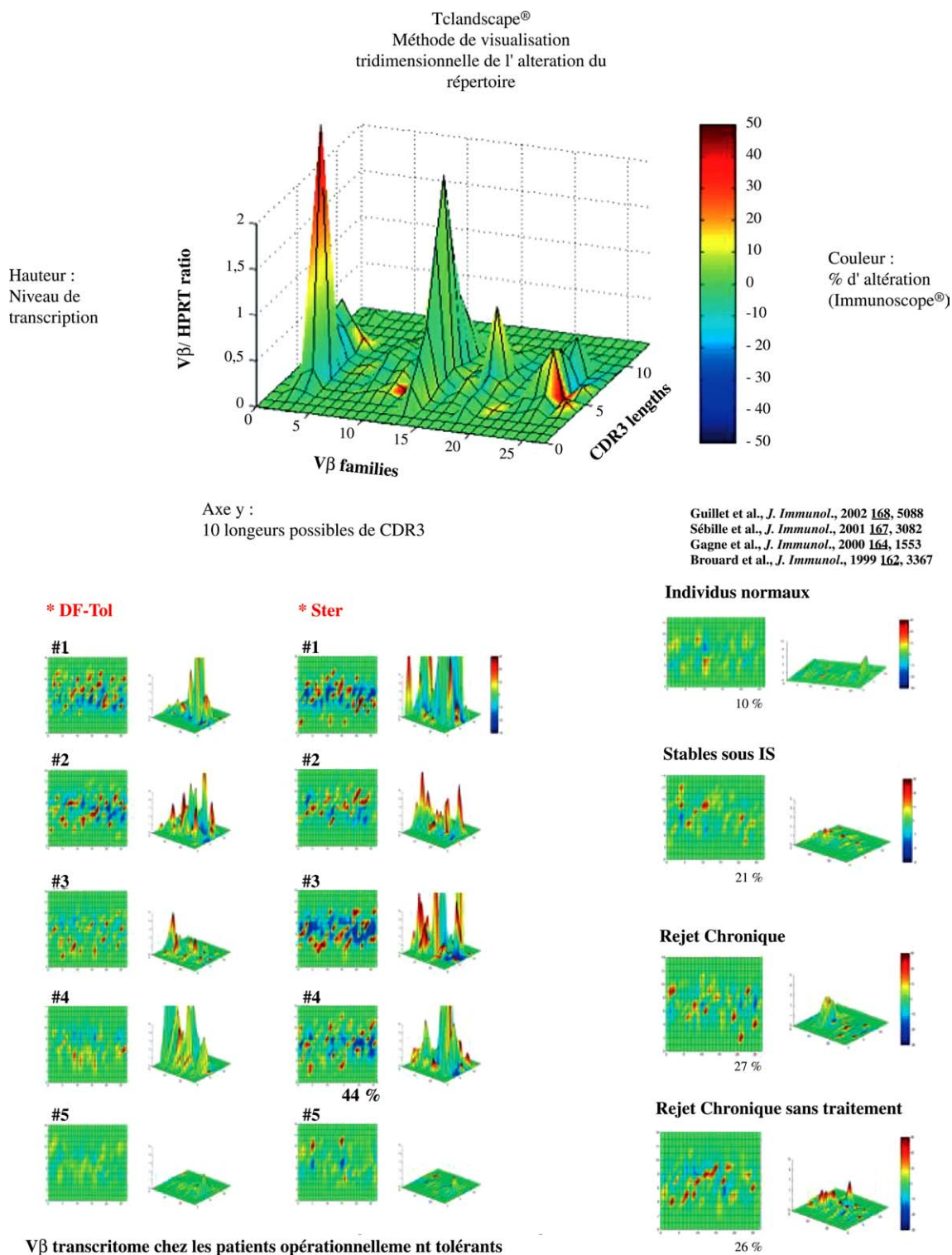


Figure 4 Brouard S. et al. Am. J. Transplant. 2005 ; 5 : 330-340.

En cas de suspicion de rejet, l'analyse du transcriptome de la biopsie du greffon pourra aider au diagnostic définitif et au pronostic.

Enfin, les techniques d'analyse de la réponse immunitaire antigène spécifique ou non pourront permettre une modulation individualisée du traitement en détectant les

patients tolérants ou « presque tolérants » pour lesquels une diminution des posologies des traitements immunosuppresseurs pourrait être proposée afin de limiter les effets indésirables de ces derniers.

Il convient à présent, de réaliser des études à large échelle pour valider les hypothèses retenues sur des petites

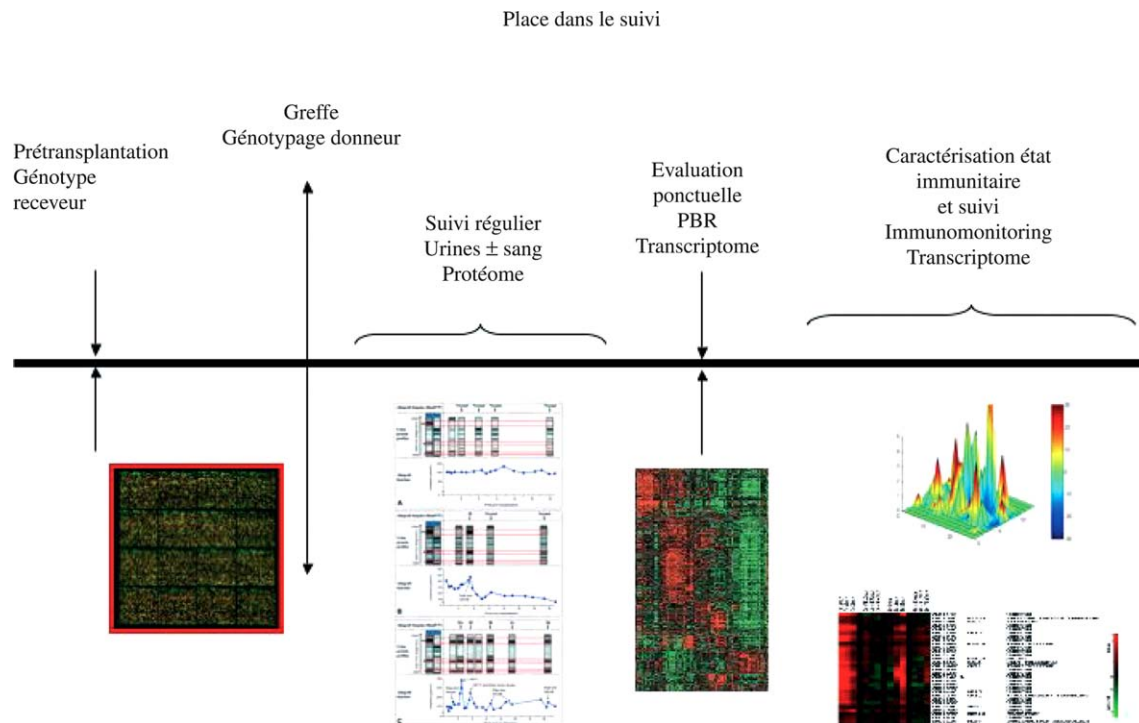


Figure 5

séries. Une première étape est la caractérisation précise de toutes ces cohortes de patients. Dans un second temps des études prospectives sur des populations indépendantes devront démontrer l'utilité clinique et le caractère économiquement viable de toutes ces approches avant qu'elles ne soient utilisées en clinique pratique.

## Références

- [1] Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003;3(6):665.
- [2] Duquesnoy RJ, Howe J, Takemoto S. HLAmatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. IV. An alternative strategy to increase the number of compatible donors for highly sensitized patients. *Transplantation* 2003;75(6):889.
- [3] Anglicheau D, Legendre C, Thervet E. Pharmacogenetics in solid organ transplantation: present knowledge and future perspectives. *Transplantation* 2004;78(3):311.
- [4] Thervet E, Legendre C, Beaune P, Anglicheau D. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs. *Pharmacogenomics* 2005;6(1):37.
- [5] Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74(3):245.
- [6] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27(4):383.
- [7] Thervet E, Anglicheau D, King B, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;76(8):1233.
- [8] Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7):1889.
- [9] Hoffmann S, Park J, Jacobson LM, et al. Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2004;66(4):1686.
- [10] Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994;57(2):208.
- [11] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24):2326.
- [12] Grebe SO, Mueller TF. Immune monitoring in organ transplantation using neopterin. *Curr Drug Metab* 2002;3(2):189.
- [13] Li B, Hartono C, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344(13):947.
- [14] Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001;36(10):1083.
- [15] Schaub S, Rush D, Wilkins J, et al. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(1):219.
- [16] O'Riordan E, Orlova TN, Mei JJ, et al. Bio-informatics analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(12):3240.
- [17] Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS, Molmenti EP. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg* 2003;237(5):660.
- [18] Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55(2):713.
- [19] Furness PN, Taub N. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTAP Project. *Kidney Int* 2001;60(5):1998.

- [20] Yano N, Endoh M, Fadden K, et al. Comprehensive gene expression profile of the adult human renal cortex: analysis by cDNA array hybridization. *Kidney Int* 2000;57(4):1452.
- [21] Mansfield ES, Sarwal MM. Arraying the orchestration of allograft pathology. *Am J Transplant* 2004;4(6):853.
- [22] Sarwal M, Chua MS, Kambham N, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003;349(2):125.
- [23] Scherer A, Krause A, Walker JR, Korn A, Niese D, Raulf F. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 2003;75(8):1323.
- [24] Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev* 2003;196:247.
- [25] McLean A. What goes around (in kidney transplant rejection) does not necessarily come around (in the blood). *Am J Transplant* 2003;3(9):1045.
- [26] Segall M, Noreen H, Edwins L, Haake R, Shu XO, Kersey J. Lack of correlation of MLC reactivity with acute graft-versus-host disease and mortality in unrelated donor bone marrow transplantation. *Hum Immunol* 1996;49(1):49.
- [27] Strijbosch LW, Buurman WA, Does RJ, Zinken PH, Groenewegen G. Limiting dilution assays. Experimental design and statistical analysis. *J Immunol Methods* 1987;97(1):133.
- [28] Orosz CG, Adams PW, Ferguson RM. Frequency of human alloantigen-reactive T lymphocytes. II. Method for limiting dilution analysis of alloantigen-reactive helper T cells in human peripheral blood. *Transplantation* 1987;43(5):718.
- [29] Moretti L, Giuliadori L, Stramigioli S, Luchetti F, Baldi A, Sparaventi G. Limiting dilution analysis of IL-2 producing cells: I. Studies of normal human peripheral blood. *Haematologica* 1992;77(6):463.
- [30] Hornick PI, Brookes PA, Mason PD, et al. Optimizing a limiting dilution culture system for quantifying the frequency of interleukin-2-producing alloreactive T helper lymphocytes. *Transplantation* 1997;64(3):472.
- [31] Kaminski E, Hows J, Goldman J, Batchelor R. Optimizing a limiting dilution culture system for quantifying frequencies of alloreactive cytotoxic T lymphocyte precursors. *Cell Immunol* 1991;137(1):88.
- [32] Kelso A, Macdonald HR. Precursor frequency analysis of lymphokine-secreting alloreactive T lymphocytes. Dissociation of subsets producing interleukin 2, macrophage-activating factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the basis of Lyt-2 phenotype. *J Exp Med* 1982;156(5):1366.
- [33] Game DS, Hernandez-Fuentes MP, Chaudhry AN, Lechler RI. CD4+CD25+ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(6):1652.
- [34] Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, et al. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 1995;181(1):45.
- [35] Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988;110(1):29.
- [36] Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;171(1):131.
- [37] Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 1997;100(12):3173.
- [38] Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996;274(5284):94.
- [39] Reijonen H, Kwok WW, Nepom GT. Detection of CD4+ autoreactive T cells in T1D using HLA class II tetramers. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:82.
- [40] Kao KJ, Scornik JC, Small SJ. Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies: an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation* 1993;55(1):192.
- [41] Scornik JC, Bray RA, Pollack MS, et al. Multicenter evaluation of the flow cytometry T-cell crossmatch: results from the American Society of Histocompatibility and Immunogenetics-College of American Pathologists proficiency testing program. *Transplantation* 1997;63(10):1440.
- [42] Rebibou JM, Chabod J, Bittencourt MC, et al. Flow-PRA evaluation for antibody screening in patients awaiting kidney transplantation. *Transplant Proc* 2000;32(8):2745.
- [43] Douillard P, Pannetier C, Josien R, et al. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 1996;157(3):1250.
- [44] Brouard S, Dupont A, Giral M, et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2005;5(2):330.
- [45] Flechner SM, Kurian SM, Head SR, et al. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant* 2004;4(9):1475.