



**HAL**  
open science

# Rejet en transplantation cardiaque : au-delà du C4d, les nouveaux marqueurs biologiques, immunologiques et cellulaires

Marion Tible

## ► To cite this version:

Marion Tible. Rejet en transplantation cardiaque : au-delà du C4d, les nouveaux marqueurs biologiques, immunologiques et cellulaires. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05S009 . tel-01088048

**HAL Id: tel-01088048**

**<https://theses.hal.science/tel-01088048>**

Submitted on 27 Nov 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du  
GRADE DE DOCTEUR

Par

**Marion TIBLE**

Discipline : Biologie Cellulaire, Moléculaire et Physiologie

Domaine : Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole doctorale : Biologie et Biotechnologie, parcours Pathologies Cardiovasculaires  
Université Paris Diderot

**Rejet en transplantation cardiaque :  
Au-delà du C4d, les nouveaux marqueurs biologiques,  
immunologiques et cellulaires**

Soutenance le 29 septembre 2014

Membres du jury

<i>Président</i>	Pr. JP Duong Van Huyen	Necker, Enfants Malades, PARCC
<i>Rapporteurs</i>	Pr. Beatrice Charreau	CHU Nantes
	Pr. JL Taupin	CHU Bordeaux
<i>Examineurs</i>	Dr David Buob	Hôpital Tenon
	Dr Eric Epailly	CHU Strasbourg
<i>Directeur de thèse</i>	Pr. Patrick Bruneval	Hôpital Européen Georges Pompidou, PARCC, membre de l'AECVP

Cette thèse a été préparée au sein de l'Unité d'Anatomie Pathologique de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, du laboratoire INSERM U775 et du Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC). Université Paris Descartes et Paris Diderot.

# Remerciements

Merci à Patrick Bruneval, le Boss. Sans lui, tout ce travail aurait été impossible et je le remercie d'avoir toujours été patient, attentif et formateur en tout.

Merci à Jean-Paul Duong, celui avec qui j'ai appris plus en trois ans qu'en cinq à la fac. Je le remercie de m'avoir aidé et expliqué toutes les ficelles du métier.

Merci à Alexandre Loupy, sur tous les fronts, un exemple d'efficacité et de rigueur, avec qui j'ai beaucoup appris. Merci d'avoir ajouté ta patte à nos papiers et d'avoir été patient avec moi.

Merci à Thibaut Beuscart, d'avoir été là et d'avoir participé activement à l'avancée des études à tous.

Merci à Marie-Cécile Bories, enthousiasme et gentillesse incarnés, merci de nous avoir aidé à monter les bases de données immangeables et d'avoir souffert pour nos études.

Merci à Romain Guillemain et Catherine Amrein pour vos expertises de cardiologues et votre bonne humeur.

Merci à Veronica Pezella et Thierry Le Gall pour votre implication dans nos travaux et le management de données sans faille.

Merci à Arnaud Gay et Arnaud François, d'une grande réactivité et compétence.

Merci à Jean-Luc Taupin et Marc-Alain Billes pour votre enthousiasme et votre aide constante.

Merci à Eric Epailly pour ton implication dans nos projets.

Merci à Shaida Varnous, de nous avoir aidé à monter nos études en collaboration avec la Pitié.

Merci à Philippe Rouvier d'avoir toujours répondu présent pour travailler avec nous et de faire preuve de beaucoup de pédagogie avec moi.

Merci à Dany Anglicheau de m'avoir aidé à lancer le projet miRNA.

Merci à Xavier Loyer, qui m'a formée et rompue aux techniques d'hybridation in situ, ta bonne humeur et ton enthousiasme rendent le travail plus facile.

Merci également aux équipes du 2<sup>ème</sup> étage du PARCC de m'avoir accueillie dans vos locaux.

Un grand merci à toute l'équipe d'anatomie pathologique, pour l'ambiance de travail et ma formation aux techniques d'immunohistochimie.

Merci à Chantal Mandet, qui a du faire des centaines de lames pour nos études.

Cela va de soi, je remercie ma famille et mes proches pour leur soutien. Un remerciement tout particulier à mes grands-parents, scientifiques dans l'âme, toujours à l'écoute.

Merci également à tous mes amis, néophytes ou non, qui n'ont probablement pas tout compris à mon travail mais qui ont toujours été présents et enthousiastes à mes côtés.

# Abréviations

AMR : Antibody-Mediated Rejection  
ABM : Agence de la Biom  
ACR : Acute Cellular Rejection  
Akt : Protéine Kinase B  
AVC : Accident Vasculaire Cérébral  
CAV : Cardiac Allograft Vasculopathy  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
COX2 : Cyclo-Oxygénase 2  
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes  
DSA : Donor-Specific Antibodies  
4E-BP1 : eIF4E - binding protein 1  
eIF4E : Eukaryotic translation initiation factor 4E  
FAK : Focal Adhesion Kinase  
GPCR : G-Protein Coupled Receptor  
HLA : Human Leukocyte Antigen  
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule  
Ig : Immunoglobuline  
IL : Interleukine  
INF $\gamma$  : Interferon gamma  
ISHLT : International Society for Heart & Lung Transplantation  
LPS : LipoPolySaccharide  
MAP kinase : Mitogen-Activated Proteine Kinase  
MDC : Myeloid Dendritic Cells  
mTOR : Mammalian target of *rapamycin*  
MVG : Maladie Vasculaire du Greffon  
NF $\kappa$ B : Nuclear *factor*  $\kappa$ B  
NK : Natural Killer  
NO : Nitric Oxyde  
OLS : Organes lymphoïdes secondaires  
PI3K : PhosphoInositide-3 Kinase  
PRAS40 : proline-rich Akt substrate 40kDa

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

Raptor : regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin

SREBP1/2 : Sterol regulatory element-binding protein1/2

S6RP : S6 ribosomal protein

(P70)S6K : S6 kinase

TCR : T-Cell Receptor

TIF-1A : Tripartite motif-containing protein-24

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule

## Liste des publications

JP Duong Van Huyen\*, **M Tible\***, P Bruneval, A Gay, D. Vernerey, O Aubert, A François, S Varnous, F Iserin, P Rouvier, X Loyer, R Guillemain, P Leprince, A Loupy and X Jouven (2014, European Heart Journal, sous presse) « MicroRNAs As Non-Invasive Biomarkers of Heart Transplant Rejection »

*\* Co-premier auteurs*

**M Tible**, A Loupy, D Vernerey, C Suberbielle, T Beuscart, A Cazes, R Guillemain, C Amrein, V Pezella, JN Fabiani, GS Hill, JP Empana, X Jouven, D Charron, P Bruneval, JP Duong Van Huyen. (2013, J Heart Lung Transplant. Aug; 32(8):769-76) « Pathological classification of antibody-mediated rejection (pAMR) correlates with DSA and endothelial cell activation »

Loupy A, Cazes A, Guillemain R, Amrein C, Hedjoudje A, **Tible M**, Pezella V, Fabiani JN, Suberbielle C, Nochy D, Hill GS, Empana JP, Jouven X, Bruneval P, Duong Van Huyen JP. (2011, Am. J. Transplant. Jul; 11(7):1478-87) « Very late heart transplant rejection is associated with microvascular injury, complement deposition and progression to cardiac allograft vasculopathy »

## Listes des communications orales

M. Tible, A. Loupy, D. Vernerey, T. Beuscart, X. Jouven, A. Cazès, C. Amrein, V. Pezella, R. Guillemain, C. Suberbielle, D. Charron, P. Bruneval, JP. Duong Van Huyen. « MicroRNAs As Non-Invasive Biomarkers of Heart Transplant Rejection », ISHLT Congress, San Diego, Avril 2014

M. Tible, A. Loupy, D. Vernerey, T. Beuscart, X. Jouven, A. Cazès, C. Amrein, V. Pezella, R. Guillemain, C. Suberbielle, D. Charron, P. Bruneval, JP. Duong Van Huyen. « The Activation of mTOR Pathway in Endothelial Cells Correlates with Antibody-Mediated Rejection (AMR) in Endomyocardial Biopsies (EMB) », ISHLT Congress, Montréal, Avril 2013

M. Tible, A. Loupy, D. Vernerey, T. Beuscart, X. Jouven, A. Cazès, C. Amrein, V. Pezella, R. Guillemain, C. Suberbielle, D. Charron, P. Bruneval, JP. Duong Van Huyen. « Activation de la voie mTOR et rejet humoral », Congrès de la Société Francophone de Transplantation, Nantes, Décembre 2012.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>3</b>
<b>I. DEFIS ACTUELS EN TRANSPLANTATION CARDIAQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>II. LE REJET EN TRANSPLANTATION CARDIAQUE .....</b>	<b>8</b>
A. Immunologie du rejet de greffe .....	8
1. <i>Rejet Cellulaire (ACR)</i> .....	8
2. <i>Rejet Humoral (AMR)</i> .....	11
B. Diagnostic du rejet en transplantation cardiaque .....	20
1. <i>Expression clinique et traitement</i> .....	20
2. <i>Diagnostic histologique et classification du rejet aigu</i> .....	22
<b>III. LE VAISSEAU : UNE CIBLE MAJEURE DU REJET .....</b>	<b>26</b>
A. La cellule endothéliale .....	26
B. L'activation endothéliale au cours du rejet.....	27
C. L'activation de la voie mTOR.....	29
D. Mécanisme de l'atteinte vasculaire.....	30
1. <i>Lésions vasculaires du rejet chronique</i> .....	30
2. <i>Physiopathologie de la lésion vasculaire</i> .....	33
<b>IV. LES BIOMARQUEURS DU REJET : DES MARQUEURS CONNUS AUX NOUVELLES DECOUVERTES TRANSCRIPTOMIQUES .....</b>	<b>35</b>
A. Les biomarqueurs classiques : une approche insuffisante .....	35
B. Les études transcriptomiques : l'approche révolutionnaire.....	36
<b>V. LES miARNs.....</b>	<b>41</b>
1. <i>Biogénèse des miARNs</i> .....	41
2. <i>Implications cliniques des miARNs</i> .....	44
<b>OBJECTIFS DES ETUDES .....</b>	<b>47</b>
<b>PARTIE I : VOIE mTOR ET IMPLICATION DANS LE DIAGNOSTIC DU REJET ..</b>	<b>49</b>
<b>I. ACTIVATION DE LA VOIE mTOR PAR LES ANTICORPS ANTI-HLA .....</b>	<b>50</b>
<b>II. VOIE mTOR ET REJET EN TRANSPLANTATION CARDIAQUE .....</b>	<b>52</b>
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>63</b>

<b>IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>65</b>
<b>PARTIE II: LES microARNs COMME BIOMARQUEURS DU REJET .....</b>	<b>68</b>
<b>I. miARNs ET PHYSIOPATHOLOGIE CARDIAQUE .....</b>	<b>69</b>
<b>II. miARNs SPECIFIQUES DE LA PATHOLOGIE DU REJET .....</b>	<b>71</b>
A. Les études miARNs en transplantation.....	71
B. Les miARNs circulants dans les processus associés au rejet.....	72
1. <i>miARNs endothéliaux</i> .....	72
2. <i>miARNs inflammatoires</i> .....	75
3. <i>miARNs cardiomyocytaires et fibroblastiques</i> .....	78
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>93</b>
<b>IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES .....</b>	<b>96</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>99</b>
<b>I. COHORTES D'ETUDES .....</b>	<b>100</b>
A. Partie I : Etude de la voie mTOR .....	100
1. <i>Sélection des malades</i> .....	100
2. <i>Protocole d'étude</i> .....	101
B. Partie II : Etude des miARNs .....	101
1. <i>Sélection des malades</i> .....	101
2. <i>Protocole d'étude</i> .....	102
C. Diagnostic histopathologique.....	102
<b>II. MARQUAGES HISTOLOGIQUES .....</b>	<b>103</b>
A. Techniques de marquages morphologiques.....	103
B. Immunohistochimie C4d/CD68 .....	103
C. Immunohistochimie mTOR .....	104
<b>III. ETUDES <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>105</b>
<b>IV. EXTRACTION DES ARNS.....</b>	<b>107</b>
A. Dans le tissu .....	107
B. Dans le sérum.....	107
<b>V. PCR EN TEMPS REEL .....</b>	<b>107</b>

A. Reverse transcription .....	107
B. PCR en temps réel.....	108
C. Analyse des données .....	108
<b>VI. HYBRIDATION <i>IN SITU</i>.....</b>	<b>109</b>
A. Préparation des sondes .....	109
B. Hybridation et rinçages .....	109
<b>VII. OUTILS STATISTIQUES .....</b>	<b>110</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>111</b>

# **Introduction Générale**

La transplantation cardiaque est aujourd'hui la seule option de traitement à long terme pour les patients souffrant d'insuffisance cardiaque terminale. Malgré des progrès considérables dans les traitements immunosuppresseurs, le rejet d'allogreffe reste une cause majeure de la perte du greffon. Dans ce domaine, des études récentes ont souligné l'importance du rejet humoral (AMR) comme un facteur contributif important à l'évolution, précoce ou tardive, de la maladie vasculaire du greffon et, *in fine*, à la perte de ce greffon.

La pierre angulaire du diagnostic de rejet repose sur la biopsie endomyocardique (BEM) et l'évaluation histopathologique classique. Cependant, les épisodes de rejet observés sont aujourd'hui plus rares et plus complexes qu'auparavant, du fait de la présence de formes tronquées, indolentes et mixtes empêchant un diagnostic précis avec une évaluation conventionnelle. En outre, la BEM est une procédure invasive, entraînant des coûts importants, un inconfort pour le patient et un risque non négligeable de complications graves. Par conséquent, l'évaluation histologique conventionnelle ne reflète pas la complexité du rejet de greffe cardiaque et a besoin d'améliorations en termes de diagnostic.

Le travail présenté dans cette thèse explore deux types de biomarqueurs, la voie mTOR, marqueur *in situ*, et les micro-ARNs, marqueurs circulants, qui permettraient une meilleure classification du rejet et constitueraient une aide diagnostique et/ou prédictive à la pratique clinique quotidienne lors du suivi des patients transplantés.

## I. Défis actuels en transplantation cardiaque

La transplantation cardiaque est actuellement le traitement de dernière intention pour les patients présentant des insuffisances cardiaques sévères d'origines diverses (post-infarctus, cardiomyopathies...). Les progrès réalisés dans les domaines de la réanimation, de la technique chirurgicale et de la compréhension des mécanismes immunologiques, favorisant notamment l'introduction de traitements immunosuppresseurs efficaces, ont permis de généraliser cette pratique. Cependant, la procédure de transplantation implique une opération lourde, avec un pourcentage de décès per-opératoires aux alentours de 5%.

Selon les rapports de l'ISHLT et de l'ABM, on compte 4050 transplantations cardiaques dans le monde entier, dont environ 440 par an en France. Les Etats-Unis à eux seuls représentent la moitié de ces greffes. La majorité des transplantés sont des hommes (75%) d'âge médian (54 ans en moyenne) présentant une cardiomyopathie dilatée (45%).

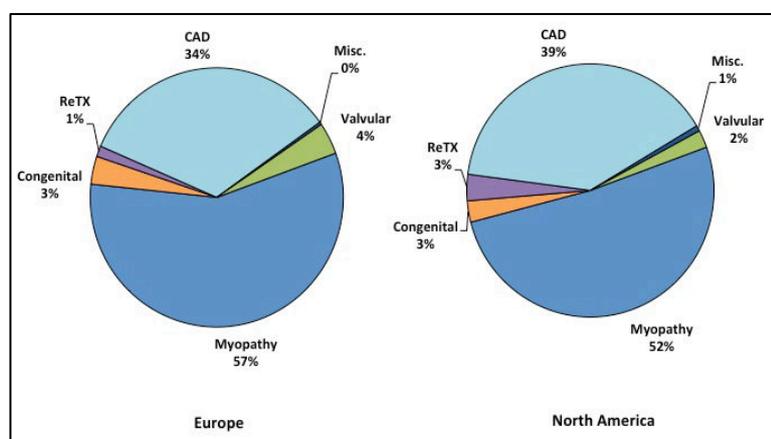


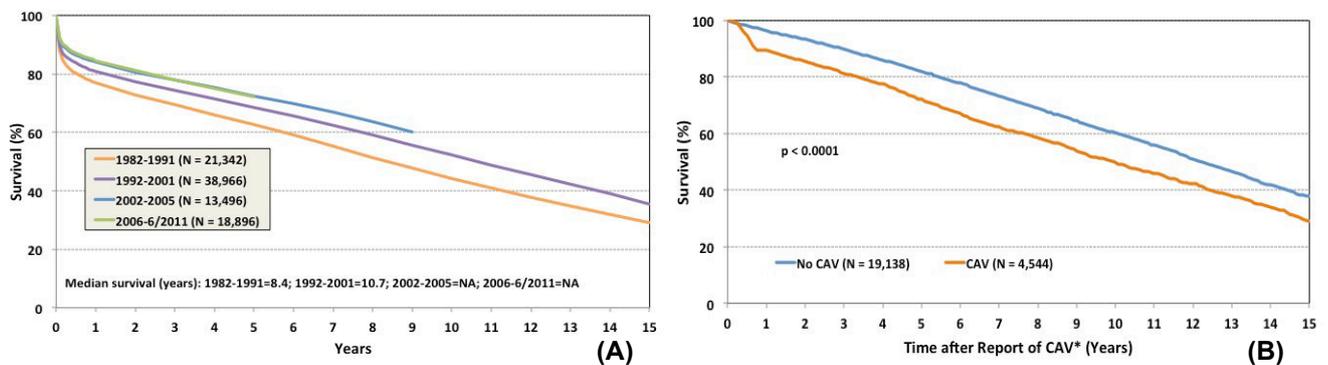
Figure 1. Causes de transplantation dans le monde (registre de l'ISHLT)  
CAD : Coronary Artery Disease, Misc : Divers, ReTX : retransplantation.

Les donneurs sont majoritairement des hommes (68%), plutôt jeunes (37 ans en moyenne), décédés des suites de traumatismes crâniens (45%) ou d'AVC (24%). Le temps d'ischémie froide a tendance à s'améliorer depuis les dix dernières années et se situe aujourd'hui aux alentours de 3 heures.

Malgré des progrès importants, la survie globale à un an reste stable, avec 75% des greffés en vie. La cause principale de perte du greffon dans la première année reste le rejet aigu, malgré un suivi lourd incluant des biopsies systématiques régulières et une surveillance cardiologique clinique et échographique.

Après la première année de greffe, le greffon cardiaque est soumis à de multiples stress : le stress ischémique (artériosclérose [1-3]), le stress immunologique (rejet aigu et/ou chronique [4, 5]) et le stress métabolique (diabète, dyslipidémie [6, 7]). Les réponses adaptatives à ces différents stress vont à la fois être des réponses protectrices, comme les processus de survie cellulaire, mais aussi des réponses délétères induisant des lésions structurelles, comme la fibrose.

Au long terme, les causes de mortalité incluent des infections, des cancers, mais surtout une dysfonction chronique du greffon, un processus fluctuant et souvent asymptomatique durant les premières années, lié principalement à l'apparition d'une maladie vasculaire du greffon. Les rejets au long terme constituent des défis persistants, qu'ils soient à médiation cellulaire ou humorale.



*Figure 2. Courbe Kaplan Meir de survie. (A) Survie en fonction des années. (B) Survie en fonction de la survenue de CAV. On remarque que la survie à long terme n'a pas beaucoup évoluée durant les dernières décennies et que la CAV est un facteur majeur de survie à long terme.*

Le rejet humoral n'a été individualisé et identifié par la classification de l'ISHLT qu'à partir de 2005. Le diagnostic de ce type de rejet repose sur l'association d'anomalies histologiques, de la présence de dépôts de C4d et de la détection d'anticorps sériques spécifiquement dirigés contre les antigènes du donneur, notamment les antigènes du système HLA.

Cependant, des travaux récents mettent l'accent sur la sensibilité médiocre des méthodes de détection immunohistochimiques du C4d [8-10]. L'existence de formes de rejet humoral C4d-négatives est en effet aujourd'hui admise. D'autre part, des

rejets humoraux C4d-positifs survenant en l'absence d'anticorps anti-HLA détectables ont aussi été décrits [11].

Ainsi, outre l'intérêt d'une analyse morphologique mieux documentée, l'identification de nouveaux marqueurs du rejet, en particulier humoral, s'avère aussi indispensable. **La perte tardive du greffon reste à ce jour la problématique majeure du suivi de greffe** : pour mieux la prévenir, de nouveaux outils diagnostiques prédictifs, idéalement circulants, sont nécessaires.

## **II. Le rejet en transplantation cardiaque**

Les épisodes de rejet d'allogreffe, dont les mécanismes physiopathologiques sont encore incomplètement compris, altèrent significativement la survie des greffons. Le rejet est défini comme une lésion tissulaire secondaire à une réponse allo-immune et son diagnostic est porté par l'étude anatomopathologique d'un fragment biopsique du ventricule droit. Malgré les thérapeutiques immunosuppressives actuellement disponibles, le rejet constitue un événement particulièrement délétère dans le pronostic de la greffe. Il existe deux types de rejet d'allogreffe, suivant les mécanismes impliqués, l'histologie observable et l'immunohistochimie: le rejet médié par les lymphocytes T (ACR) et le rejet humoral, médié par les anticorps (AMR).

### **A. Immunologie du rejet de greffe**

#### **1. Rejet Cellulaire (ACR)**

Le rejet cellulaire est le premier type de rejet identifié et sa caractérisation remonte aux débuts de la pathologie de la transplantation, les signes histologiques étant relativement aisés à détecter.

Il repose sur un mécanisme d'attaque du greffon par les cellules lymphocytaires du receveur. La réponse immune lymphocytaire T allospécifique est déclenchée par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) portant les antigènes du donneur au sein du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les incompatibilités de CMH sont à l'origine de la réponse immune et déclenchent l'activation des clones lymphocytaires T, souvent accompagnée d'une réponse humorale.

Dans le greffon, les CPAs sont activées et vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS), où elles entrent en contact avec des lymphocytes T naïfs et des lymphocytes T mémoires. L'activation d'un lymphocyte T par un antigène à la surface d'une CPA via le récepteur T (TCR) constitue le premier signal, transmis via le complexe CD3. Les cellules dendritiques entraînent également un second signal

de co-stimulation, émis lorsque les CD80 et CD86 des cellules dendritiques entrent en contact avec les récepteurs CD28 des lymphocytes T [12, 13]. Ces deux signaux activent trois voies de transduction de signal : la voie de la calcineurine, la voie des RAS-MAP kinases et la voie du facteur NFκB. Ces voies vont ensuite activer des facteurs de transcription codant pour des molécules telles que l'interleukine 2, le CD25 et d'autres cytokines. L'IL2 peut, à son tour, activer la voie mTOR, qui constitue le troisième signal de la réponse immune, à l'origine de la prolifération cellulaire [14-16].

Parallèlement à l'activation des lymphocytes T naifs, les cellules mémoires sont également réactivées par les allo-antigènes, le plus souvent au niveau d'autres types de tissu, comme l'endothélium (dont les cellules peuvent être présentatrices d'antigène) du greffon, produisant ainsi une grande quantité de lymphocytes T effecteurs [14].

En plus de l'activation T, certains lymphocytes B peuvent être activés lorsque l'antigène entre en contact avec leurs récepteurs antigéniques, habituellement dans les follicules lymphoïdes et dans le greffon. Cette activation provoque la production d'allo-anticorps dirigés contre les antigènes HLA du donneur.

Tous ces lymphocytes effecteurs vont infiltrer le greffon et engendrer une réponse inflammatoire, caractérisée par une infiltration mononucléée interstitielle, la production d'INFγ favorisant l'infiltration des cellules hôtes, une surexpression de chemokines et une perméabilité capillaire accrue [13, 17].

Le recrutement dans l'allogreffe des leucocytes du receveur provenant de la circulation sanguine est initié par l'expression endothéliale des molécules d'adhésion et la libération de chémokines par les cellules myocardiques, les cellules interstitielles, et les cellules du receveur infiltrant l'allogreffe. L'endothélium de la microcirculation constitue un point d'entrée dans l'allogreffe des leucocytes du receveur et ses cellules sont activées par des cytokines pro-inflammatoires. Elles expriment par la suite des molécules d'adhésion et les chémokines nécessaires pour la migration trans-endothéliale. L'expression de récepteurs de chémokines par les leucocytes permet leur recrutement dans les sites d'inflammation et leur migration à travers l'endothélium, selon un gradient de concentration de chémokines [18, 19].

La liaison des chémokines à leurs récepteurs active les intégrines qui sont normalement présentes à l'état inactif sur les leucocytes en circulation. Les

intégrines les plus couramment exprimées à la surface des lymphocytes sont la IFA-1 (qui se lie à l'ICAM-1 et -2) et la VLA-4 (qui se lie à la VCAM-1). Cependant, le traitement ou la prévention du rejet en bloquant l'adhésion n'a pas donné de bons résultats, probablement à cause de la redondance des molécules d'adhésion et de leurs ligands.

Le phénotype des cellules infiltrantes n'est pas pris en compte dans l'évaluation histologique de l'ACR. Toutefois, les caractéristiques de l'environnement inflammatoire constituent un cadre important pour comprendre les mécanismes générateurs de la lésion tissulaire. L'infiltrat interstitiel pendant un ACR est dominé par les lymphocytes T avec des phénotypes effecteurs ou effecteurs à mémoire, les lymphocytes T CD8+ étant surreprésentés par rapport aux lymphocytes CD4+. Les lymphocytes naïfs jouent un rôle négligeable puisqu'ils ne peuvent pas entrer dans les sites d'inflammation. Les lymphocytes T alloréactifs semblent être un composant mineur comparativement aux lymphocytes T effecteurs à mémoire recrutés par les processus inflammatoires. Les cellules myéloïdes (MDC) sont prédominantes au cours de l'ACR. Le rôle pathogène de ces cellules est encore incompris et le degré selon lequel elles influencent le processus d'ACR reste mal défini. L'émergence d'un petit nombre de transcrits associés aux MDC (IL-6, CHI313 et arg1) implique la possibilité que les lymphocytes T correspondants entrent en contact et activent les MDC à ce niveau [20].

Les lymphocytes B et les plasmocytes sont habituellement présents dans le rejet cellulaire et à des phases ultérieures du rejet d'allogreffe mais leur rôle est mal défini. Les cellules NK sont rarement détectées dans le rejet cellulaire humain et leur rôle reste à établir. Les lymphocytes T effecteurs CD4+ et CD8+ se dirigent vers les compartiments inflammatoires en utilisant des récepteurs tels que le CXCR6 mais les cellules NK utilisent des stratégies de guidage chémokines différentes, comme le récepteur de fractalkine CX3CR1 [20].

L'absence de certains types de cellules inflammatoires, comme les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, souligne la sélectivité du recrutement vers le greffon et fournit des informations importantes sur l'équilibre délicat caractérisant la réponse immunitaire. L'absence d'infiltration par des éosinophiles et des neutrophiles peut être une conséquence de l'action inhibitrice de l'IFN $\gamma$ , par exemple par antagonisme de CCL9 ou par le biais de chémokines inductibles par l'IFN $\gamma$  comme CXCL9,

CXCL10, et CXCL11. L'IFN $\gamma$  détermine un phénotype d'inflammation en induisant de nombreux transcrits et empêche une inflammation alternative.

## **2. Rejet Humoral (AMR)**

Le rejet humoral est médié par les anticorps et les lymphocytes B et représente un risque majeur d'altération fonctionnelle du greffon à long terme. En effet, si le rejet aigu à médiation cellulaire T présente une relative bonne réponse aux traitements immunosuppresseurs conventionnels, les thérapeutiques actuelles ne permettent pas, en général, de contrôler le rejet humoral de manière satisfaisante.

Les formes symptomatiques du rejet humoral restent de mauvais pronostic mais sont devenues rares chez les transplantés cardiaques. En revanche, le rejet humoral infra-clinique intéresse environ 15% des patients. Bien qu'asymptomatique, il s'agit d'une entité cliniquement importante, représentant un processus continu (possiblement fluctuant) clairement associé à un mauvais pronostic à long terme avec dysfonction tardive du greffon et une progression de la maladie vasculaire du greffon (MVG) [21, 22].

De plus, des formes tronquées de rejet humoral, de diagnostic histologique délicat, ont récemment été individualisées.

### **a) Les anticorps anti-HLA spécifiques du donneur**

Les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH, ou HLA – Human Leukocyte Antigen), présentes à la surface de la majorité de nos cellules (HLA de classe I) ou ayant une expression restreinte à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (HLA de classe II) sont codées par un gène du bras court du chromosome 6, hautement polymorphe, qui donne lieu à plusieurs familles/épitopes. Certains des gènes faisant partie du CMH n'ont pas de fonction de présentation de l'antigène mais codent pour d'autres molécules jouant un rôle dans les défenses immunitaires. Tous ces gènes du CMH sont présents sous une forme poly-allélique à expression codominante [23].

Les gènes du CMH sont répartis en trois classes :

- Les gènes de classe I codent pour les molécules de classe I du CMH. Les plus importants sont les gènes **HLA-A**, **HLA-B** et **HLA-C** qui codent pour les molécules du même nom. Les molécules de classe I du CMH permettent la présentation du peptide antigénique aux lymphocytes T CD8 et la reconnaissance du soi. Ces molécules de classe 1 sont composées de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$ , qui présentent toutes deux des domaines « immunoglobuline-like » et qui sont associées de manière non covalente : la chaîne  $\alpha$  (ou chaîne lourde) est codée par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C. Elle est polymorphique et varie suivant les 6 gènes que l'individu possède. Elles présentent trois domaines,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ . La chaîne  $\beta$  (ou chaîne légère) non-polymorphique, est codée par un autre gène non présent dans le CMH et assure un maintien de la conformation. Cette chaîne est dite  $\beta 2$ -microglobuline.
- Les gènes de classe II codent pour les molécules de classes II du CMH. Les plus importantes sont les gènes **HLA-DP**, **HLA-DQ** et **HLA-DR** qui codent pour les molécules du même nom. Les molécules de classe II du CMH permettent la présentation du peptide antigénique aux lymphocytes T CD4. Ces molécules de classe 2 sont également composées de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$ , qui présentent toutes deux des domaines « immunoglobuline-like », associées de manière non covalente, et qui sont toutes deux codées par le CMH: la chaîne  $\alpha$  présente deux domaines,  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et la chaîne  $\beta$  présente deux domaines,  $\beta 1$  et  $\beta 2$ .
- Les gènes de classe III codent pour des molécules n'intervenant pas dans la présentation de l'antigène.

Les molécules du CMH sont constituées de 4 parties caractéristiques : la région de liaison au peptide antigénique, ou région PBR (pour *Peptide Binding Region*), est formée par les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  pour le CMH de classe I et par les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  pour le CMH de classe II, qui forment une cavité dans laquelle ira se loger le peptide antigénique. La région immunoglobuline-like est formée par les domaines  $\beta 2m/\alpha 3$  pour les CMH de classe I et  $\alpha 2/\beta 2$  pour les CMH de classe II. Cette région fixe respectivement le CD8 (CMHI) et le CD4 (CMHII). Les régions transmembranaire et intracytoplasmique sont uniques (chaîne  $\beta 2m$ ) pour le CMH de classe I et doubles (chaîne  $\alpha$  et chaîne  $\beta$ ) pour le CMH de classe II.

Aux débuts de la transplantation, en particulier rénale, la compatibilité HLA a été présentée comme un outil nécessaire, voire indispensable, pour garantir une survie optimale du greffon. Bien que les meilleurs résultats soient obtenus avec des donneurs HLA-compatibles, la différence de survie entre les greffons compatibles et non-compatibles a diminué grâce à l'introduction de médicaments immunosuppresseurs plus puissants. Cependant, le développement *de novo* d'anticorps spécifiques du donneur (DSA) est aujourd'hui accepté comme une des causes, et facteur aggravant, des rejets aigus (les formes hyperaiguës ayant disparu depuis la pratique systématique du cross match) et des rejets chroniques, entraînant l'évolution défavorable du greffon à long terme [1, 24, 25].

L'immunogénicité d'un allo-antigène HLA dépend de sa composition en acides aminés et de sa structure. Cependant, le rôle des antigènes HLA du receveur et leurs niveaux de dissemblance par rapport à l'allo-antigène du donneur sont susceptibles de contribuer à cette immunogénicité. Tous les antigènes HLA sont composés de chaînes de plusieurs sites polymorphes (épitopes), qui peuvent servir de cibles, à la liaison de l'anticorps. La nomenclature actuelle du système HLA ne tient pas compte de la nature ou de l'identité de ces épitopes bien qu'une database (HLAMatchmaker) soit disponible afin de les comparer et fournir ainsi une estimation du degré de concordance de l'épitope entre les donneurs et les receveurs.

Wiebe et al. [24] ont récemment prouvé que certains épitopes pouvaient être plus immunogènes que les autres, démontrant ainsi que le nombre d'épitopes, mais également les caractéristiques physico-chimiques des acides aminés impliqués, contribuent à l'immunogénicité d'un mismatch HLA.

Les DSA sont recherchés chez le receveur par cross match, une technique de cytotoxicité dépendante du complément après incubation du sérum du receveur avec les lymphocytes T et/ou B du donneur. Le cross match utilisant la technique de cytométrie en flux a augmenté la sensibilité de la détection de ces anticorps. Au cours des dernières années, la détection des anticorps anti-HLA a encore été améliorée par l'introduction de la technologie Luminex® reposant sur l'analyse par cytométrie en flux de microsphères sur lesquelles sont fixées des molécules HLA recombinantes. Cette méthode a augmenté la sensibilité de la détection des anticorps anti-HLA tout en permettant d'en déterminer précisément les spécificités. Ces progrès techniques ont permis d'objectiver la responsabilité des anticorps anti-

HLA dans la mauvaise évolution du greffon chez un nombre croissant de patients [26].

Les anticorps anti-HLA sont produits à la suite d'un événement immunisant (grossesse, transfusion sanguine ou transplantation antérieure). Ils peuvent également apparaître *de novo* au cours de la transplantation (incompatibilité HLA donneur-receveur). La période à laquelle les anticorps anti-HLA produits *de novo* peuvent être détectés varie d'un patient à l'autre : les anticorps peuvent apparaître à n'importe quel moment, le risque de production de DSA augmentant avec le temps. En transplantation, seules les immunoglobulines G (IgG) sont considérées comme étant pathogènes. Ainsi, les cross match positifs dus à la présence d'IgM ne contre-indiquent généralement pas la greffe. Il semblerait cependant que les DSA de type IgM puissent avoir un effet néfaste.

L'action des anticorps anti-HLA au cours du rejet est en grande partie liée à leur capacité à fixer le complément et à l'activer par la voie classique [27]. La mise en jeu du complément par la fixation des anticorps anti-HLA est à l'origine d'une atteinte des cellules endothéliales, liée notamment à un phénomène de lyse cellulaire secondaire à la formation du complexe d'attaque membranaire.

Les effets pro-inflammatoires du complément sont également en cause : activation chimiotactique des macrophages et des polynucléaires neutrophiles via les anaphylatoxines C5a et C3a; vasospasme secondaire à la sécrétion de PGE2 par les macrophages; augmentation de la perméabilité vasculaire dépendante de la sécrétion de l'histamine par les mastocytes; expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales; libération d'enzymes protéolytiques et de radicaux libres; production de cytokines et de chimiokines après fixation à des récepteurs spécifiques. Récemment, des études ont montré que la présence d'anticorps spécifiques du CMH [27] ayant la capacité de fixer le complément suffisait pour induire l'apparition d'un rejet humoral. A l'inverse, la présence d'anticorps ne fixant pas le complément n'entraîne pas de rejet. Ainsi, les receveurs dont les DSA activent *in vitro* la fixation de C4d ont une évolution du greffon défavorable, comparés aux receveurs dont les DSA n'activent pas la fixation du C4d, ces derniers ayant un pronostic à long terme proche de celui des patients DSA-négatifs.

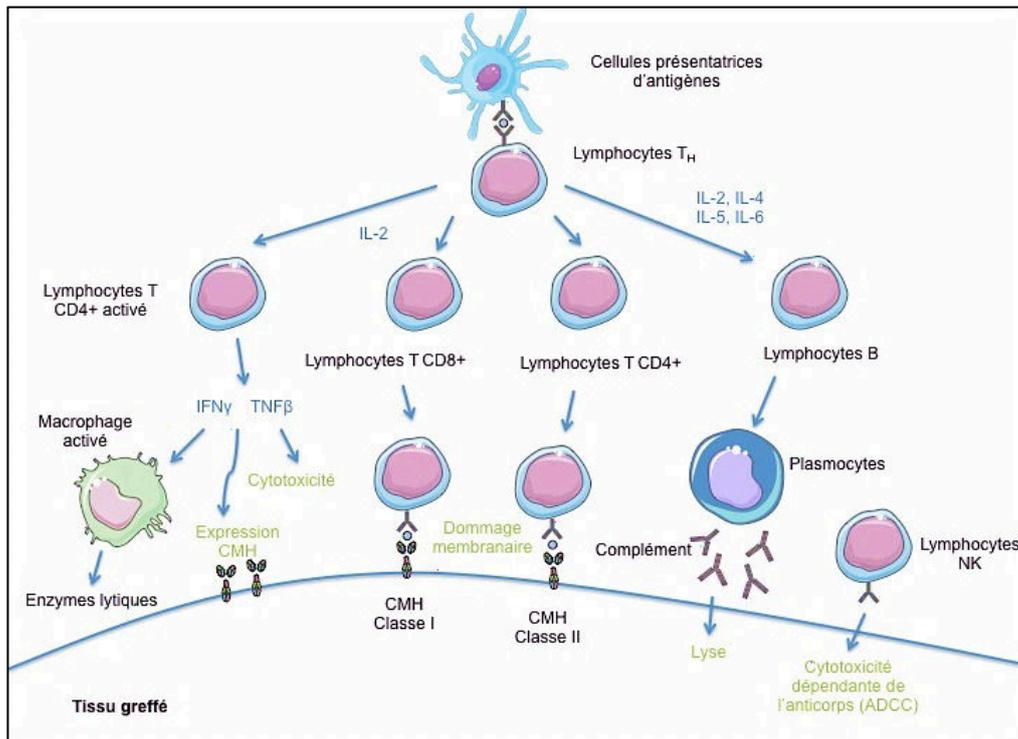


Figure 3. Mécanismes immunitaires mis en jeu contre le tissu greffé et rôle des anticorps anti-CMH dans la reconnaissance des cellules de l'immunité.

La mise en jeu, secondaire à la fixation d'anticorps, de cascades de signalisation intracellulaire aboutissant à une activation des cellules endothéliales est également impliquée dans le processus de rejet humoral et dans l'apparition de lésions d'artériopathie chronique d'allogreffe.

MICA (*major histocompatibility class I-related chain A*) est une glycoprotéine apparentée au système du HLA, cible potentielle de l'allo-immunité. Les anticorps anti-MICA ne sont pas détectés par les techniques traditionnelles de cross match car ils sont exprimés de manière normale sur les cellules endothéliales, les fibroblastes et les monocytes mais pas sur les lymphocytes. Cependant, la responsabilité de MICA dans la survenue des rejets aigus cardiaques, particulièrement les rejets humoraux, a été rapportée [28] [29], [30]. Néanmoins, il ne semble pas exister de corrélation entre la présence d'anticorps anti-MICA et la survenue de rejets humoraux C4d-positifs [28]. Bien que les antigènes anti-HLA soient les principales cibles de la réponse allo-immune impliquée dans les phénomènes de rejet, les DSA semblent n'être présents que dans environ 60% des patients présentant un rejet humoral. Cela suggère que les anticorps dirigés contre des antigènes non HLA

peuvent également contribuer au développement des rejets humoraux.

Les anticorps anti-MICA ont été rapportés chez des patients transplantés rénaux et cardiaques dont les greffes ont, par la suite, évolué vers une dysfonction. Zhang et al. [28] ont par ailleurs, après détermination des génotypes MICA pour les donneurs et les receveurs, démontré une corrélation significative entre le développement de DSA anti-MICA et la survenue du rejet humoral. Dans certains cas, des anticorps spécifiques du donneur anti-MICA étaient développés en l'absence d'anticorps anti-HLA, indiquant que les anticorps anti-MICA pouvaient être à l'origine du rejet. Smith et al. [26] ont également rapporté qu'environ 10% des patients transplantés produisent des anti-MICA spécifiques du donneur en post-transplantation. Ce groupe n'a pas trouvé d'association entre les anticorps anti-MICA et le rejet aigu ou la vasculopathie d'allogreffe (rejet chronique), mais le rejet humoral n'a pas été étudié.

Ainsi, les anticorps anti-HLA contrôlent la survie et la prolifération des cellules endothéliales grâce à la mise en jeu de voies de signalisation en aval de la fixation des anticorps aux complexes majeurs d'histocompatibilité: via la voie de la PI3 kinase/Akt et la voie mTOR via l'activation de mTORC1 et mTORC2.

Par conséquent, les anticorps anti-HLA ou anti-MICA contribuent au processus de rejet d'allogreffe chronique, par la promotion des cellules endothéliales et la prolifération des cellules musculaires lisses.

D'autres antigènes potentiellement cibles d'anticorps anti-HLA existent, en particulier les antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgmH). Ce sont des protéines codées par des gènes du chromosome Y ou par des gènes autosomiques di-alléliques. La plupart des AgmH autosomiques est liée à l'existence de polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) conférant des propriétés immunogènes à la protéine correspondante. Bien que des études existent dans d'autres organes, en particulier le rein et la greffe de moelle osseuse, peu d'études se sont intéressées à la signification des AgmH chez les patients transplantés cardiaques [31, 32].

## **b) Les anticorps non anti-HLA**

D'un point de vue clinique, seuls les anticorps dirigés contre les allo-antigènes des

systèmes ABO et HLA sont pris en compte chez les receveurs d'organes solides. La survenue d'épisodes de rejet aigu C4d-positifs chez des transplantés ayant reçu un greffon à partir d'un donneur apparenté HLA-identique a souligné le possible rôle d'anticorps dirigés contre des antigènes non-HLA mais l'incidence des rejets aigus humoraux attribués à des anticorps non anti-HLA est faible [33, 34]

Si le rôle des anticorps non anti-HLA a été évoqué et leur pouvoir pathogène controversé, leur présence conduirait à l'apparition d'une dysfonction du greffon à long terme. En transplantation rénale, Opelz et al. [35] ont démontré que la présence d'anticorps lymphocytotoxiques non anti-HLA en pré-transplantation, était associée à un pronostic défavorable à long terme.

D'autres antigènes mineurs, tels que les AECA (anti-endothelial cell antibody) ont fait l'objet d'études, les cellules endothéliales étant la cible la plus immédiate du système immunitaire du receveur, en particulier au cours du rejet humoral. Les AECA représentent un groupe hétérogène d'anticorps (IgM, IgG), dirigé contre une variété de déterminants antigéniques exprimés à la membrane des cellules endothéliales [36, 37].

Zhang et al. [38] ont étudié certains de ces anticorps chez des patients présentant un rejet humoral et cinq d'entre eux se sont révélés interactifs avec les cellules endothéliales, suggérant que les antigènes dirigés contre l'endothélium peuvent également provoquer des réponses immunitaires humorales. Les anticorps non HLA dirigés contre la vimentine [39, 40] ou le récepteur II de l'angiotensine [41] ont également un effet délétère sur les transplants.

Le rôle important des cellules endothéliales dans la mise en place d'un phénotype pathologique de rejet indique également que les anticorps anti-endothéliaux pourraient avoir un rôle indirect dans l'apparition du rejet humoral.

### **c) Physiopathologie du rejet humoral**

Lors de la fixation des DSA sur l'endothélium, plusieurs voies vont être activées, entre autres la voie classique du complément aboutissant à la formation du

complexe d'attaque membranaire, responsable de la lyse des cellules endothéliales. Les immunoglobulines ainsi que la plupart des facteurs de la cascade d'activation du complément, dont la demi-vie est courte, sont rapidement éliminés et donc indétectables par les techniques immunohistochimiques conventionnelles.

Le C4d est un produit inactif, issu de la dégradation catalytique du C4 activé par la voie classique du complément. Lorsque les DSA se fixent sur les complexes majeurs d'histocompatibilité des cellules endothéliales du greffon cardiaque, ils entraînent un recrutement du complexe C1q. Ce complexe va permettre le clivage et l'activation de C4 et C2. La fraction C4b obtenue va se fixer à la surface cellulaire et s'associer à la fraction C2a pour former le complexe de la C3 convertase qui va cliver C3 et C5, amplifiant ainsi l'activation du complément. Afin de réguler cette amplification du signal, la fraction C4b peut être clivée par la MCP (*membrane cofactor protein*), donnant ainsi la fraction détectable en immunohistochimie C4d, ne présentant pas d'activité catalytique. Cette fraction C4d peut ensuite aller se fixer sur les récepteurs des cellules lymphocytaires B et des cellules dendritiques, régulant ainsi la réponse immunitaire humorale [42].

Alors que les autres produits de dégradation sont solubles, le C4d a la particularité de se fixer de façon covalente à la surface des cellules endothéliales. Il disparaît ensuite soit en quelques jours, soit après plusieurs mois. Le C4d serait donc un marqueur relativement stable et durable de l'activation du complément par la voie classique. Plusieurs études et revues indiquent que sa présence au sein de la microcirculation (capillaires péri-tubulaires dans le rein, capillaires intramyocardiques dans le cœur) est corrélée à l'existence d'anticorps spécifiques du donneur (DSA) dans le sérum des patients dans près de 95% des cas. Il est détectable par immunohistochimie et marque comme une «empreinte tissulaire» l'existence d'une fixation d'anticorps au niveau des cellules endothéliales du greffon. Il réalise un marquage linéaire sur les capillaires intramyocardiques, révélé soit par immunofluorescence sur coupe congelée, soit par une méthode d'immunoperoxydase sur coupe en paraffine.

La fixation du C4d sur les capillaires intramyocardiques n'est jamais observée dans le cœur normal, ni en pathologie du cœur natif. Un marquage circonférentiel, linéaire, diffus, de plus de 50 % des capillaires est requis pour le diagnostic de rejet

humoral. La signification d'un marquage focal reste controversée. L'ISHLT recommande de rechercher la présence de dépôts de C4d systématiquement sur les biopsies à 15 jours, 1, 3, 6 et 12 mois. Le C4d est actuellement considéré comme un marqueur tissulaire spécifique de rejet humoral.

Si les faux positifs de la technique sont exceptionnels, la sensibilité et la prévalence de l'analyse du C4d sont reconnues comme médiocres. Ainsi, il apparaît clairement que de véritables rejets humoraux, histologiquement avérés mais sans détection de C4d, peuvent être mis en évidence chez les patients ayant des DSA. De même, la présence de C4d peut varier sur des biopsies itératives réalisées chez un même patient, sans doute en fonction du taux d'anticorps circulants.

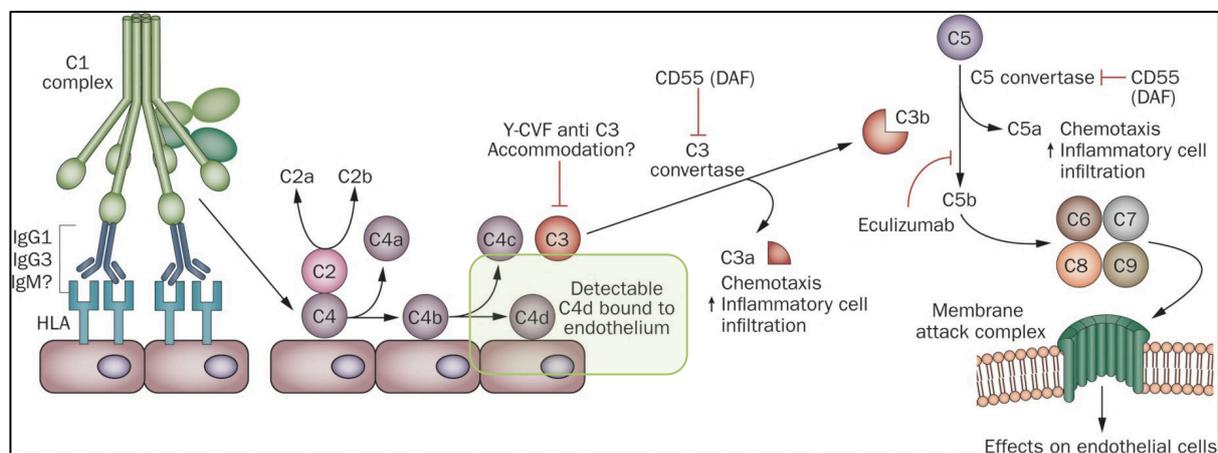


Figure 4. Voie du complément et effets sur l'endothélium. (Stegall, M. D. et al. (2012) *Nat. Rev. Nephrol.*) [42].

D'autres voies, indépendantes du complément peuvent également être responsables de l'évolution de la vasculopathie d'allogreffe et peuvent aggraver les phénomènes de rejet. Hirohashi et al. [43] ont mis en évidence le mécanisme par lequel la fixation des DSA sur les cellules endothéliales entraîne des changements responsables de l'évolution vers la maladie vasculaire du greffon par l'intervention des cellules NK, dans un modèle murin d'allogreffe. Ils prouvent ainsi que les anticorps provoquent la vasculopathie d'allogreffe via les cellules NK, d'une manière dépendante des Fc présents à la surface des cellules endothéliales. Cette nouvelle voie s'ajoute aux mécanismes mieux connus régissant le rejet chronique et permet la compréhension des formes tronquées de rejet, C4d négatives chez l'Homme.

D'autres études se sont intéressées aux voies alternatives au complément [1]: les DSA peuvent se lier aux cellules endothéliales et stimuler leur prolifération ou induire une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) via une libération d'IFN $\gamma$  [43, 44]. Ces procédés, importants lors du développement de lésions chroniques, semblent plus dépendants des cellules NK ou d'autres types cellulaires (par exemple, l'ADCC) que du complément [45].

Les modifications des fonctions endothéliales au cours du rejet humoral, secondaires à la fixation des anticorps anti-HLA sur les cellules endothéliales sont de mieux en mieux connues. On sait désormais, que les anticorps anti-HLA peuvent induire la sécrétion par la cellule endothéliale de facteurs de croissance (FGFR par exemple), de cytokines et de molécules d'adhésion, participant à l'établissement d'un phénotype endothélial pro-inflammatoire avec recrutement leucocytaire, prolifératif et pro-angiogénique. L'implication de certaines voies de signalisation, comme la voie MAPK/ERK ou Rho/mTOR (phosphorylation des effecteurs transcriptionnels p70S6K et S6RP) a également été démontrée en pathologie humaine, dans le rejet humoral [46] mais aussi dans les lésions coronaires de la maladie vasculaire du greffon (MVG) [47].

## **B. Diagnostic du rejet en transplantation cardiaque**

### **1. Expression clinique et traitement**

Le rejet aigu est une complication majeure après la transplantation cardiaque, en particulier dans la première année. La plupart des cas sont dus à un rejet cellulaire mais certains cas peuvent être médiés par les anticorps. Le rapport de l'ISHLT concernant les patients greffés suivis entre 2004 et 2009 révèle que 21 à 30 % d'entre eux ont été traités pour un rejet aigu au cours de la première année de transplantation. Ce chiffre est largement sous-estimé car il ne prend pas en compte les épisodes de rejet légers (grade 1R) ou le rejet humoral. D'après ce même rapport, parmi les décès survenus entre janvier 1992 et juin 2008, le rejet aigu représentait 6% des décès dans les 30 premiers jours, 12% entre 31 jours et un an,

10% de 1 à 3 ans, puis moins de 2% à plus de cinq ans de greffe. Malgré les améliorations de l'immunosuppression, le rejet aigu reste donc un important problème clinique.

Son expression clinique se définit par une dysfonction cardiaque, accompagnée d'une diminution de la fraction d'éjection (FEVG). Cependant, le rejet aigu est le plus souvent asymptomatique, d'où l'intérêt d'un suivi incluant échocardiographies et biopsies de dépistage.

La prévention du rejet repose sur l'appariement donneur/receveur et sur le choix du traitement immunosuppresseur, principalement en fonction du risque immunologique du receveur. La conception du traitement immunosuppresseur s'appuie sur l'association d'un traitement dit « d'induction », censé diminuer l'incidence du rejet aigu dans les 3 mois qui suivent la transplantation, et d'un traitement dit « de maintenance », destiné à limiter ou prévenir le développement du rejet après cette période initiale. Le traitement curatif des rejets quant à lui, repose d'abord sur la définition la plus précise possible du type de rejet et donc de son mécanisme physiopathologique.

Le traitement de crises de rejet aigu est longtemps resté monolithique avec un recours unique aux stéroïdes. Les rejets aigus cellulaires sont maintenant traités par de fortes doses de stéroïdes administrées par voie intraveineuse (bolus de méthylprednisolone), relayées par de fortes doses orales pendant une période de quelques jours à quelques semaines. Les formes cortico-résistantes bénéficient d'une seconde ligne de traitement soit par les anticorps anti-lymphocytes polyclonaux, soit par les anticorps monoclonaux anti-CD3.

En cas de rejet aigu humoral avec une positivité du marqueur C4d sur les capillaires et la présence d'anticorps circulants dirigés contre le donneur, le traitement associe des stéroïdes à fortes doses et des échanges plasmatiques destinés à épurer ces anticorps délétères, des immunoglobulines polyvalentes (IVIg) des inhibiteurs de la calcineurine (CNI) et/ou du rituximab (un anticorps monoclonal anti-CD20). L'efficacité des globulines anti-thymocytes (ATG) dans le traitement du rejet humoral n'est pas claire en transplantation cardiaque, même si elles ont été utilisées en transplantation rénale [48]. Des agents anti-prolifératifs tels que le mycophénolate

mofétil (MMF) et le sirolimus/évérolimus, sont actuellement les piliers de la thérapie immunosuppressive en transplantation cardiaque [49]. En dépit d'une efficacité démontrée sur les lésions de rejet aigu humoral, il n'existe pas encore de consensus quant au rôle respectif des différents traitements suscités. La réalité est encore plus complexe dans la mesure où les caractéristiques cliniques des rejets ne sont pas toujours aussi caricaturales et que des formes cellulaires et humorales peuvent être associées (rejet mixte).

Dans les cas de résistance aux traitements classiques et dégradation de l'état du greffon puis du patient, le dernier traitement possible est la retransplantation avec un risque de récurrence accrue sur le deuxième greffon.

## 2. Diagnostic histologique et classification du rejet aigu

Le diagnostic des différents types de rejet en transplantation cardiaque repose sur une association de critères permettant de distinguer le rejet cellulaire (ACR), dont l'histologie est basée sur la présence d'infiltrats inflammatoires périvasculaires et/ou interstitiels, du rejet humoral (AMR), dont le diagnostic est plus complexe.

Le diagnostic du **rejet cellulaire** repose sur la présence de cellules inflammatoires périvasculaires (majoritairement des lymphocytes T) pouvant diffuser en interstitiel (entre les cardiomyocytes), accompagnée, ou non, de lésions myocytaires. L'endothélium des petits vaisseaux est le plus souvent indemne de lésions.

Rejet aigu cellulaire : correspondance entre les différents systèmes de gradation					
classification de l'ISHLT 2004 (1)		classification de l'ISHLT 1990 (2)		classification historique de Billingham 1982 (3)	
0R	pas de rejet	0	pas de rejet	pas d'évidence de rejet	pas d'infiltrat
1R	rejet léger, infiltrat perivasculaire ± interstitiel, ± au maximum un foyer unique de lésion myocytaire	1A	infiltrat focal, perivasculaire, ± interstitiel, sans lésion myocytaire	rejet aigu léger	infiltrat cellulaire perivasculaire
		1B	infiltrat diffus, perivasculaire, ± interstitiel, sans lésion myocytaire	rejet aigu léger ou modéré (selon les centres)	
2R	rejet modéré, 2 ou plus foyers avec lésion myocytaire	2	Un foyer d'infiltrat unique avec lésion myocytaire		
		3A	plusieurs foyers d'infiltrat avec lésion myocytaire	rejet aigu modéré	infiltrat diffusant entre les myocytes
3R	rejet sévère, infiltrat diffus avec plusieurs foyers de lésions myocytaires, ± œdème, ± suffusions hémorragiques, ± vasculite	3B	infiltrats diffus avec lésion myocytaires		
		4	infiltrat diffus polymorphe avec lésions myocytaires étendues, ± œdème, ± suffusions hémorragiques, ± vasculite	rejet aigu sévère	nécrose myocytaire, infiltrat hémorragique ± polynucléaires

Abréviations : ISHLT : International Society for Heart and Lung Transplantation

Tableau 1. Classification du rejet cellulaire selon l'ISHLT.

(1) Stewart S et al., J Heart Lung Transplant 2005; 24: 1710-20 (2) Billingham ME et al, J Heart Transplant 1990; 9: 587-593 (3) Billingham ME, Heart Transplant 1982; 1: 25-30

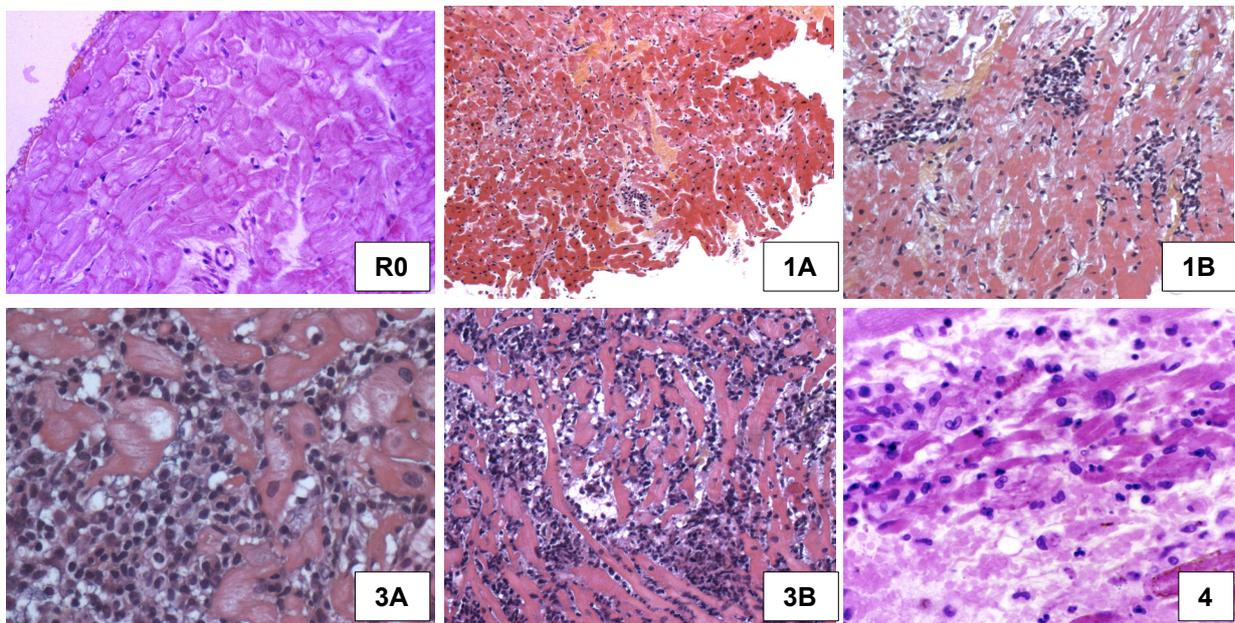


Figure 5. Aspect histologique des rejets cellulaires : de R0 (absence de rejet) à 4 (rejet cellulaire sévère), selon la classification de l'ISHLT 1990.

L'immunohistochimie permet essentiellement le phénotypage des cellules présentes dans le greffon. Cependant, le phénotype des cellules infiltrantes n'est pas pris en compte dans l'évaluation histologique du rejet cellulaire. Typiquement, le marquage CD3, CD4 ou CD8 permet l'identification des lymphocytes T, le CD45 des cellules lymphocytaires T mémoires ou le CD68 des macrophages. Cependant, la pratique immunohistochimique n'est pas courante pour ce type de rejet et n'apporte pas d'aide objective au diagnostic.

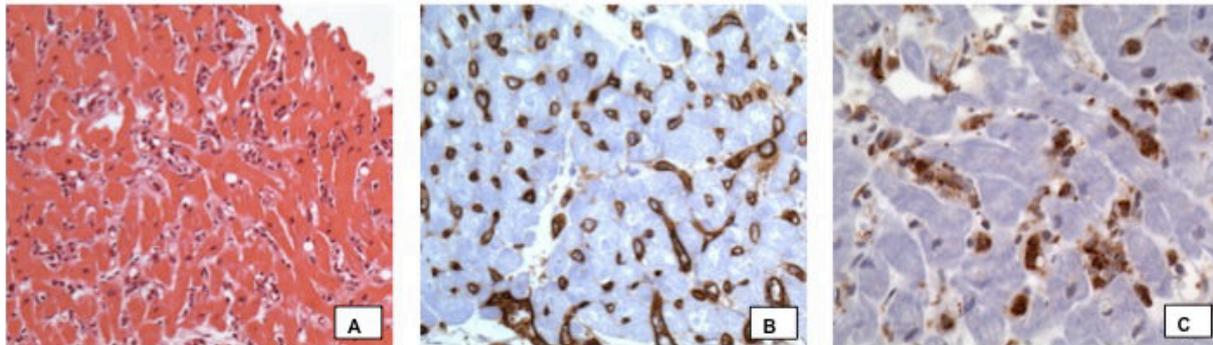
Le diagnostic du **rejet humoral** repose actuellement sur l'association de 2 critères: des lésions histologiques caractéristiques (inflammation microvasculaire) et la fixation du C4d au niveau des capillaires intramyocardiques ou de la présence de macrophages CD68 positifs dans la microcirculation. De manière étonnante et malgré de nombreuses études démontrant leurs effets délétères [1, 27, 50, 51], la présence d'anticorps circulants spécifiques d'antigènes du donneur (DSA) n'est pas prise en compte dans la classification purement histopathologique du rejet humoral de l'ISHLT (classification pAMR).

En histologie, on observe une activation endothéliale de la microcirculation, avec une turgescence de l'endothélium, des cellules inflammatoires dans la lumière des capillaires et un possible œdème interstitiel. En immunohistochimie, on prend en compte le marquage C4d (effecteur de la voie du complément), dont la présence doit être supérieure à 50% des capillaires, et/ou le CD68 (marquage des macrophages intracapillaires), pour lequel plus de 10% des capillaires doivent être marqués.

On distingue ainsi quatre grades

- pAMR0, absence de rejet, histologie et immunohistochimie négatives.
- pAMR1, suspicion de rejet, divisé en deux entités : pAMR1(H+), qui ne présente que les signes histologiques de rejet (inflammation microvasculaire) et pAMR1(I+), ne présentant que les critères immunohistochimiques (C4d+ et/ou CD68+).
- pAMR2, rejet avéré, présentant à la fois les signes histologiques et immunohistochimiques de rejet.

○ pAMR3, rejet grave, signes histologiques et immunohistochimiques accompagnés d'hémorragies interstitielles, d'oedèmes, de microthromboses et de lésions myocytaires. Ce grade de rejet est fréquemment associé à une dysfonction cardiaque.



*Figure 6. Image d'histologie et d'immunohistochimie permettant le diagnostic du rejet humoral : histologie positive (A), avec infiltration macrophagique intravasculaire, C4d positif (B), avec un marquage endothélial, CD68 positif (C), avec un marquage granuleux des vésicules intra-macrophagiques.*

L'absence de marquage C4d n'est pas rare et peut avoir plusieurs causes, du fait de l'expression spatio-temporelle de cet effecteur et de la variabilité inter-centres. Le C4d peut être révélé en immunohistochimie grâce à une technique en trois couches avec peroxydase ou en immunofluorescence indirecte. L'interprétation des lames lors de leur lecture est sujette à controverse, malgré les efforts de l'ISHLT pour mettre en place une classification fiable et reste à l'appréciation de l'observateur.

L'incidence du rejet mixte est mal connue mais cette entité reste peu étudiée.

(Fredigo et al. ISHLT congress, Volume 33, Issue 4, Supplement, Pages A1-A4, S1-S340, JHLT 2014)

### **III. Le vaisseau : une cible majeure du rejet**

#### **A. La cellule endothéliale**

Les cellules endothéliales sont des cellules allongées, mononucléées, adhérentes à la matrice extra-cellulaire sous-jacente, aux rôles multiples : associées en monocouche pour former l'endothélium, elles constituent une barrière qui contribue à réguler le flux sanguin qu'elles régulent, inhibe (ou favorise) le recrutement leucocytaire, régule les échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment extra-cellulaire.

Le rôle majeur de la cellule endothéliale est le maintien de la fluidité du sang grâce à l'inhibition de la coagulation par blocage de la voie de la thrombine et relargage de NO et de prostacycline, bloquant l'activation plaquettaire. Parallèlement, la cellule endothéliale va aussi synthétiser un activateur du plasminogène, empêchant la formation de caillots de fibrine. Toutes ces actions cumulées empêchent l'apparition de thromboses.

La cellule endothéliale permet également le contrôle des échanges de macromolécules entre le sang et les tissus. Ce second rôle est rendu possible grâce à trois différents mécanismes :

- passage trans-cellulaire : les cellules infiltrantes passent entre les cellules endothéliales adjacentes (diapédèse) grâce à un remodelage du cytosquelette au niveau des jonctions intercellulaires. Au sein des jonctions adhérentes et serrées, des interconnexions sont formées grâce à des cadhérines et des occludines, protéines liées à l'actine et à la tubuline du cytosquelette respectivement. Ces connexions permettent un remodelage du cytosquelette qui contrôle le passage des cellules et macromolécules dans le tissu adjacent à la cellule endothéliale,
- passage intra-vésiculaire : les molécules sont transportées dans des invaginations de la membrane de la cellule endothéliale vers le pôle opposé pour passer dans le tissu,

- passage via des fenestrae : dans des tissus spécifiques (rein, foie, moelle osseuse).

Enfin, l'endothélium contrôle le flux sanguin, grâce à des phénomènes vasodilatation/vasoconstriction qui permettent l'obtention d'un flux constant. Ces phénomènes sont à la fois dus à un couplage électrique des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses au niveau des artères et artérioles, mais aussi à la synthèse de vasodilatateurs intrinsèques, tels que NO ou des métabolites de l'acide arachidonique, au niveau de la macro et de la microcirculation. L'endothélium possède une NO synthase spécifique (eNOS ou NOS-3) qui convertit l'arginine en citrulline et libère du NO.

Des rôles dans la veille immunologique et la diminution de la réponse inflammatoire via une régulation de eNOS sont également établis, bien que moins caractérisés.

## **B. L'activation endothéliale au cours du rejet**

L'endothélium peut être activé lors de la greffe par deux mécanismes généraux et parallèles.

L'activation de type I fait intervenir un mécanisme indépendant de la synthèse protéique, en réponse à la fixation de ligands (thrombine, histamine) sur des récepteurs à protéines G (GPCR) de la cellule endothéliale : la cellule va exprimer COX2 et augmenter, de ce fait, la production de prostacycline. Cette activation permet d'augmenter à la fois l'amplitude et la durée de la vasodilatation locale. L'activation de type II est basée sur la fixation de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ , à la surface de la cellule et enclenche une réponse dépendante de la synthèse protéique. Cette activation va altérer les rôles de la cellule endothéliale. Elle deviendra plus perméable, compromettant l'intégrité de la barrière vasculaire. Elle sera également incapable de diminuer la réponse inflammatoire, augmentant même le recrutement des cellules immunitaires. L'endothélium va exprimer les molécules d'adhésion (ICAM, VCAM...) et les chemokines nécessaires à la migration trans-endothéliale des cellules circulantes. Ainsi, les cellules immunitaires, activées après leur maturation dans le système lymphatique et

présentant des récepteurs aux chemokines, vont être recrutées au niveau des zones d'inflammation. Les intégrines de leur surface vont interagir avec les molécules d'adhésion endothéliales et permettre le passage des cellules lymphocytaires dans le tissu adjacent [52].

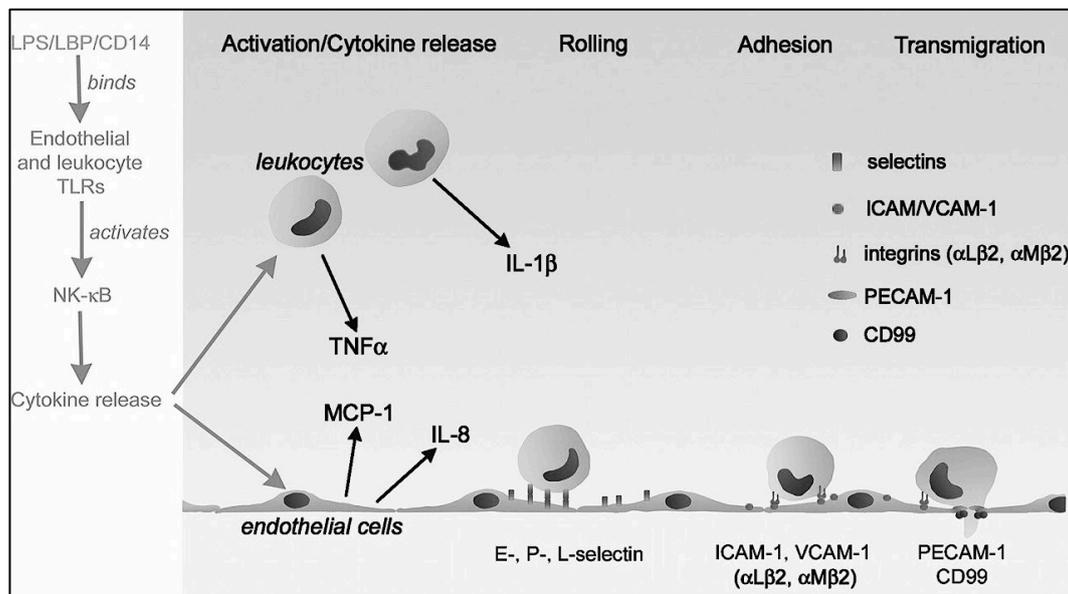


Figure 7. Mécanisme d'activation endothéliale par les cytokines pro-inflammatoires (d'après de Peters et al. Cardiovascular Research, 2003). Les cytokines synthétisées par les leucocytes activent la cellule endothéliale qui va exprimer des molécules d'adhésion et recruter d'autres lymphocytes au sein du tissu avoisinant.

Lorsqu'elles sont endommagées, les cellules endothéliales peuvent engendrer des thromboses locales, par exposition de leur surface collagénique activant les plaquettes circulantes. Elles peuvent également aller jusqu'à l'apoptose, car elles sont l'une des cibles principales de la réponse immunitaire du receveur suite à la transplantation.

L'apoptose des cellules endothéliales (pouvant être déclenchée, entre autres, après activation de la voie classique du complément) semble jouer un rôle-clé dans la physiopathologie des lésions chroniques d'allogreffe. Trois mécanismes principaux déclenchés par l'apoptose participent à ce processus : l'induction d'un phénotype endothélial pro-thrombosant, la production de TGFβ par les macrophages après phagocytose des cellules apoptotiques et la stimulation de la protéolyse et de médiateurs pro-fibrosants. Une réponse réparatrice excessive stimulée par

l'apoptose pourrait ainsi participer au processus fibroprolifératif au sein de l'intima. L'apoptose des cellules endothéliales favorise notamment la prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire via la phosphorylation de ERK 1/2 et l'expression de la molécule anti-apoptotique BCL2.

### C. L'activation de la voie mTOR

L'activation des cellules endothéliales par les anticorps anti-HLA I lors de la greffe met en jeu des signaux de transduction tel que la voie mTOR (mammalian target of rapamycin).

mTOR est un macrolide découvert dans les années 1970 présentant des propriétés anti-prolifératives. La voie de signalisation mTOR contrôle de multiples processus et joue un rôle important dans les phénomènes de croissance et de prolifération cellulaire.

mTOR est une protéine serine/threonine kinase, liée à la PI3K. Elle va s'associer à différentes protéines pour former deux complexes distincts, mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 est composé de six autres protéines dont certaines sont communes aux deux complexes et d'autres spécifiques, telles que RAPTOR et PRAS40. Le complexe mTORC1 est sensible à de nombreux stimuli tels que l'oxygène, le stress, les facteurs de croissance, la rapamycine et la fixation de DSA [53].

Le complexe mTORC1 contrôle **la synthèse protéique** par phosphorylation des régulateurs, tels que 4E-BP1 et S6Kinase, qui vont ensuite initier la traduction. 4E-BP1 phosphorylée ne pouvant pas se fixer à eIF4E permet la formation du complexe eIF4F qui est nécessaire à l'initiation de la traduction dépendante de la formation de la coiffe. S6K permet une augmentation de synthèse des ARNm, des ribosomes ainsi que l'initiation de la traduction et l'élongation via de multiples intermédiaires. Le complexe mTORC1 augmente la synthèse protéique en activant la protéine TIF-1A qui, par sa fixation sur l'ARN polymérase I, va augmenter la production d'ARN

ribosomal. Il inhibe également Maf1, un répresseur de l'ARN polymérase III qui induit l'ARN ribosomal 5S et la transcription des ARN de transfert (ARNt) [16, 53].

Le complexe mTORC1 permet également **la synthèse des lipides** servant à la formation des membranes cellulaires via les facteurs de transcription SREBP1 et 2 qui contrôlent de nombreux gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et du cholestérol.

Enfin, mTORC1 contrôle **la croissance cellulaire** en inhibant l'autophagie et la synthèse des lysosomes. mTORC1 inhibe le complexe ULK1/Atg13/FIP200 (*unc-51-like kinase 1/mammalian autophagy-related gene 13/focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*) qui permet l'initiation de l'autophagie, régule la protéine DAP1 (*death-associated protein 1*), un inhibiteur de l'autophagie, et pourrait également contrôler Atg18 (*autophagy-related protein 18*), un régulateur de la formation précoce des autophagosomes [16, 54].

mTORC2 est quant à lui majoritairement impliqué dans **la polarité et la survie cellulaire**. Il a été démontré comme ayant un rôle important dans la cardioprotection et la résistance à l'ischémie. Il est également un activateur de la voie Akt en aval, par la phosphorylation de ses effecteurs [55, 56] .

## **D. Mécanisme de l'atteinte vasculaire**

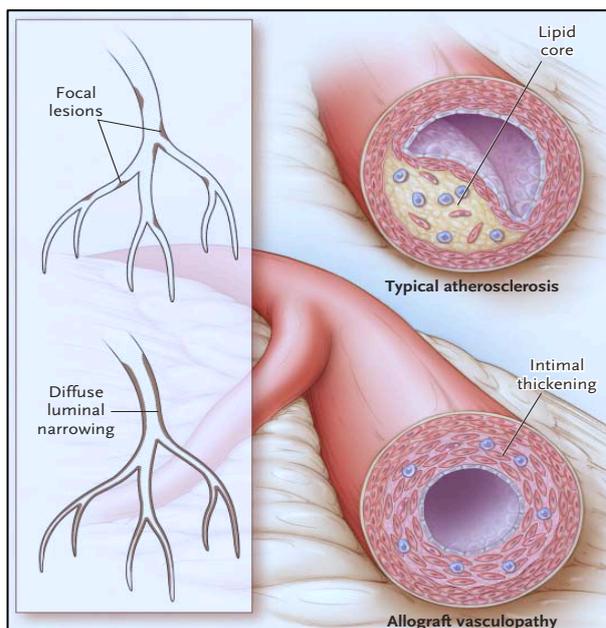
### **1. Lésions vasculaires du rejet chronique**

Les lésions, stéréotypées, sont majoritairement l'artériosclérose et l'athérosclérose et ne sont en rien spécifiques de la transplantation d'organe.

L'artériosclérose est caractérisée par un épaississement de l'intima des artères constitué par une matrice extracellulaire contenant des cellules musculaires lisses vasculaires, ayant migré depuis la média, auxquelles sont associés des macrophages et des lymphocytes T. Cet épaississement intimal est d'épaisseur variable et peut être responsable de sténose artérielle extrêmement sévère et diffuse. Cette atteinte prédomine sur les artères de petit calibre [2].

L'athérosclérose est constituée de plaques fibrolipidiques ayant l'aspect des lésions athéroscléreuses survenant de façon naturelle chez l'homme. Elles sont constituées d'un centre lipidique entouré de tissu fibreux. Ces lésions peuvent être très sténosantes et se compliquer de thrombose. Elles se développent sur des artères de gros et moyen calibre, habituellement plus tardivement que les lésions d'artériosclérose. Bien qu'elle ressemble d'un point de vue analytique aux lésions athéroscléreuses naturelles, l'athérosclérose se développant au cours du rejet chronique présente cependant quelques particularités : une plus grande richesse en lipides, un aspect plus continu et moins focal des lésions, et une atteinte d'artères de calibre plus petit responsable de lésions d'athérosclérose intraparenchymateuses [57, 58].

La vasculopathie d'allogreffe se traduit par un rétrécissement diffus et une occlusion progressive des artères coronaires, à la différence de l'athérosclérose, présentant des lésions focales. Les événements de la première année de greffe semblent être des déterminants importants de la pathogenèse de la vasculopathie d'allogreffe : des événements immunologiques impliquant des lymphocytes T et le système immunitaire humoral, mais également des facteurs non immunologiques, tels que l'âge des donneurs, l'ischémie-reperfusion, l'hyperlipidémie et les infections, semblent jouer un rôle dans ce processus complexe. La lésion endothéliale initiale est suivie par une hyperplasie intimale et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires [57].



*Figure 8. Avery 2003 NEJM. Lésions d'athérosclérose (en haut) et liées à la CAV (en bas).*

*L'épaississement intimal est global dans la maladie vasculaire du greffon.*

Dans des études chez l'animal mais aussi chez l'Homme, il a été déterminé que de multiples médiateurs et de cytokines étaient régulés à la hausse dans les cœurs présentant des lésions de vasculopathie d'allogreffe [59, 60]. Certains d'entre eux reflètent l'activation immunitaire continue; d'autres sont des marqueurs de l'activation endothéliale et de la diminution des mécanismes antithrombotiques. Des études soutient l'idée que les infections virales, les infections à cytomégalovirus particulièrement, peuvent également contribuer à la vasculopathie d'allogreffe.

Des études menées par Kobashigawa et al. [61-63] ont montré que l'épaississement de l'intima était prédictif d'événements cardiovasculaires et de la mortalité des patients. Une étude par Fearon et al. [64] a démontré qu'une différence était observable au niveau de l'intima en comparant deux sections transversales, l'une à la transplantation et l'autre un an après.

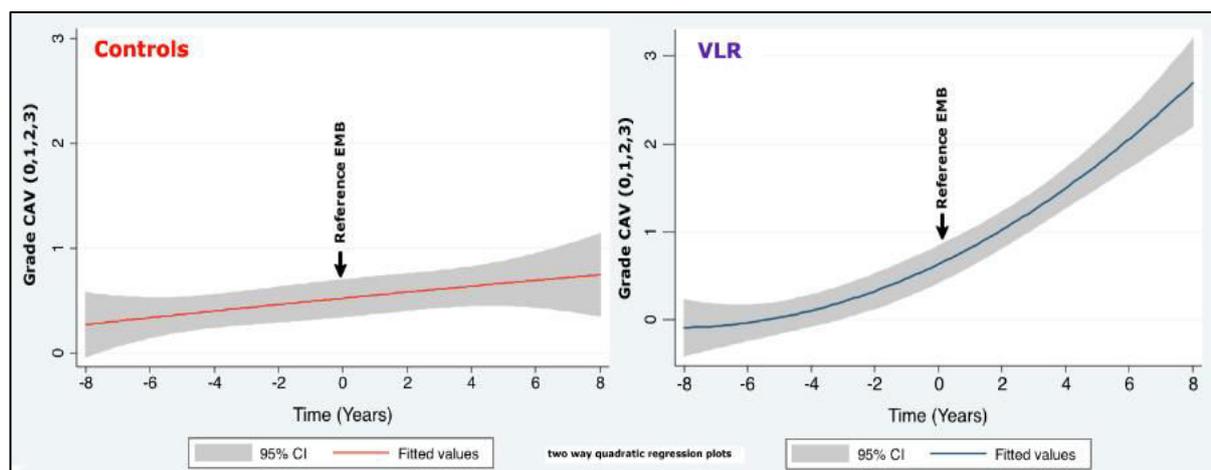


Figure 9. Impact de la vasculopathie d'allogreffe sur la perte de greffon tardive (Loupy et al. Am. J. Transplant. 2011). Les patients rejeteurs tardifs sont généralement ceux présentant les grades les plus élevés de vasculopathie d'allogreffe.

Ainsi des changements structurels significatifs au niveau des coronaires se produisent au cours de la première année et ces changements peuvent être liés à un remodelage des artères ou à un simple épaississement de l'intima. Les patients séronégatifs pour le CMV et/ou ayant reçu un traitement prophylactique anti-CMV

agressif étaient moins sujets au remodelage négatifs et au rétrécissement de la lumière artérielle. La vasculopathie d'allogreffe reste donc un des défis thérapeutiques majeurs, survenant dans près de 50% des greffés cardiaques à 9 ans [65].

Son pronostic est généralement mauvais, avec une progression lente mais inexorable, menant à une perte du greffon tardive.

Les thérapeutiques visant à traiter la vasculopathie d'allogreffe se sont révélés décevantes. L'association de statines et d'inhibiteurs de canaux calciques ont un certain effet protecteur, mais n'éliminent pas le problème.

La prolifération cellulaire semble être au centre de la pathogenèse de la vasculopathie d'allogreffe, et partant de ce constat, des inhibiteurs de cette prolifération ont été mis au point. Le sirolimus et l'évérolimus sont des membres d'une nouvelle classe d'agents immunosuppresseurs macrocycliques, les inhibiteurs de la voie mTOR, ayant une activité anti-proliférative unique.

Eisen et al. [66] ont présenté les résultats d'un grand essai multicentrique comparant l'évérolimus et azathioprine, chacun en association avec de la prednisone et la cyclosporine, pour la prévention de la vasculopathie après une transplantation cardiaque. Dans les groupes recevant l'évérolimus, beaucoup moins de patients présentaient une perte de greffon (ou retransplantation) et de rejets 3A ou supérieurs. Les résultats de l'échographie intravasculaire montraient que l'augmentation de l'épaisseur maximale de l'intima était significativement plus faible dans le groupe recevant l'évérolimus.

Cette étude pilote a été suivie d'autres, reconnaissant l'intérêt du traitement par évérolimus et sirolimus dans la prévention de la CAV et des infections. Cependant, des effets secondaires notables, thrombocytopénie, taux lipidiques élevés, augmentation de la créatine sérique, poussent certains centres à ne pas prescrire ces médicaments.

## **2. Physiopathologie de la lésion vasculaire**

Quel que soit l'organe transplanté, le rejet chronique comprend donc une atteinte vasculaire d'importance variable. C'est en transplantation cardiaque que cette

atteinte vasculaire est au premier plan, avec un rejet vasculaire touchant les artères coronaires, avec pour conséquence une cardiopathie ischémique.

La lésion fondamentale de l'atteinte vasculaire chronique est la lésion endothéliale, de mécanisme le plus souvent immunologique mais qui peut être d'origine autre (métabolique, viral, ou ischémique). Le processus lésionnel se situe dans la cascade physiopathologique de type «response to injury », activant les cellules musculaires lisses de la média pour induire la sclérose artérielle. Il a été mis en évidence que des lymphocytes T et des macrophages sont présents dans le tissu artériel lors du rejet chronique, sous la dépendance de la surexpression de molécules d'adhérence et de facteurs chimiotactiques. Ces cellules, en particulier les macrophages, ont été caractérisées comme source de facteurs de croissance (*platelet-derived growth factor*, *fibroblast growth factor*, endothéline) induisant l'activation des cellules musculaires lisses de la média qui migrent dans l'intima, prolifèrent, et synthétisent les composants de la matrice extracellulaire.

D'autres mécanismes ont été proposés, comme la diminution de l'activateur tissulaire du plasminogène dans les parois artérielles, démontrée au cours du rejet chronique.

Dans le rein, Lefaucheur et al. [67] ont cherché à améliorer la caractérisation des différents phénotypes de rejet d'allogreffe et ont mis en évidence l'existence d'une entité, non prise en compte par la classification, le rejet vasculaire médié par les anticorps. Une cohorte de 2079 patients, dont 302 avait un rejet aigu, a permis l'identification de quatre types de rejet et le risque de perte de greffon était 9 fois supérieur dans les rejets vasculaires médiés par les anticorps que dans les rejets à médiation par les lymphocytes T, sans vascularite ( $p < 0,0001$ ).

Ces rejets vasculaires médiés par les anticorps prouvent qu'il existe des mécanismes d'atteinte vasculaire spécifiques du rejet, dont la physiopathologie est complexe, dont la reconnaissance serait une addition à la classification actuelle et permettrait la mise en place de traitements spécifiques, comme l'évérolimus.

## **IV. Les biomarqueurs du rejet : des marqueurs connus aux nouvelles découvertes transcriptomiques**

Le suivi du patient et le diagnostic du rejet aigu cardiaque (cellulaire ou humoral) repose entièrement sur la biopsie endomyocardique (BEM) prélevée par cathétérisme cardiaque à différents temps de la transplantation et ce, de façon itérative, afin de dépister les rejets infra cliniques. Il est admis qu'environ 80% des biopsies endomyocardiques de suivi sont réalisées en excès car dépourvues d'activité immunologique.

Le protocole de suivi des patients transplantés cardiaques actuellement en vigueur repose ainsi sur une procédure répétée, invasive, couteuse et non dépourvue de risques (tamponade, hémorragies, thromboses, complications locales) dont le rendement est faible.

À l'ère de la médecine translationnelle et personnalisée, une technique permettant un classement des rejets et des patients par profil d'expression génique serait plus objective que l'analyse histopathologique de la biopsie. La principale hypothèse de cette technique est la suivante : lorsqu'il y a un dommage cellulaire, une situation pathologique, les cellules mises en jeu dans ces processus subissent une modification de leur transcriptome, puis de leur protéome. Cette modification, si elle est suivie et significative, pourrait refléter les conditions pathologiques de l'organe complet.

### **A. Les biomarqueurs classiques : une approche insuffisante**

Plusieurs études ont exploré le rôle de molécules d'intérêt classiques et reconnues en transplantation afin de dépister le rejet infra-clinique et améliorer le suivi du patient. George et al. [68] ont mesuré les cytokines plasmatiques, l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-8 (IL-8) et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), en combinaison avec une mesure des formes solubles de VCAM-1. L'expression de ces

trois molécules était fortement augmentée lors du rejet. Perez-Villa et al. [69] ont confirmé ces résultats, le taux circulant de IL-6 étant plus élevé chez les patients en rejet que chez les patients stables. De manière intéressante, cette augmentation n'était pas notable pour les hauts grades de rejet cellulaire, détectant ainsi les rejets de grade inférieur ou égal à 1B. Masters et al. [70] ont étudié les variations des peptides natriurétiques cardiaques (NP), auriculaires (ANF) et cérébraux (BNP) dans les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, établissant un lien entre leurs dérégulations et l'hypertrophie, l'insuffisance et l'inflammation cardiaque. Ils se sont également intéressés à la transplantation et ont déterminé que les taux d'ANF et BNP étaient plus élevés chez les patients en cours de rejet que chez les patients stables. Campana et al. [71] ont étudié la capacité de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) à prédire le développement de la maladie coronarienne et le risque d'échec de la greffe. Les résultats obtenus étaient contradictoires et incomplets : l'élévation du taux d'ICAM1 dans le sang ne prédisait que dans 50% des cas le rejet de greffe et l'incidence de la maladie coronarienne.

Plusieurs autres méthodes non invasives ont été étudiées pour la détection du rejet d'allogreffe, y compris l'échocardiographie, l'électrophysiologie, la surveillance cyto-immunologique, certaines techniques radio-isotopiques et l'imagerie par résonance magnétique. D'autres marqueurs biochimiques ont également été suggérés, tels que les néoptérines, la prolactine, les polyamines urinaires ou la  $\beta$ 2microglobuline. **Cependant, aucun de ces marqueurs ne s'est avéré assez sensible ou spécifique pour remplacer la biopsie endomyocardique.**

## **B. Les études transcriptomiques : l'approche révolutionnaire**

Devant l'échec des biomarqueurs classiques à prédire le rejet, de nouvelles approches se sont développées grâce à l'émergence des microarrays, des puces disposant de plusieurs milliers de puits dans chacun desquels se trouve une amorce spécifique d'un ARN messager différent.

Les études moléculaires en transplantation sont de plus en plus nombreuses, en particulier **en transplantation rénale**, du fait de l'accès facile aux urines des patients par prélèvement non invasif. Le rein, lors de la filtration glomérulaire, va également éliminer des particules et molécules dans les urines permettant une analyse moléculaire suivant les conditions physiopathologiques du patient [72]. Le rejet en transplantation rénale est, similairement au coeur, divisé en plusieurs types répondant à une classification internationale spécifique. Cette classification de Banff, bien que descriptive et incluant les améliorations et nouvelles découvertes, reste incomplète et ne reflète pas la totalité des événements prenant place lors des phénomènes de rejet. Ainsi, de nombreuses équipes ont travaillé, et travaillent encore, à l'établissement d'un microscope moléculaire permettant d'apporter un caractère prédictif et une précision diagnostique aux techniques d'observation classiques actuelles.

Divers groupes ont établi des listes de gènes différentiellement exprimés dans les dysfonctions rénales. Après une étude préliminaire sur des biopsies issues de greffons avant leur implantation, Scian et al. [73] ont déterminé, lors d'une validation par qPCR, une série de quatre gènes pro-inflammatoires (CCL5, CXCR4, ITGB2, EGF) reflétant la fonction rénale après transplantation. Srivastava et al. [74] ont exploré les urines de patients présentant un rejet histologiquement avéré et ont déterminé que les intégrines  $\alpha 3$  et  $\beta 3$ , TNF $\alpha$  et ANXA11 étaient dérégulés.

Chen et al. [75] ont étudié le rejet avec une approche multi-organes : dans des reins transplantés chez l'enfant ou l'adulte et des coeurs transplantés chez l'adulte, ils ont établis un set de 45 gènes up-régulés au cours du rejet. Ils ont ensuite déterminé les 10 gènes les plus différentiellement exprimés entre les rejeteurs et les non-rejeteurs et les ont testés dans le sérum. Les meilleurs biomarqueurs se sont avérés être PECAM1, CXCL9 et CD44. Le Roux et al. [76] se sont intéressés à la glomérulopathie d'allogreffe, et ont mis en évidence 11 gènes différentiellement exprimés chez les patients atteints, IL-16, TGF $\beta$ , et la voie p53 en tête, et 10 gènes différentiellement exprimés chez les patients stables, P450 et TNF $\alpha$  en premier plan. Cette étude, menée sur des sérums, indique la possibilité d'une dérégulation, observable dans les volumes circulants, qui pourrait être le marqueur d'une situation pathologique lié au rejet d'allogreffe. Enfin, Mueller et al. [77] ont écrit une revue sur l'intérêt de l'approche par microarrays, faisant part de plusieurs clusters de gènes

liés à des processus inflammatoires, ischémiques ou fibrosants (KIM-1 (HAVCR1) ou NGAL (LCN2)), représentant les mécanismes de dommage et de réparation du rein lors de la transplantation.

Une étude internationale de Halloran et al. [78] (INTERCOM) a analysé par microarrays plus de 300 biopsies, attribuant un score TCMR, mis au point grâce à un algorithme développé au sein de l'équipe d'Alberta, et comparant ces scores TCMR à l'évaluation histologique. Le score TCMR corrélait avec les lésions de rejet cellulaire (tubulite et infiltration interstitielle) et a permis de reclasser une partie des biopsies. Ainsi, ce score moléculaire TCMR pourrait être d'intérêt majeur pour aider à la classification exacte des biopsies et pour implémenter la classification de lésions associés aux phénomènes de rejet.

Cette équipe a également identifié des scores (PBT : pathogenesis based transcripts) basés sur les transcrits dérégulés lors des microarrays effectués sur des cohortes de biopsies rénales [79]. Leur hypothèse principale était la suivante : l'expression altérée des gènes endothéliaux due à la présence d'allo-anticorps activant la microcirculation serait un indicateur sensible de l'AMR, en particulier sur les formes tronquées, C4d négatives. Ils ont ainsi identifié 119 transcrits associés à l'activation endothéliale (ENDATs) et ont étudié leur expression par microarrays sur 173 biopsies rénales prélevées pour cause. La moyenne d'expression des ENDATs était augmentée dans tous les rejets mais était particulièrement élevée dans les cas d'AMR par rapport aux cas d'ACR et corrélait avec des lésions histopathologiques de l'AMR et la présence de DSA. De manière remarquable, seulement 40% des reins présentant une expression ENDAT augmentée, un AMR chronique ou un risque de perte du greffon étaient C4d positifs. Un score ENDAT élevé prédisait ainsi la perte du greffon avec une sensibilité plus élevée (77% vs 31%) et une spécificité légèrement inférieure (71% vs 94%) que le C4d.

**En transplantation cardiaque**, Karason et al. [80] ont identifié trois gènes potentiellement marqueurs du rejet d'allogreffe, le ligand à la chimiokine 9 (CXCL9), 10 (CXCL10) et le peptide natriurétique précurseur A (NPPA), grâce à une analyse par microarrays. CXCL9 était significativement régulé à la hausse au cours du rejet et CXCL10 affichait une tendance similaire sans atteindre une différence statistique significative. Dans le sérum, les niveaux de CXCL9 et CXCL10 ont ensuite été

étudiés et aucun changement n'a été observé entre les patients rejeteurs et les patients stables.

L'une des plus grandes études génomiques à explorer la signature du rejet en transplantation cardiaque a été menée par le groupe de CARGO (*Cardiac Allograft Rejection Gene expression Observational study*) en 2006. Deng et al. [81] avaient pour objectif de trouver un ensemble de gènes mesurables par RT-PCR dont l'expression pouvait être dérégulée lors du rejet cellulaire et retrouvée de manière reproductible dans une préparation d'ARN issue de PBMC. L'approche jointe par microarray et par analyse de bases de données/bibliographie a été limitée à des gènes exprimés dans les leucocytes, ignorant potentiellement des gènes importants exprimés dans d'autres types cellulaires. Ainsi, le screening du génome entier pourrait indiquer d'autres candidats. Qui plus est, la faible sensibilité des microarrays conduit parfois à l'élimination de gènes qui présentent une discrimination en PCR. La reproductibilité de la RT-PCR, qui permet la mesure de petites différences dans l'expression des gènes, probablement non détectables par puces à ADN rend l'analyse par microarray d'autant plus difficile.

Dans cette étude, 285 échantillons issus de 98 patients en rejet ou de patients stables ont été hybridés aux puces ADN spécifiques des gènes leucocytaires (7370 gènes). Quarante-sept gènes ont été choisis pour continuer les analyses qPCR en se basant sur les valeurs des  $p$  ( $p < 0,05$ ). Cet ensemble a été élargi pour inclure des gènes ayant des fonctions connexes aux 87 gènes primaires. Parmi la totalité de ces gènes, 68 étaient significativement dérégulés en situation de rejet, à partir desquels l'équipe a établi un score prédictif du rejet cellulaire de haut grade ( $>3A$ ).

L'étude IMAGE [82] a par la suite analysé 602 patients transplantés afin d'évaluer la valeur diagnostique des biomarqueurs (transcrits du test commercial AlloMap) en comparaison à la biopsie de dépistage. Les auteurs ont effectué une étude de non-infériorité entre les deux approches et ont prouvé que l'analyse transcriptomique n'était pas associée à un risque accru pour le patient, diminuait le nombre de biopsies de dépistage et diagnostiquait le rejet avec une spécificité et une sensibilité non-inférieure à la biopsie.

Mengel et al [83] ont réalisé une étude qui consistait en une comparaison de l'analyse histologique et de l'analyse par microarray de 105 biopsies endomyocardiques issues de 45 patients afin d'évaluer la valeur diagnostique de

l'analyse moléculaire. Les lésions histologiques distinguaient les lésions myocytaires/interstitielles et les lésions de la microcirculation. Les expressions des transcrits spécifiques des cellules T et des macrophages étaient fortement liées entre elles, mais aussi avec celle des transcrits indiquant un dommage tissulaire myocardique. Ce phénotype moléculaire corrélait également avec les lésions de Quilty, les lésions de la microcirculation et une diminution de la FEVG, mais pas avec le diagnostic de rejet. Holweg et al. [84] ont également étudié des biopsies endomyocardiques afin d'évaluer la valeur du système de gradation de l'ISHLT par rapport à l'analyse transcriptomique. Ils n'ont pas trouvé de différences significatives entre les grades 0 et 1A mais ont identifié des gènes différentiellement exprimés lors de la comparaison entre le grade 0 et 1B. Seul un petit nombre de gènes permettaient la différenciation entre les grades 1B et 3A/3B, indiquant un phénotype moléculaire similaire.

Ces résultats indiquent que (a) le système de gradation de l'ISHLT ne reflète pas le phénotype moléculaire et réciproquement, (b) l'interprétation des lésions Quilty doit être revisitée et (c) un « microscope moléculaire » pourrait aider au diagnostic.

D'autres équipes se sont intéressées aux pathologies cardiaques, en particulier l'insuffisance cardiaque. Lamirault et al. [85] ont identifié des marqueurs de la détérioration de l'état des patients insuffisants cardiaques : des gènes impliqués dans la mort cellulaire (CRI1, EIF4G2, GLO1, PPP2CA, YBX1), le métabolisme mitochondrial (ATP5A1, CKMT2, COX7A1), le cytosquelette (ACTA1-2, CFL2, FLNC), le métabolisme cellulaire (ANO3, LDHA, GPX3, PAM), la synthèse protéique (RS6P, EEF1B2, ELF2), le transport ionique (CACNB2, SLC4A2) ou encore l'adhésion cellulaire (ITGB3, ITGA3, DSP). Lin et al. [86] ont conduit une étude similaire dans le sang et ont identifié des gènes (71 protéines, 8 métabolites) augmentés chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque terminale. De manière intéressante, les gènes dérégulés étaient liés à des processus de remodelage du cytosquelette, à l'inflammation et à l'apoptose.

## V. Les miARNs

Les microARNs (miARNs) sont des petits ARNs simple brin d'environ 22 nucléotides régulant l'expression des gènes. Ils ont été découverts dans les années 1990, mais leur description complète et la découverte de leurs effets sur le génome n'ont été étudiées avec précision que dans les années 2000.

La totalité des miARNs connus est répertoriée dans la base officielle miRBase, initiée en 2002. Elle contient actuellement de nombreuses séquences de miARNs provenant de 142 espèces différentes. Une nomenclature simple a été établie grâce à la miRBase : lorsque l'espèce doit être précisée, un miARN est d'abord dénommé par le signe de l'espèce d'intérêt, « hsa » pour l'Homme, « rno » pour le rat, etc. Le terme « mir » est utilisé pour désigner le précurseur alors que le terme « miR » est utilisé pour désigner la forme mature d'un miARN. Enfin, le numéro du miARN est indiqué ; par exemple, le terme « hsa-miR-126 » désigne la forme mature du miARN 126 chez l'Homme.

Lorsqu'une famille de miARN est décrite, les miARNs de cette famille sont distingués par une lettre en minuscule, par exemple hsa-miR-20a, hsa-miR-20b, etc. Enfin, le précurseur d'un miARN pouvant donner naissance à deux miARNs matures, on peut les distinguer par des suffixes « 5p » et « 3p » selon que le brin est issu du bras 5' ou 3' du précurseur [87].

### 1. Biogénèse des miARNs

#### a) Synthèse du pri-miARN

Les gènes codant les miARNs sont principalement transcrits par l'ARN polymérase II, même si l'ARN polymérase III semble aussi avoir un rôle dans la synthèse de certains miARNs. Le miARN primaire (pri-miARN) produit présente une structure en épingle à cheveux et possède, comme les ARNs codants, une coiffe guanosine méthylée en 5' de l'ARN et une queue poly adénylée (polyA) en 3'. Dans certains

cas, plusieurs ARN peuvent être issus du même transcrit polycistronique, et l'on parle alors de cluster de miARNs [88] Un exemple de cluster est le cluster miR-17-92 qui comprend 7 miARNs décrits (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a et miR-92a).

L'organisation génomique de tous les miARNs n'est pas encore connue, mais il apparaît qu'environ 40% des gènes codant pour les miARNs sont introniques, 10% exoniques et 20% dérivés de régions génomiques répétées [89, 90]. Les analyses génomiques de miARNs montrent que beaucoup de caractéristiques des promoteurs des gènes de miARNs sont similaires à celles des gènes codant des protéines [91] telles que la fréquence des îlots CpG, la présence de TATAbox et la présence d'éléments d'initiation de la transcription [92]. De la même manière que pour les gènes classiques, des facteurs de transcription, des stimuli extérieurs, (comme le TGF $\beta$ 1) ou des mécanismes de contrôle épigénétiques (méthylation, modification de histones) régulent la transcription des miARNs.

## **b) Maturation des miARNs**

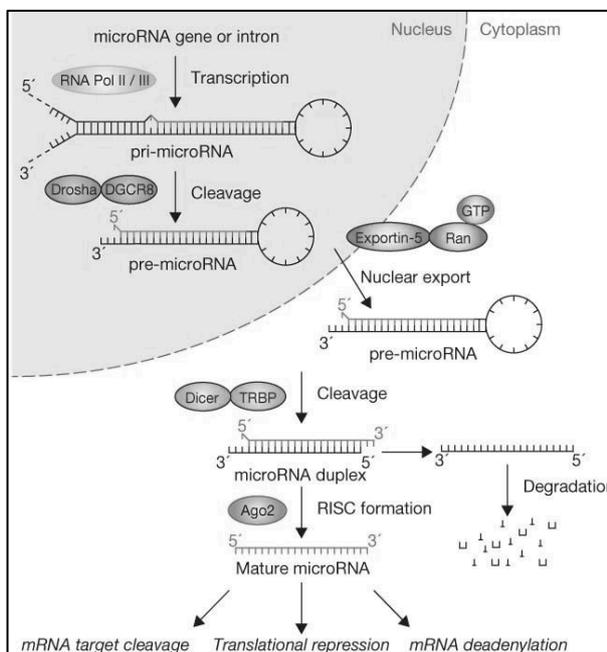
Le pri-miARN précédemment transcrit est intégré à un complexe (dsRBD = double stranded-RNA binding domain) comprenant les protéines Pasha et DiGeorge syndrome critical region protein 8 (DGCR8). Le recrutement de la RNase III Drosha forme le complexe Microprocessor qui va cliver le pri-miARN en un miARN précurseur (pré-miARN) présentant une structure irrégulière en épingle à cheveux, d'environ 70 nucléotides de long.

A l'extrémité 3' du pré-miARN, l'adhésivité de deux nucléotides caractéristiques des RNase III va permettre sa reconnaissance par l'Exportine 5, sa fixation directe sur le pré-miARN et son transport dans le cytoplasme. De façon intéressante, une fois maturé dans le cytoplasme, un miARN mature peut être réimporté dans le noyau, soit pour jouer un rôle dans le noyau, soit par restriction spatiale, comme cela a été montré pour miR-29b [93].

Une seconde classe de précurseurs a été décrite [94]. Ils sont produits de manière indépendante du complexe comprenant Microprocessor et ne possèdent pas la longue structure d'un miARN. Ces « mirtrons » ressemblent à des pré-miARNs et, dans une voie alternative, donnent naissance à des miARNs matures.

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé au sein du complexe RISC

(RNA- induced silencing complex) par la RNase III Dicer en un ARN double brin ( $\approx 22$  nucléotides) présentant des extrémités 3' cohésives. Le complexe multiprotéique est renforcé par une protéine de liaison à l'ARN (TRBP) et des protéines de la famille Argonaute (AGO). Dans ce complexe, le brin d'ARN « passager » est dissocié et ne reste que le brin « guide » alors appelé brin mature qui pourra interagir directement avec sa cible. Les séquences des deux bras du pré-miARN sont triées et intégrées dans différents complexes RISC selon la nature des protéines Argonautes présentes. Le brin dominant, thermodynamiquement moins stable en 5', serait associé à la protéine AGO1 pour réprimer la traduction protéique alors que le brin minoritaire serait associé à la protéine AGO2, pour cliver enzymatiquement l'ARNm cible.



*Figure 10. Voie de synthèse et de maturation des miARNs. Une fois transcrit, le pri-miARN est clivé par Droscha et exporté dans le cytoplasme. Le pré-miARN est ensuite intégré au complexe RISC (Dicer + TRBP + Ago2) pour être mûri en un miARN simple brin qui peut interagir avec son ARNm cible. (Winter et al. Nature Cell Biology 2009) [95]*

### c) Mécanismes d'action des miARNs

La principale fonction des miARNs est d'inhiber la synthèse de protéines, soit par inhibition de la traduction protéique soit par dégradation de l'ARNm cible.

Le complexe RISC s'apparie à l'ARNm au niveau de régions spécifiques plus ou moins complémentaires de la séquence des miARNs appelées MRE (miARN Recognition Elements). Lors de cette interaction, les miARNs s'apparient de manière plus ou moins complète qui déterminera le mode d'inhibition de la synthèse

protéique : l'ARNm sera soit dégradé, en cas de complémentarité totale, soit inhibé, en cas de complémentarité partielle.

Les mécanismes aboutissant à l'inhibition de la traduction ne sont pas totalement élucidés et deux hypothèses s'affrontent sur ce sujet. Nottrott et al. [96] suggèrent que la fixation du miARN sur l'ARNm pourrait induire la dégradation du peptide en cours de synthèse. D'un autre côté, Petersen et al. [97] proposent que la présence du miARN entraîne une dissociation prématurée du ribosome. Cette dernière hypothèse est largement appuyée par le fait que la dissociation des polysomes est plus rapide en présence des miARNs qu'en leur absence. Ces phénomènes d'inhibition sont néanmoins réversibles du fait de la complémentarité partielle du miARN avec sa séquence cible.

Les mécanismes aboutissant à la dégradation des ARNm sont, eux, plus connus. Si certains miARNs peuvent faire intervenir AGO2 pour cliver les ARNm, ce mode d'action n'est pas la seule explication à la dégradation des ARNm cibles. La fixation des miARNs sur la queue polyA des ARNm cibles, selon une complémentarité partielle, entrainerai une déadénylation induisant une perte de la coiffe protectrice en 5' des ARNm. Les ARNm décoiffés sont alors rapidement dégradés majoritairement par la 5'-3' exonucléase XRN1 présente dans le cytoplasme. L'inhibition de la traduction protéique est alors irréversible.

Les miARNs, au-delà de leur action sur la synthèse protéique, régulent l'expression des gènes, rôle important du fait de leur rapidité d'intervention et du nombre de cibles atteintes. Cependant, cette repression semble limitée, avec un changement d'expression atteignant rarement une diminution de plus de 3 fois.

## **2. Implications cliniques des miARNs**

### **a) Les miARNs comme biomarqueurs**

Tout comme l'expression d'autres gènes, l'expression de miARNs peut être utilisée comme mesure diagnostique voire pronostique. Du fait de leur facilité d'étude, de leur dégradation plus lente que les ARNm et de leur présence dans tous les tissus et

dans certains fluides (sang et urine majoritairement), les miARNs constituent de bons potentiels biomarqueurs. Les miARNs circulants sont le plus souvent retrouvés dans des vésicules plasmiques ou des exosomes, leur libération résultant d'un phénomène actif de signalisation cellulaire ou d'un mécanisme de mort cellulaire. Zampetaki et al. [98] ont ainsi étudié la présence de 19 miARNs lors d'une étude visant à lier infarctus et variation de miARNs. L'équipe a déterminé trois miARNs, dont miR-126, dont la variation était significativement associée à un risque accru d'infarctus du myocarde. Des études de ce type prouvent que les miARNs peuvent en effet être utilisés comme biomarqueurs, qu'ils sont fiables et que leur valeur diagnostique est importante.

L'exploration de l'expression des miARNs dans une pathologie représente donc un double avantage : la compréhension de réseau de gènes médiés par ces miARNs impliqués dans un état pathologique et la possibilité d'identifier de nouveaux biomarqueurs.

#### **b) Intérêt thérapeutique des miARNs**

L'expression des miARNs pouvant être dérégulée dans certaines pathologies, ils pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, la capacité d'un miARN à réguler plusieurs gènes en fait de bons candidats.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour réduire l'expression d'un miARN dont l'utilisation d'oligonucléotides complémentaires à la séquence du miARN ciblé. Ces oligonucléotides sont des ARNs modifiés chimiquement pour ne pas être dégradés par les RNases et plus affins envers leur cible. Plusieurs modifications ont été décrites, mais les plus utilisés restent les antagomir, des ARNs simples brins conjugués à des molécules de cholestérol, et les Locked Nucleic Acid (LNA), dans lesquels le ribose est bloqué en conformation 3' endo par une liaison covalente liant l'atome d'oxygène en 2' et l'atome de carbone en 4' [99].

A l'inverse, lorsque les miARNs sont pathologiquement diminués, il est possible d'augmenter leur expression. L'injection de mimics, des miARNs synthétiques, modifiés chimiquement pour éviter leur dégradation, ou de pré-miARNs ont été décrites *in vitro* [99]. Cependant, ces études n'ont été effectuées *qu'in vitro* et sont à l'essai et prometteuses *in vivo*. L'injection *in vivo* d'un inhibiteur ou d'un *mimic* de miARN semble possible pour prévenir ou guérir une pathologie. Mais l'utilisation de

ces stratégies est confrontée aux problèmes de faible délivrance de l'oligonucléotide synthétique, et surtout au large spectre d'action d'un miARN qui peut induire de nombreux effets non souhaités, au lieu de délivrance ou dans d'autres types cellulaires Enfin, l'utilisation de vecteurs viraux codant pour un miARN, a été décrite pour la première fois par Kota et al. en 2009 [100].

## **Objectifs des études**

Le rejet en transplantation cardiaque reste donc une entité à la fois mal diagnostiquée (rejet humoral) et disposant d'une méthode de détection invasive, inutile dans près de 80% des cas (biopsie endomyocardique). L'ensemble des études et données abordées dans l'introduction indique que plusieurs alternatives sont disponibles pour améliorer le diagnostic et diminuer le nombre de biopsies lors du suivi du patient. De fait, les études entreprises lors de cette thèse s'inscrivent dans un projet de recherche visant à identifier des marqueurs *in situ* et des biomarqueurs sanguins du rejet en transplantation cardiaque.

En utilisant des cohortes de patients issus de plusieurs centres hospitaliers (La Pitié Salpêtrière, HEGP, Necker Enfants Malades, CHU de Rouen, CHU de Nantes), nous avons suivi nos hypothèse de travail selon deux axes : un axe d'amélioration diagnostique du rejet humoral sur biopsie et un axe de développement de biomarqueurs non invasifs du rejet aigu.

La première partie de cette thèse, ayant donné lieu à un article dans le Journal of Heart and Lung Transplantation en 2011 correspond à l'étude des corrélations entre l'activation de la voie mTOR, les positivité des effecteurs pS6RP et P70S6K en immunohistochimie et l'incidence du rejet et des DSA.

La deuxième partie, ayant donné lieu à un article dans le European Heart Journal, visait à explorer la signature micro-ARN dans le tissu, puis dans le sérum, des patients transplantés cardiaques, afin de déterminer si leurs dérégulations pouvaient avoir été liées au rejet aigu.

## **Partie I : Voie mTOR et implication dans le diagnostic du rejet**

## **I. Activation de la voie mTOR par les anticorps anti-HLA**

La voie mTOR est l'une des voies activées lors des modifications endothéliales intervenant au cours du rejet, en particulier dans l'AMR. Bien que la positivité des DSA sériques ne soit pas prise en compte dans la classification du rejet humoral, leur effet délétère sur l'endothélium est avéré [1, 101, 102].

Les anticorps anti-HLA ont également été décrits comme des contributeurs importants au processus de vasculopathie d'allogreffe, en se liant aux molécules HLA de classe I exprimée par l'endothélium et des cellules musculaires lisses et en activant des signaux intracellulaires qui provoquent la prolifération des cellules [103, 104].

Jindra et al. [105] ont décrit le rôle de mTOR dans la prolifération des cellules endothéliales médiée par la fixation des molécules HLA de classe I. Ils ont également exploré la relation entre les complexes mTOR et leurs cibles en aval à la suite de cette fixation des molécules HLA de classe I par les anticorps anti-HLA. Plusieurs études [38, 106, 107] ont démontré le rôle des anticorps anti-HLA dans la transduction de signaux et la stimulation des phosphorylations de plusieurs protéines cibles dans les cellules endothéliales entraînant ainsi des changements fonctionnels au sein de l'endothélium. L'un des premiers événements est l'activation de RhoA. Rho est un médiateur important de la synthèse des fibres contractiles et dans la régulation du stress, nécessaires pour la migration, la survie et la prolifération cellulaire. La stimulation des cellules endothéliales par la fixation des anticorps anti-HLA sur CMH de classe I engendre la phosphorylation de Src, de la kinase d'adhésion focale (FAK), et de la paxilline ainsi que l'augmentation de l'adhérence et l'activation de la voie PI3K/Akt. La phosphorylation de la PI3K et de Akt conduit à une régulation à la hausse des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans les cellules endothéliales.

La fixation des anti-HLA sur les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I entraîne également la phosphorylation de S6RP, une cible en aval de mTORC1, suggérant un rôle de cette voie dans la prolifération cellulaire et de la synthèse protéique. De fait, les biopsies cardiaques de patients présentant un AMR ont

montré une expression accrue de S6RP phosphorylée suggérant que la signalisation de classe I peut induire la prolifération des cellules par l'intermédiaire de la voie mTOR/S6RP.

Dans cette étude, Jindra et al. ont utilisé des ARN interférents pour abroger mTOR et/ou Rictor/Raptor afin d'étudier la fonction de ces gènes dans l'activation de la prolifération et de la survie cellulaire induite par la fixation des anticorps anti-HLA : le knockdown de mTOR abrogeait totalement la phosphorylation CMHI dépendante des effecteurs de mTORC1 et mTORC2. Par ailleurs, le knockdown de mTOR, Rictor, ou Raptor empêchait la prolifération CMHI dépendante des cellules endothéliales. Les conclusions de cette étude confirmaient donc le rôle des anticorps anti-HLA dans physiopathologies des vasculopathies d'allogreffe par activation et prolifération CMHI dépendante de l'endothélium via la voie mTOR.

Jin et al [106] ont examiné le rôle de mTOR dans la signalisation HLA-induite en testant l'évérolimus. Le traitement entraînait la dissociation de RAPTOR et RICTOR (protéines compagnon) de leur complexe respectifs, mTORC1 et mTORC2. Cette dissociation empêche la phosphorylation HLA-induite des cibles en aval de mTOR, p70S6K, S6RP et 4E-BP1 d'un coté et Akt/ERK de l'autre. Dans l'endothélium, les anticorps anti-HLA ont donc un effet activateur sur les voies de signalisation, en particulier mTOR.

Ketroussi et al. [108] ont étudié les voies impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire des lymphocytes T en présence de molécules HLA-G et ont prouvé qu'il existait une activation HLA-spécifique de la voie mTOR. L'interaction de l'antigène HLA-G avec les lymphocytes T augmentait la phosphorylation de la phosphatase SHP-2 et entraînait la déphosphorylation de mTOR et p70S6K, son effecteur. Cette étude indique donc que la fixation des HLA-G est associée à l'activation de la phosphatase SHP-2, qui inhibe la voie mTOR, inhibant ainsi l'entrée des lymphocytes T en cycle cellulaire. Il est évident que la voie mTOR n'est pas exclusivement activée dans l'endothélium et que les cellules inflammatoires présentes dans la microcirculation et dans les tissus environnants seront également marquées lors des études en immunohistochimie.

## II. Voie mTOR et rejet en transplantation cardiaque

L'activation des cellules endothéliales par les anticorps anti-HLA met en jeu la voie mTOR, et ses deux complexes, mTORC1 et mTORC2.

Le complexe mTORC1 contrôle la synthèse protéique, la synthèse des lipides et la croissance cellulaire et est activé par la fixation des anticorps anti-HLA de type I.

Les travaux de Lepin et al. [46] en 2005 ont testé l'hypothèse que des effecteurs de la voie mTOR, S6K et S6RP, pourraient être de bons biomarqueurs du rejet humoral cardiaque. En aval de la voie mTOR, la S6K, en plus d'avoir une action sur la traduction via la régulation de 4E-BP1, peut avoir un rôle de régulation de la synthèse protéique via son effecteur phosphorylable S6RP. Ces deux molécules sont phosphorylées lors de l'activation de la voie mTOR par la fixation des anticorps sur la cellule et sont ensuite détectables par immunohistochimie sur biopsie.

Dans leur étude, ils ont démontré une corrélation entre le rejet humoral et l'activation de la voie mTOR, définissant un système de gradation de la positivité de la voie mTOR. Aucune corrélation entre la gravité du rejet cardiaque humoral et la positivité de la voie mTOR n'a été établie.

Zhang et al.[109] ont évalué l'activation de la voie mTOR afin de déterminer si sa modulation avait un effet dans le rejet chronique. Pour cela, ils ont délivré un CMHI muté aux rats utilisés dans l'étude, directement après la transplantation, entraînant une abrogation du rejet chronique du fait de l'impossibilité d'une fixation HLA sur les CMH. Ils ont montré que ces rats présentaient une down-régulation des composants des complexes mTORC1 (RAPTOR, mTOR) et mTORC2 (RICTOR, mTOR) et ont ainsi prouvé que le rejet chronique faisait intervenir deux voies mTOR: une RAPA-sensible, mTORC1, voie de régulation de la prolifération cellulaire et une RAPA-insensible, mTORC2, voie de régulation dans les cellules T.

La voie mTOR contrôle ainsi le métabolisme cellulaire, la croissance, la prolifération et la survie cellulaire en régulant la synthèse protéique, la synthèse des lipides, le métabolisme oxydatif, la synthèse de facteurs cytokiniques et la prolifération

mitochondriale.

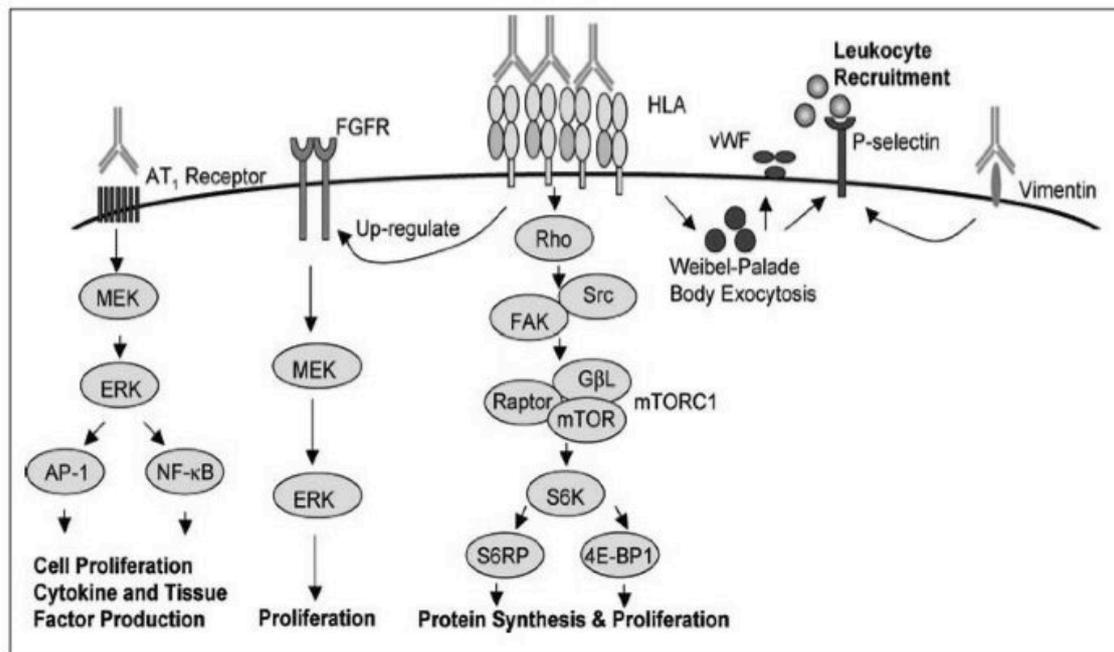


Figure 11. Signalisation cellulaire régulant les mécanismes d'activation endothéliale médiée par les anticorps dans les phénomènes de rejets humoraux. (Zhang et al. Am. J. Transplant. 2009)

L'implication de la voie mTOR dans les rejets en transplantation cardiaque est donc établie depuis de nombreuses années et des thérapeutiques immunosuppressives réprimant la voie mTOR ont été mises en place. Les inhibiteurs de la voie mTOR (everolimus/sirolimus) sont prescrits en complément d'une immunosuppression classique par cyclosporine et/ou en remplacement du mycophénolate mofétil. Par leur effet anti-mTOR, ces médicaments empêchent l'activation endothéliale, régulent l'apoptose et la prolifération cellulaire, diminuant ainsi les effets des anticorps sur l'endothélium et le myocarde. L'effet anti-prolifératif de ces médicaments est également intéressant dans la prévention de vasculopathie d'allogreffe en diminuant l'épaississement néo-intimal.

Ces données de la littérature nous ont conduit à réaliser une étude visant à corréler la positivité de la voie mTOR en immunohistochimie, l'incidence du rejet aigu et la survenue de DSA au sein d'une cohorte non sélectionnée prospective de transplantés cardiaques. Nous nous sommes également intéressés à la mise au

point de l'immunohistochimie et à son grading, afin d'apporter de nouveaux éléments diagnostiques à la biopsie de routine.

ORIGINAL CLINICAL SCIENCE

## Pathologic classification of antibody-mediated rejection correlates with donor-specific antibodies and endothelial cell activation

Marion Tible, MPH,<sup>a,b</sup> Alexandre Loupy, MD, PhD,<sup>a,b,c</sup> Dewi Vernerey, MPH,<sup>b</sup> Caroline Suberbielle, MD, PhD,<sup>d</sup> Thibaut Beuscart, MPH,<sup>e</sup> Aurelie Cazes, MD, PhD,<sup>a,e</sup> Romain Guillemain, MD,<sup>f</sup> Catherine Amrein, MD,<sup>f</sup> Veronique Pezzella, MD, PhD,<sup>f</sup> Jean-Noel Fabiani, MD,<sup>f</sup> Dominique Nochy, MD,<sup>e</sup> Gary Hill, MD,<sup>e</sup> Jean-Philippe Empana, MD, PhD,<sup>a,b</sup> Xavier Jouven, MD, PhD,<sup>a,b</sup> Dominique Charron, MD, PhD,<sup>d</sup> Patrick Bruneval, MD,<sup>a,b,e</sup> and Jean-Paul Duong Van Huyen, MD, PhD<sup>a,b,e</sup>

From the <sup>a</sup>Université Paris Descartes Médecine; the <sup>b</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR 970, Biostatistics and Histopathology Platform, PARCC Cardiovascular Research Institute; the <sup>c</sup>Service de Transplantation Rénale et de Soins Intensifs, Hôpital Necker, APHP; the <sup>d</sup>Laboratoire d'Histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, APHP; the <sup>e</sup>Laboratoire d'Anatomie Pathologique; and the <sup>f</sup>Service de Chirurgie Cardiaque, Hôpital Européen Georges Pompidou, APHP, Paris, France.

### KEYWORDS:

endomyocardial biopsy;  
antibody-mediated rejection;  
pAMR;  
donor-specific antibodies;  
heart transplantation;  
microcirculation inflammation

**BACKGROUND:** Humoral immune responses during heart transplantation may result in antibody-mediated rejection (AMR), which is now taken into account on endomyocardial biopsy (EMB) specimens and ranked according to the pathologic AMR (pAMR) grades of the International Society for Heart and Lung Transplantation classification. This classification might benefit from new immunohistological markers and validation by others biomarkers, namely donor-specific antibodies (DSA).

**METHODS:** From the 293 protocol EMBs performed in 113 patients in our institution during a 1-year period for this prospective study, 280 EMB specimens were available with both histology and immunohistochemistry. C4d and labeling of intravascular cells by cluster of differentiation (CD) 68 were performed on paraffin sections. Available sera ( $n = 150$ ) concomitant of EMB specimens were tested for the presence of DSA. All of the pAMR+ EMB specimens, along with a set of randomized pAMR0 EMB specimens, were immunolabeled for mammalian target of rapamycin (mTOR) effectors, phosphorylated 70 S6-kinase (p70S6K) and phosphorylated S6 ribosomal protein (pS6RP).

**RESULTS:** AMR was diagnosed in 37 EMB specimens (13.2%): 1 pAMR1(I+), 27 pAMR1(H+), and 9 pAMR2. The proportion of DSA-positive EMB varied according to the pAMR grade, with pAMR0, pAMR1(H+), and pAMR2 EMB presenting 17.6%, 77.3%, and 100% of DSA-positivity, respectively. Among the 30 pAMR+ specimens with available DSA testing and the 30 pAMR0 randomized specimens, mTOR pathway immunohistochemistry showed endothelial cell positivity for p70S6K in 17 pAMR+ EMB specimens (56.7%) and in 1 pAMR0 EMB specimen (3.3%). pS6RP was detected in 8 pAMR+ EMB specimens (26.7%) and in 1 pAMR0 EMB specimen (3.3%).

Reprint requests: Jean-Paul Duong Van Huyen, Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Necker—Enfants Malades, 149 rue de Sevres, 75015 Paris, France. Telephone: +33-61-999-5376.

E-mail address: [jean-paul.duong@nck.aphp.fr](mailto:jean-paul.duong@nck.aphp.fr) or [jp.dvh@wanadoo.fr](mailto:jp.dvh@wanadoo.fr)

1053-2498/\$ - see front matter © 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2013.05.012>

**CONCLUSIONS:** p70S6K and pS6RP immunohistochemistry afford new markers of AMR on EMB specimens because their expression is correlated with microcirculation inflammation and DSA. The correlation of DSA with pAMR grade suggests that this grading system is valid.

J Heart Lung Transplant 2013;32:769–776

© 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.

Heart transplantation is a well-established life-saving treatment for patients presenting with end-stage cardiac failure. However, most patients who receive a transplant will go through rejection episodes and will face the risk of developing an antibody-mediated rejection (AMR).<sup>1,2</sup> This specific condition has been associated with the presence of donor-specific antibodies (DSA)<sup>3</sup> and has been recognized by the International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT).<sup>1,2,4</sup> AMR is found in about 6% of heart transplant patients. AMR may occur in early or late after transplantation as a sub-clinical condition or, rarely, combined with cardiac dysfunction.<sup>5–9</sup> AMR is now known to be associated with poor outcome and progression to cardiac allograft vasculopathy (CAV).<sup>8,10–12</sup>

Considering the prognosis input of asymptomatic AMR, it seems crucial to determine which patients are at risk and therefore may benefit from a specific treatment and follow-up. In this respect, the assessment of AMR on protocol endomyocardial biopsy (EMB) specimens needs to be better characterized.<sup>2,13,14</sup> Indeed, ISHLT initiatives improved the criteria for the diagnosis of AMR based on histologic and immunohistologic criteria alone.<sup>15</sup>

Histologic criteria include microcirculation inflammation (MI), edema, endothelial turgescence, and in severe AMR, interstitial hemorrhage, capillary fragmentation, mixed inflammatory infiltrates, endothelial cell karyorrhexis, myocytolysis, and marked edema. Immunohistochemistry criteria mainly include C4d and cluster of differentiation (CD) 68 positivities in paraffin sections. Fibrin, immunoglobulin, and C3d and C4d deposition by immunofluorescence has also been evaluated. However, the pathologic diagnosis of AMR in EMB specimens remains difficult,<sup>16</sup> and furthermore, is largely based on the C4d deposition finding, which is currently open to criticism because of sensitivity, at least in renal AMR.<sup>17</sup>

The reality of C4d-negative AMR underlines the need to use a larger panel of tools to characterize AMR.<sup>18</sup> Among them, DSA detection using sensitive techniques is a major mean, the use of which improves the diagnosis of AMR.<sup>3</sup> However, DSAs are not tested as frequently as cardiac tissue on EMB specimens. The biopsy samples have often to be assessed for AMR apart from other non-morphologic tools.<sup>19</sup>

The aim of the study was to assess AMR in a prospective non-selected set of EMB specimens in the setting of sub-clinical conditions and to evaluate the pAMR classification in the light of DSA testing and immunohistochemistry detection of markers of endothelial cell activation. Reed's group have identified the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway as a major effector of activation of endothelial cells dependent of anti-human leukocyte antigen (HLA) antibody.<sup>3</sup> They recently

they showed that the in situ detection of the phosphorylation of S6 ribosomal protein (pS6RP), a downstream effector of mTOR, by immunohistochemistry, was associated with AMR in heart transplant EMB. This study shows that the pAMR classification correlates with DSA and endothelial cell activation markers. It also emphasizes the low rate of C4d deposition and the value of intravascular cells within the microcirculation for the diagnosis of AMR in heart transplantation.

## Patients and Methods

### EMB and patients

A total of 293 protocol EMBs were performed in 113 patients in our institution between October 1, 2009, and September 30, 2010. Two patients were excluded because of inadequate EMB specimens. Patient characteristics of the 111 recipients included in the study are given in Table 1. All recipients in our center undergo a routine protocol EMB according to a pre-determined tapering schedule with early and late assessments of graft histology. In our practice, a protocol EMB is performed in a situation that is regarded as a steady state without any recent immunologic event, in that clinical parameters are showing no recognizable signs of downward evolution. All patients were asymptomatic at the day of biopsy, defined by normal or stable ejection fraction evaluated by transthoracic echocardiography.

### Study design

Study design is summarized in Figure 1. A total of 280 EMB specimens of 293 were available for histopathology and in situ complement fraction C4d and CD68 testing (step 1). Among these, 150 concomitant sera were available and were tested for DSA (step 2). Finally, all EMB specimens with DSA evaluation and features of AMR (pAMR1 and pAMR2, 30 EMB specimens) were assessed for in situ activation of mTOR pathway compared with 30 randomized pAMR0 EMB specimens (step 3).

### Histology and immunohistochemistry

EMB specimens were formalin-fixed, paraffin-embedded, and routinely stained with hematoxylin and eosin. All EMB samples were evaluated by 3 trained pathologists (P.B., A.C., and J.P.D.V.H.) according to the ISHLT 2005 classification<sup>4</sup> and to the last recommendations for the diagnosis of AMR (Berry<sup>15</sup> and ISHLT Congress, Prague 2012). Histopathologic features of AMR were mainly based on the identification of MI that is defined by the presence of mononuclear cells within the peri-myocytic capillaries. Immunomorphologic features relied on 2 markers: C4d (positive if labeling > 50% of the capillaries) and/or CD68 (positive if intravascular CD68-positive macrophages are present in > 10% of the capillaries). Immunohistochemistry was performed in tissue sections with polyclonal anti-C4d (Cliniscience, Nanterre, France)

**Table 1** Patient Characteristics

Variables	No. (%) or Mean $\pm$ SEM (n = 111)
Age, years	44 $\pm$ 1
Male sex	89 (80.2)
Primary heart disease	
Ischemic cardiomyopathy	21 (18.9)
Non-ischemic cardiomyopathy	61 (54.5)
Congenital heart disease	12 (10.8)
Valvular cardiomyopathy	9 (8.1)
Miscellaneous	7 (6.3)
Retransplantation	1 (0.9)
Donor age, years	39 $\pm$ 1
Male donor	79 (71.2)
Cold ischemic time, min	196 $\pm$ 6
Induction protocol, %	
Steroids	100
Rabbit ATG or basiliximab	94
Azathioprine (to 1998)	24
MMF (from 1998)	81
Time since transplant	
< 2 years	25 (22.5)
2–5 years	40 (36)
$\geq$ 6 years	46 (41.4)

ATG, antithymocyte globulin; MMF, mycophenolate mofetil; SEM, standard error of the mean.

and monoclonal anti-CD68 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) using the immunoperoxidase method, as previously described.<sup>8,20</sup>

Pathologic AMR was classified<sup>15</sup> as pAMR0, no features of AMR; pAMR1, suspicious AMR subdivided into pAMR1(H+) with histopathology positive and immunohistochemistry negative and pAMR1(I+) with histopathology negative and immunohistochemistry positive; pAMR2, histopathology and immunohistochemistry both positive; pAMR3, severe AMR.

To evaluate the activation of the mTOR pathway, we assessed the positivity of EMB samples for the downstream effectors of mTOR, p70S6K, and pS6RP. That latter marker has previously been described as a reliable tool for the detection of the endothelial activation associated with AMR.<sup>21</sup>

Immunohistochemistry was performed on paraffin sections with anti-p70S6K (clone 49D7; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and anti-pS6RP (clone D68F8; Cell Signaling), using a 3-step immunoperoxidase method with a prior antigen unmasking procedure and was evaluated according to the previous study by Lepin et al.<sup>21</sup> These authors showed that anti-pS6RP antibody stained not only endothelium from capillaries and small arteries but also macrophages and inflammatory cells and that the specificity for AMR was restricted to the positivity of capillary endothelium alone.

Capillary labeling was graded according to a 0 to 4 scale (0, no staining; 1, rare staining; 2, focal staining; 3, multifocal staining; 4, diffuse staining) and considered positive at  $\geq$  grade 3. Inflammatory cells, macrophages, and endothelial cells of small arteries were excluded from this grading.

### Data collection

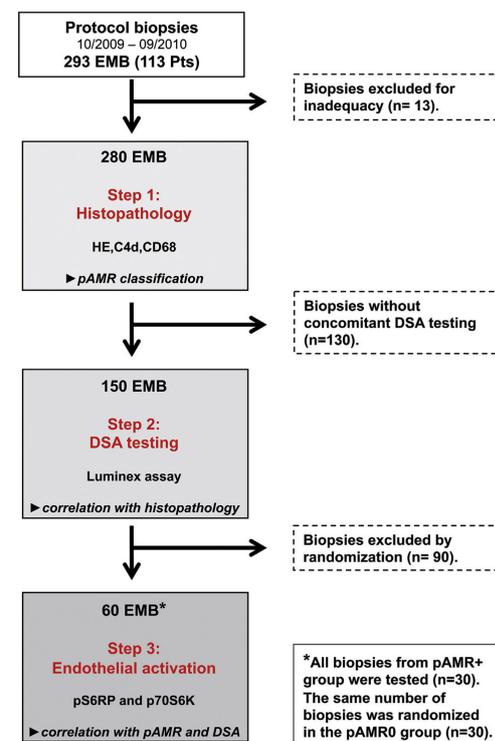
For all patients, data was collected for sex, recipient age, primary heart disease, date of transplantation, cold ischemia time, and immunosuppressive drugs regimen.

### Induction and maintenance immunosuppression

Patients received a sequential quadruple therapy:

1. Induction treatment consisting of a 3-day course of rabbit anti-thymocyte globulin (Thymoglobulin, Genzyme, Lyon, France) at a dose of 2.5 mg/kg/day;
2. the calcineurin inhibitor cyclosporin (Sandimmune and Neoral, Novartis, Basel Switzerland);
3. the purine inhibitor azathioprine (Imurel, Aspen, Dublin UK), 1 to 3 mg/kg/day until 1997, and replaced by mycophenolate mofetil (CellCept, Roche Pharmaceuticals, Basel, Switzerland) at 3 g/day according to hematologic tolerance; and
4. prednisolone at 360 mg pre-operatively and 240 mg on Days 1 and 2, then prednisone at 1 mg/kg/day for 15 days, progressively tapered to 0.2 mg/kg/day, and continued.

For calcineurin inhibitors, blood concentration was monitored by whole blood radioimmunoassay, which targeted a cyclosporine



**Figure 1** Flowchart of the study. All endomyocardial biopsy (EMB) specimens were primarily collected for a year between October 2009 and September 2010. The first step was to perform C4d and cluster of differentiation (CD) 68 immunolabeling and to classify the EMB sample according to the pathologic antibody-mediated rejection (pAMR) classification. The next step was to perform donor-specific antibody (DSA) testing by Luminex assay. The final step was analysis of the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway phosphorylated 70 S6 kinase (p70S6K) and phosphorylated S6 ribosomal protein (pS6RP). HE, hematoxylin and eosin staining.

trough level of 200 ng/ml for the first year, then 150 ng/ml thereafter. All cytomegalovirus-positive and negative recipients of a heart from a cytomegalovirus-positive donor were given prophylaxis with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir for the first year after transplant. All patients received prophylaxis against *Pneumocystis jiroveci* with trimethoprim-sulfamethoxazole for 1 year.

### Antibody detection, specificity analysis, and crossmatch techniques

All immunologic analyses were performed in a single central laboratory (Plate-forme régionale AP-HP d'histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis, Paris, France). HLA typing of transplant recipients was performed by molecular biology using the Innolipa HLA typing kit (Innogenetics, Belgium). Heart transplant donors, HLA-A, -B, -DR, and -DQ tissue-typing was performed using the microlymphocytotoxicity technique with tissue-typing trays (One-Lambda Inc, Canoga Park, CA). Briefly, identification of class I DSA by Luminex SA (LuminexLABScreen Single Antigen, One-Lambda Inc) used a set of 96 beads, each one coated with a different HLA class I glycoprotein. Identification of DSA class II antibodies by Luminex SA was performed identically using a set of 76 beads coated with HLA class II antigens. Presence of antibodies was detected using a goat anti-human immunoglobulin G coupled with phycoerythrin. The fluorescence of each bead was detected by a LABscan (One Lambda) reader and recorded as the mean intensity of fluorescence (MFI). All beads showing a normalized MFI > 300 were considered positive. The value of 300 MFI in our laboratory was based on the criteria of validation of negative control sera (first bead < 500, third bead < 300). In this study, we selected the highest rank of class I or II DSA MFI.

### Statistical methods

Values are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean, unless otherwise specified. Categorical variables were analyzed by chi-square tests and Fisher exact tests. Statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ . All tests were 2-sided. Statistical analyses were performed using STATA 11.0 software (StataCorp LP, College Station, TX).

## Results

### Histopathologic characteristics and pAMR classification

Histopathology results are summarized in Table 2 and illustrated in Figure 2. MI (Figure 2A), defined by the presence of mononuclear cells within capillaries, was present in 12.9% of the EMB specimens and observed in early and late (> 2 years) EMB specimens. C4d (Figure 2B) and CD68 (Figure 2C) were positive in 0.7% and 3.6% of the samples, respectively. According to the pAMR classification, pAMR0, pAMR1(I+), pAMR1(H+), and pAMR2 were diagnosed in 86.8%, 0.4%, 9.6%, and 3.2% of the EMB samples, respectively. pAMR2 cases were mainly defined by MI and CD68 positivity, because the incidence of C4d positivity was low (2 EMB among the 9 pAMR2 cases). Suspicious pAMR1 category was represented in most by pAMR1(H+), defined by isolated MI with negative immunohistochemistry (C4d- with scarce intravascular CD68-positive cells involving < 10% of the capillaries), with only one sample classified as pAMR1(I+) due to CD68 positivity. Cellular rejection was frequently associated with pAMR (pAMR1 or pAMR2), with acute cellular rejection  $\geq 2R$  observed in 21.6% of pAMR+ cases.

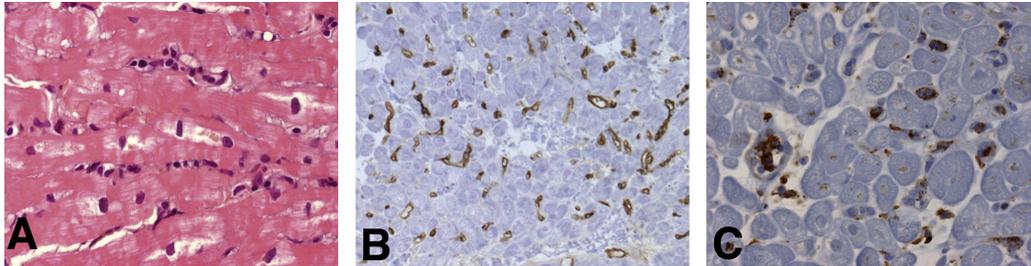
### Histopathology and pAMR classification according to DSA status

Among the 150 available sera, 31.3% ( $n = 47$ ) were positive for DSA. 40.4% were HLA class I DSA, 40.4% were HLA class II DSA, and 19.2% presented both class I and II DSA. The maximum MFI median was 2,372 (range, 516–15,635), with a mean of  $911 \pm 2,491$ . Table 3 gives the relationship among histopathology, pAMR classification, and DSA. MI and CD68 were significantly associated with DSA positivity. A dramatic increase in the proportion of DSA-positive EMB specimens was also observed with the progression of pAMR grade: pAMR0, pAMR1(H+), and pAMR2 EMB presented 17.6%, 77.3%, and 100% of DSA positivity, respectively. Our single pAMR1(I+) patient had

**Table 2** Histologic and Immunologic Characteristics

Variable	Overall ( $n = 280$ )	PAMR0 ( $n = 243$ [86.8%])	pAMR ( $n = 28$ [10%])		
			pAMR1(I+) ( $n = 1$ )	pAMR1(H+) ( $n = 27$ )	pAMR2 ( $n = 9$ [3.2%])
	No. (%)	No.	No.	No.	No.
MI+	36 (12.9)	...	...	27	9
C4d+	2 (0.7)	...	...	...	2
CD68 > 10%	10 (3.6)	...	1	...	9
ACR					
OR	113 (40.4)	112	0	1	0
1R	158 (56.4)	130	1	21	6
$\geq 2R$	9 (3.2)	1	0	5	3

ACR, acute cellular rejection; CD, cluster of differentiation; pAMR, pathologic antibody-mediated rejection; H+, positive for histopathology and negative for immunohistochemistry; I+ positive for immunohistochemistry and negative for histopathology; MI, microcirculation inflammation.



**Figure 2** Photomicrographs show histopathologic results. (A) Microcirculation inflammation with presence of intracapillary mononuclear cells (hematoxylin and eosin stain, original magnification  $\times 250$ ). (B) Diffuse C4d positivity with capillary immunolabeling (immunoperoxidase, original magnification  $\times 125$ ). (C) Intracapillary macrophages positive for cluster of differentiation (CD) 68 (immunoperoxidase, original magnification  $\times 250$ ).

no concomitant serum available for DSA testing. In addition, maximum MFI was significantly higher in pAMR2 EMB specimens than in pAMR0 EMB specimens (Figure 3).

### Endothelial cell activation markers

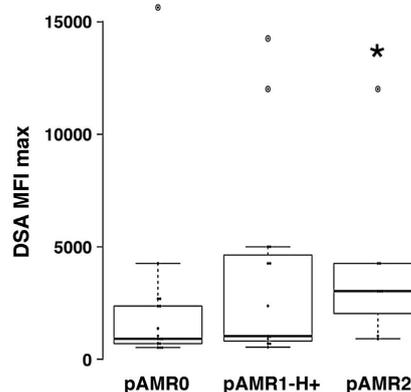
Capillary endothelial expression of pS6RP and p70S6K was assessed by immunohistochemistry in 60 EMB samples, comprising the 30 EMB samples with pathologic features of AMR (21 pAMR1(H+) and 9 pAMR2) and the 30 EMB specimens randomly selected among the pAMR0 EMB samples. Figure 4 illustrates the endothelial labeling of the peri-myocytic capillaries with pS6RP (panel A) and p70S6K (panel B). p70S6K labeling was positive in 56.7% and in 77.8% of EMB specimens with MI or CD68-positivity, respectively (Figure 5A and B). pS6RP was positive in 26.7% and in 44.4% of EMB specimens with MI or CD68-positivity, respectively (Figure 5D and E). The 2 C4d-positive samples were positive for both endothelial activation markers (Figure 5,C and F). Activation of the mTOR pathway was also correlated with pAMR grade: p70S6K and pS6RP are found with a higher frequency in pAMR2 EMB specimens (77.8% and 55.6%, respectively) than in pAMR0 (3.3% and 3.3%, respectively) and pAMR1

(47.6% and 14.3%, respectively; Figure 6A and B). Both mTOR activation markers were also associated with DSA (44.8% and 27.6%) for p70S6K and pS6RP, respectively (Figure 6C and D).

### Discussion

The present study evaluates the pathologic classification of AMR in heart transplantation in a prospective, non-selected series of protocol EMB specimens with concomitant DSA testing. Our main result is that the pAMR classification correlates with DSA and with in situ markers of endothelial cell activation through the mTOR pathway.

Our study gives insight into the incidence of AMR in a non-selected series of heart recipients. Herein, pAMR1 and pAMR2 specimens represented 9.3% and 3.6% of the protocol specimens, respectively. Interestingly, the incidence of C4d positivity was very low in our series, resulting



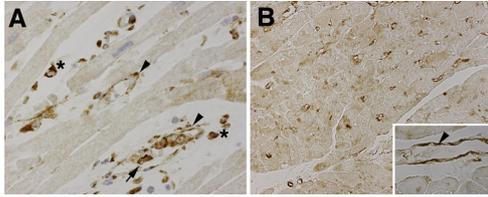
**Figure 3** Donor-specific antibody (DSA) maximum mean intensity of fluorescence (MFI) according to pathologic antibody-mediated rejection (pAMR) category. MFI was significantly increased in pAMR2 samples compared with pAMR0 samples ( $*p < 0.05$ ). The horizontal line in the middle of each box indicates the median; the top and bottom borders of the box mark the 75th and 25th percentiles, respectively; the whiskers mark the 90th and 10th percentiles; and the circles indicate outliers.

**Table 3** Histology and Pathologic Antibody-Mediated Rejection According to the Donor-Specific Antibodies Status

Variable	Patients No	DSA		<i>p</i> -value <sup>a</sup>
		DSA- (n = 103) No. (%)	DSA+ (n = 47) No. (%)	
MI+	31	5 (4.9)	26 (55.3)	<0.0001
C4d+	2	0 (0)	2 (4.3)	0.0967
CD68 > 10%	9	0 (0)	9 (21.3)	<0.0001
pAMR0	119	98 (82.4)	21 (17.6)	<0.0001
pAMR1(H+)	22	5 (22.7)	17 (77.3)	<0.0001
pAMR2	9	0 (0)	9 (100)	<0.0001

CD, cluster of differentiation; DSA, donor-specific antibodies; H+, positive for histopathology and negative for immunochemistry; MI, microcirculation inflammation; pAMR, pathologic antibody-mediated rejection.

<sup>a</sup>Statistically significant at  $p < 0.05$ .



**Figure 4** Immunohistochemistry of the mammalian target of rapamycin pathway. (A) Phosphorylated S6 ribosomal protein labeling of an endomyocardial biopsy (EMB) specimen positive for pathologic antibody-mediated rejection (pAMR+) (immunoperoxidase; original magnification  $\times 250$ ). (B) Phosphorylated p70 S6 kinase staining of a pAMR+ EMB specimen (immunoperoxidase, original magnification  $\times 125$ ; insert, original magnification  $\times 250$ ). Staining of the capillary endothelium (arrowhead) only is taken into account for evaluation of endothelial activation. Also labeled are interstitial (\*) and intracapillary (arrow) inflammatory cells.

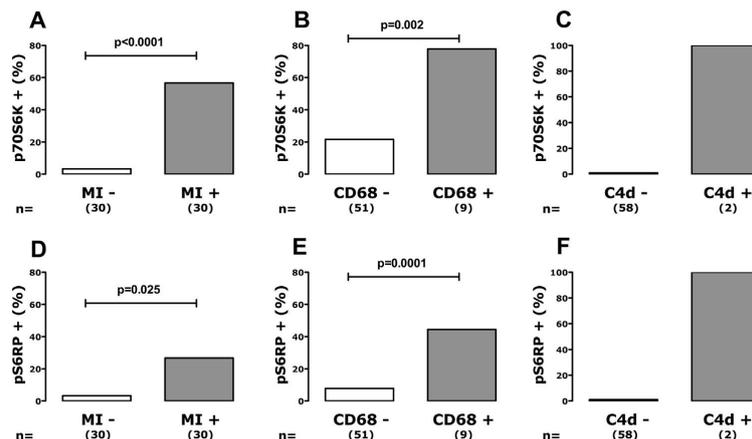
in a relative high proportion of suspicious pAMR1(H+) samples characterized by isolated MI without C4d or CD68 positivity. Accordingly, most of pAMR2 cases had MI and were CD68-positive while being C4d-negative. C4d-negative AMR has been recognized in kidney transplantation and was recently integrated in the Banff schema.<sup>17</sup> In kidney transplant biopsy specimens, results from our group and from the team from Edmonton have provided evidence for the relevance of microcirculation injury without C4d deposition, an entity associated with the progression to chronic antibody-mediated graft deterioration and graft loss.<sup>20,22</sup> C4d negativity could be explained by a relative lack of sensitivity of C4d staining in protocol biopsy specimens or by the involvement of antibodies with a too low affinity or unable to fix complement.<sup>18</sup>

Recent experimental data also support the concept of a complement-independent pathway, arguing that lack of C4d

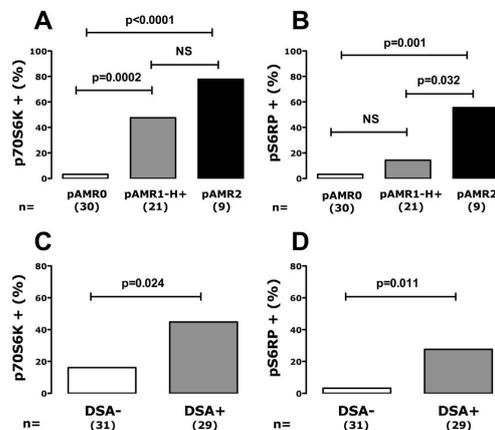
deposition does not exclude AMR.<sup>23,24</sup> Together with other recent studies, our results strongly suggest that C4d- cases also exist in heart transplantation. Thus, all of our pAMR2 cases (C4d positive or negative) and most of our pAMR1 (H+) cases were associated with DSA and with endothelial cell activation markers through the mTOR pathway. Reed and colleagues<sup>25,26</sup> used results from in vitro and experimental studies to hypothesize that immunohistochemical detection of phosphorylated forms of effectors downstream to mTOR should be interesting tools for AMR diagnosis. Indeed, Lepin et al<sup>21</sup> showed that a high level of expression of pS6RP in the capillaries detected by immunohistochemistry was significantly associated with AMR. In the present study, using pS6RP and p70S6K (a kinase upstream to pS6RP) as biomarkers of AMR, we showed that high levels of phosphorylation of both markers in EMB specimens were significantly associated with DSA, MI, CD68, and with grade progression in pAMR classification.

The present study further highlights the value of MI for the diagnosis of cardiac AMR. MI, defined by the presence of mononuclear inflammatory cells within the capillaries, was observed in 12.8% of the biopsy samples of our series. We show here that MI was strongly associated with DSA in heart transplants and has been frequently reported in kidney transplants. It is highly probable that hypercellularity in the peri-myocytic capillaries in the transplanted heart and peritubular capillaritis/glomerulitis in the kidney graft are related to the same pathophysiology and that both reflect the afflux of inflammatory cells within the microcirculation in response to the fixation of alloantibodies to the endothelium. As expected, the endothelial cell activation markers pS6RP and p70S6K were also significantly increased in EMB samples positive for MI.

MI been identified as a major determinant of graft loss in kidney transplantation.<sup>27</sup> In this setting, MI has been clearly



**Figure 5** Incidence of the mammalian target of rapamycin (mTOR) effectors according to antibody-mediated rejection (AMR) markers: microcirculation inflammation (MI), cluster of differentiation (CD) 68, and C4d. (A, B, and C) Phosphorylated 70 S6 kinase (p70S6K) and (D, E, and F) phosphorylated S6 ribosomal protein (pS6RP) are correlated with the markers for AMR. mTOR effector kinases were significantly associated with (A, D) MI and (B, E) CD68 positivity. Proportions were compared with chi-square and Fisher exact tests. (C, F) Both effectors showed a tendency to increase with C4d labeling; however, the small number of biopsy specimens did not allow statistics.



**Figure 6** Incidence of mammalian target of rapamycin effectors according to the pathologic antibody-mediated rejection (pAMR) grade and donor-specific antibody (DSA) positivity. (A and C) Phosphorylated 70 S6 kinase (p70S6K) and (B and D) phosphorylated S6 ribosomal protein (pS6RP) are correlated with (A, B) pAMR grade and (C, D) DSA positivity. Compared with pAMR0 specimens, p70S6K was significantly increased in pAMR1(H+) and pAMR2 specimens, whereas pS6RP was only increased in pAMR2 specimens. Both effectors were significantly associated with DSA positivity. Proportions were compared with chi-square and Fisher exact tests.

associated with ultrastructural features of chronic injury of the microcirculation in early DSA-positive kidney specimens.<sup>28</sup> In heart transplantation, one can hypothesize that repeated MI in protocol biopsy specimens reflects persistent antibody-driven vascular injury that may lead to CAV and graft loss. In fact, our group and others have reported that sub-clinical AMR is associated with CAV progression and a bad outcome.<sup>8,10-12</sup>

An additional important point highlighted by our study is the value and significance of CD68 immunostaining. Because the macrophage has been recognized as the main cell type present in MI,<sup>4</sup> the ISHLT Pathology Task Force has proposed including CD68 staining in the immunohistochemistry panel for the pAMR classification, together with C4d.<sup>15</sup> Our series showed, on the one hand, a high incidence of pAMR1(H+) with MI without CD68 or C4d positivity, but with DSA and expression of mTOR pathway markers, and on the other hand, pAMR2 samples that relied on MI and CD68 staining. Because there is currently no published cutoff for identification of MI and for the positivity of CD68 staining, this study evaluated MI and CD68 according to the last recommendation of the Pathology Task Force at the ISHLT meeting in Prague 2012: MI and CD68 were considered as positive if present in "more than occasional" capillaries and if at least 10% of the capillaries contained CD68-labeled cells. CD68 negativity in pAMR1(H+) cases may be explained by the fact that macrophages are not the sole or the main cell type present in MI, underlining the need for extensive phenotyping of MI cells in further studies.

In conclusion, pAMR classification was evaluated in a non-selected prospective series of protocol EMB specimens and was correlated with DSA and endothelial cell activation markers. Our study confirmed the pertinence of C4d-negative AMR in heart transplantation. Our work also raises the question of the cutoff for the diagnosis of MI and for CD68 positivity and of the place of CD68 immunostaining in pAMR classification.<sup>29,30</sup> However, although our work was prospective, it may be limited by the relatively low number of EMB samples. More studies and experiences from other centers are needed to improve pAMR classification. Molecular studies<sup>31,32</sup> especially would be valuable inputs to better classify these different entities and to better delineate the spectrum of AMR in heart transplantation.

## Disclosure statement

The authors thank the staff from Hôpital Européen Georges-Pompidou, Chantal Mandet, Nicole Pfister, and Sophie Maillard, for technical assistance.

This work was supported by the Agence de la Biomédecine grant 2012 to P.B. A.L. and J.P. D.V.H. are members of the Centaure group.

Part of this study was presented as an oral communication at the Thirty-first Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation, San Diego, California, April 13–16, 2011, and at the Thirty-third Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation, Montreal, Quebec, Canada, April 24–27, 2013.

None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of the presented manuscript or other conflicts of interest to disclose.

## References

- Kobashigawa J, Crespo-Leiro MG, Ensminger SM, et al. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:252-69.
- Kobashigawa J, Mehra M, West L, et al. Report from a consensus conference on the sensitized patient awaiting heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:213-25.
- Reed EF, Demetris AJ, Hammond E, et al. Acute antibody-mediated rejection of cardiac transplants. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:153-9.
- Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1710-20.
- Almuti K, Haythe J, Dwyer E, et al. The changing pattern of humoral rejection in cardiac transplant recipients. *Transplantation* 2007;84:498-503.
- Bayliss J, Bailey M, Leet A, Stein AN, Thomson NM, McLean CA. Late onset antibody-mediated rejection and endothelial localization of vascular endothelial growth factor are associated with development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* 2008;86:991-7.
- Hodges AM, Lyster H, McDermott A, et al. Late antibody-mediated rejection after heart transplantation following the development of de novo donor-specific human leukocyte antigen antibody. *Transplantation* 2012;93:650-6.
- Loupy A, Cazes A, Guillemain R, et al. Very late heart transplant rejection is associated with microcirculation injury, complement deposition and progression to chronic allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2011;21:1478-87.

9. Tan CD, Sokos GG, Pidwell DJ, et al. Correlation of donor-specific antibodies, complement and its regulators with graft dysfunction in cardiac antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2009;9:2075-84.
10. Kfoury AG, Hammond ME, Snow GL, et al. Cardiovascular mortality among heart transplant recipients with asymptomatic antibody-mediated or stable mixed cellular and antibody-mediated rejection. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:781-4.
11. Moseley EL, Atkinson C, Sharples LD, Wallwork J, Goddard MJ. Deposition of C4d and C3d in cardiac transplants: a factor in the development of coronary artery vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:417-23.
12. Wu GW, Kobashigawa JA, Fishbein MC, et al. Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes. *J Heart Lung Transplant* 2009;28:417-22.
13. Rodriguez ER, Tan CD. Pathologic evaluation for antibody-mediated rejection: Prognostic vs diagnostic markers? *J Heart Lung Transplant* 2011;30:136-8.
14. Tan CD, Rodriguez ER. Diagnosis of antibody-mediated rejection in cardiac transplantation: a call for standardization. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15:769-73.
15. Berry GJ. The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005–2011). *J Heart Lung Transplant* 2011;30:601-11.
16. Angelini A, Andersen CB, Bartoloni G, et al. A web-based pilot study of inter-pathologist reproducibility using the ISHLT 2004 working formulation for biopsy diagnosis of cardiac allograft rejection: the European experience. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:1214-20.
17. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2012;12:563-70.
18. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int* 2012;81:628-39.
19. Kucirka LM, Maleszewski JJ, Segev DL, Halushka MK. Survey of North American pathologist practices regarding antibody-mediated rejection in cardiac transplant biopsies. *Cardiovasc Pathol* 2011;20:132-8.
20. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant* 2011;11:56-65.
21. Lepin EJ, Zhang Q, Zhang X, et al. Phosphorylated S6 ribosomal protein: a novel biomarker of antibody-mediated rejection in heart allografts. *Am J Transplant* 2006;6:1560-71.
22. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009;9:2312-23.
23. Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant* 2011;12:313-21.
24. Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant* 2009;10:510-7.
25. Jindra PT, Jin YP, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway. *J Immunol* 2008;180:2357-66.
26. Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009;9:2459-65.
27. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009;9:2520-31.
28. Haas M, Mirocha J. Early ultrastructural changes in renal allografts: correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2011;11:2123-31.
29. Fedrigo M, Gambino A, Benazzi E, et al. Role of morphologic parameters on endomyocardial biopsy to detect sub-clinical antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:1381-8.
30. Fedrigo M, Thiene G, Angelini A. Microvascular injury in very late mixed rejection: a not so easy marker to be identified. *Am J Transplant* 2011;12:262: author reply 263-4.
31. Holweg CT, Potena L, Luikart H, et al. Identification and classification of acute cardiac rejection by intragraft transcriptional profiling. *Circulation* 2011;123:2236-43.
32. Mengel M, Sis B, Kim D, et al. The molecular phenotype of heart transplant biopsies: relationship to histopathological and clinical variables. *Am J Transplant* 2010;10:2105-15.

### III. Discussion

La présente étude évalue la classification pathologique de l'AMR en transplantation cardiaque dans une étude prospective, composée de BEM non sélectionnées sur une période d'un an et bénéficiant d'un dosage DSA concomitant. Cette étude a permis la mise en évidence de l'existence d'une corrélation entre la classification pAMR, la présence de DSA et l'activation endothéliale marquée par la présence des effecteurs de la voie mTOR, pS6RP et P70S6K, au niveau de l'endothélium sur la biopsie. Ces résultats confirment ceux de l'équipe d'E. Reed [46] et mettent en évidence le lien entre l'activation endothéliale, la présence de DSA, les signes histologiques de rejet et la positivité pour les marqueurs de la voie mTOR.

Cette étude a permis de mettre en évidence la faible incidence de la positivité au C4d, la plupart des cas pAMR2 étant MI+ (inflammation microvasculaire) et CD68+. Cet immunomarquage a été intégré dans les dernières working formulations de l'ISHLT mais les cas CD68 négatifs ne sont pas rares, du fait de la présence d'autres types cellulaires impliqués dans l'inflammation microvasculaire, soulignant la nécessité d'un phénotypage plus complet des cellules intravasculaires lors d'études ultérieures. Une étude multicentrique récente coordonnée par l'AECVP a montré l'hétérogénéité des cellules inflammatoires présentes dans la microcirculation, avec une densité équivalente des macrophages CD68+ et de lymphocytes T CD3+. Dans certains cas une richesse en lymphocytes B 20+ et plasmocytes CD138+ peut être observée [110].

Cette étude met aussi en lumière la valeur de l'inflammation microvasculaire pour le diagnostic de l'AMR. L'inflammation microvasculaire, définie par la présence de cellules inflammatoires mononucléaires dans les capillaires, a été observée chez 12,8% des biopsies de notre série. Dans chacun de ces cas, elle était fortement associée à la présence de DSA, reflétant ainsi un possible afflux de cellules inflammatoires au sein de la microcirculation, en réponse à la fixation des allo-anticorps à l'endothélium. Les marqueurs d'activation endothéliale pS6RP et p70S6K étaient également augmentés de manière significative dans les biopsies MI

positifs et ce, en présence ou en absence d'une positivité pour le C4d. **Les cas C4d négatifs étaient positifs pour l'activation de la voie mTOR**, mettant en question la validité du C4d en tant que biomarqueur tissulaire du rejet humoral. Les entités C4d négatives ont récemment été reconnues en transplantation rénale mais restent sujettes à discussion en transplantation cardiaque [8, 9]. La négativité du C4d semble avoir plusieurs causes potentielles, entre autre un manque relatif de sensibilité de l'anticorps C4d, l'implication d'anticorps avec une affinité faible ou nulle à fixer le complément ou encore l'existence d'une voie d'activation par les anticorps indépendante du complément. Ainsi, bien qu'utile, le marquage C4d reste un indicateur de gravité intéressant mais non nécessaire au diagnostic de rejet humoral [8].

Ces corrélations posent la question de la classification pAMR et de sa relevance en terme de pronostic. En effet, les DSA ne sont pas pris en compte dans cette classification bien que leur effet délétère à court et long terme ait été prouvé à maintes reprises [27, 38, 102, 107]. De même, le C4d reste un *gold standard* pour le diagnostic de rejet humoral, bien que son absence soit avérée dans beaucoup de cas positifs pour l'inflammation microvasculaire. On peut ainsi émettre l'hypothèse que la présence répétée et persistante de l'inflammation microvasculaire reflète les lésions vasculaires médiées par les anticorps qui peuvent conduire à la vasculopathie d'allogreffe et la perte du greffon [111]. De fait, notre groupe, et d'autres, ont à plusieurs reprises rapporté que l'AMR infra-clinique, en présence de DSA, était associée à la progression de la vasculopathie d'allogreffe et à un mauvais pronostic [1, 22].

Enfin, cette étude émet la possibilité de la mise en place d'une détection de routine pour l'activation de la voie mTOR. En effet, les marqueurs de la voie mTOR, pS6RP et P70S6K semblent être de bons marqueurs de l'activation endothéliale médiée par les anticorps. Néanmoins, le manque de sensibilité pour pS6RP (peu de cas positifs) et de spécificité pour P70S6K (cas positifs sans autres signes histologiques) sont à prendre en compte et à affiner lors d'une pratique courante. De plus, le cut-off établi par Lepin et al. dans la gradation de 0 à 4 pour la positivité des effecteurs de la voie mTOR reste à confirmer.

Bien que notre étude ait été prospective, elle est probablement limitée par le faible nombre de BEM issue d'un seul centre et d'autres études multi-centriques seront nécessaires pour améliorer la classification pAMR et potentiellement intégrer le marquage de la voie mTOR à la pratique de routine.

## **IV. Conclusion et Perspectives**

En conclusion, la classification pAMR a été corrélée avec les DSA et des marqueurs d'activation endothéliale. Notre étude a confirmé la pertinence des entités C4d négatives et soulève l'intérêt de la voie mTOR comme marqueur de l'activation endothéliale observée lors des rejets humoraux.

En collaboration avec l'équipe du Pr. P. Halloran de l'Université d'Alberta, dont les précédentes études ont identifié des scores (PBT) basés sur les transcrits dérégulés lors des microarrays effectués sur des cohortes de biopsies rénales [83], nous avons étudié les signatures moléculaires des patients présentant un rejet et commencé des études de corrélation pour tenter de mieux classer ces différentes entités et de mieux délimiter le spectre du rejet humoral en transplantation cardiaque.

Au sein de l'équipe, nous avons débuté une étude ancillaire visant à déterminer l'expression de gènes spécifiques des phénomènes de rejet, cellulaire ou humoral et de corréler cette expression aux gradings de la voie mTOR en immunohistochimie.

En se basant sur les études de nos collaborateurs, nous avons décidé d'explorer les signatures moléculaires des biopsies cardiaques présentant un AMR et/ou un ACR et avons établi de nouveaux scores : DSAST (DSA selective transcripts, [45]), NKB (Natural Killer cell Burden) et TCB (T Cell Burden).

Les résultats préliminaires de ces analyses sont encourageants et il semble exister une corrélation entre l'activation de la voie mTOR et les scores établis grâce aux analyses microarrays.

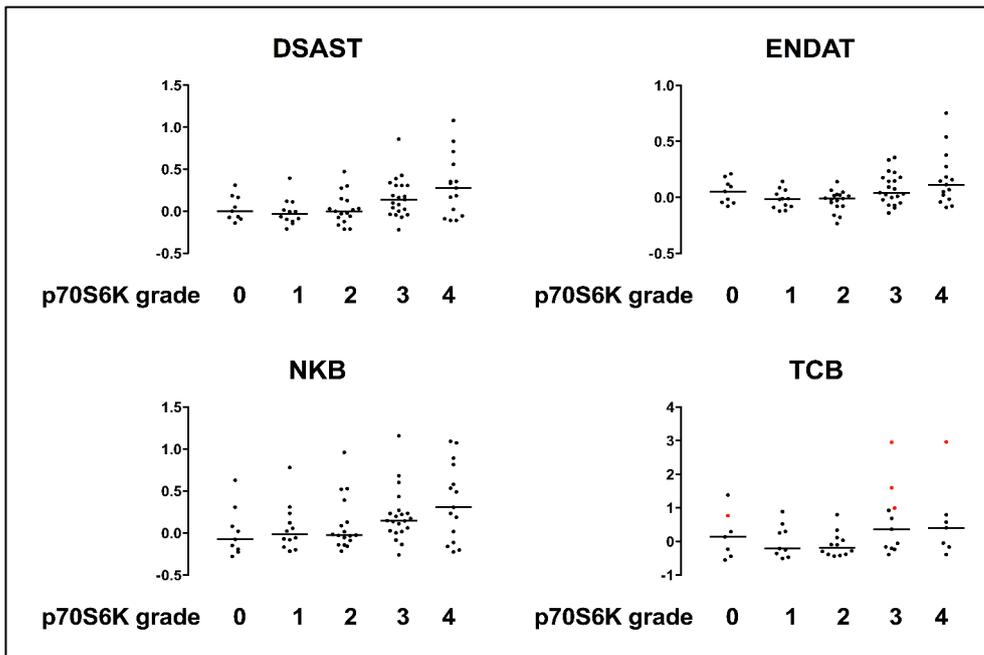


Figure 12. Corrélation des scores DSAST, ENDAT, NKB et TCB avec les grades de positivité P70S6K.

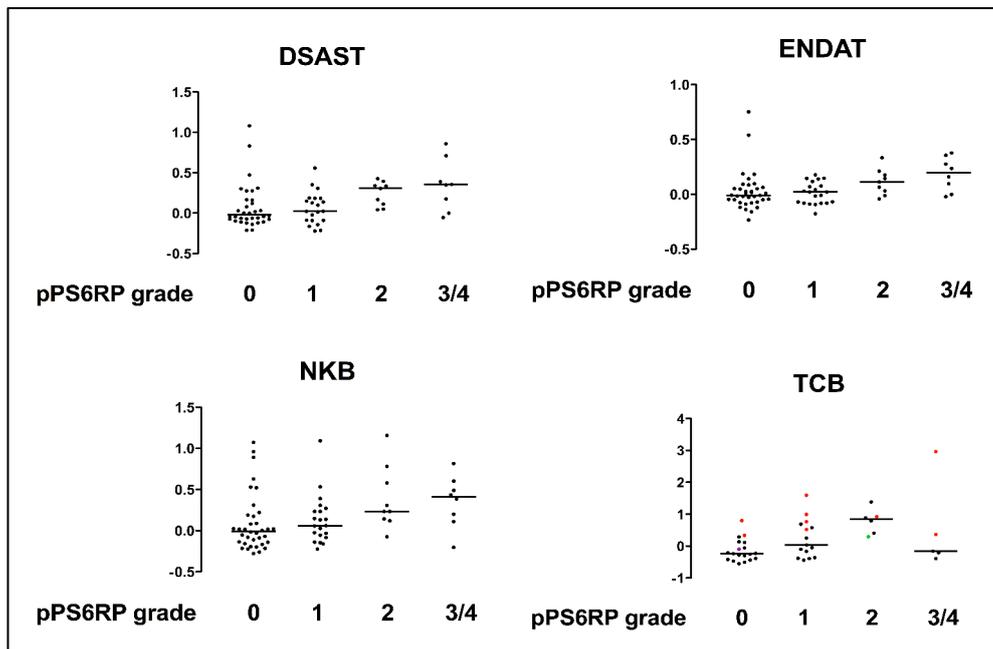


Figure 13. Corrélation des scores DSAST, ENDAT, NKB et TCB avec les grades de positivité pS6RP.

Ces analyses corroborent le système de gradation utilisé lors de notre étude de l'activation de la voie mTOR : on remarque un décrochage des scores pour les grades 3-4 et une relative stabilité de l'expression des transcrits pour les scores 0-2. Ces premiers résultats permettent également la mise en évidence d'une relation entre la présence des cellules inflammatoires (scores NKB/TCB) et la positivité de la voie mTOR, renforçant ainsi l'importance de l'inflammation microvasculaire dans l'AMR et l'importance des autres types cellulaires (en-dehors des macrophages) dans la mise en place des phénomènes de rejet.

Enfin, la corrélation entre les scores ENDATs/DSAST et la positivité de la voie mTOR appuie le rôle des allo-anticorps dans le rejet humoral et l'activation endothéliale. Ces corrélations appuient également la relation entre l'activation de la voie mTOR et l'activation endothéliale au niveau moléculaire.

Bien que très préliminaires et nécessitant une étude plus approfondie, ces premiers résultats mettent bien en évidence l'importance de l'activation de la voie mTOR dans la mise en place du rejet en transplantation cardiaque, valident le système de gradation établi lors de nos précédents travaux et renforcent l'intérêt d'une implémentation du suivi biopsique avec des marqueurs de la voie mTOR.

## **Partie II: Les microARNs comme biomarqueurs du rejet**

## I. miARNs et physiopathologie cardiaque

Plusieurs stimuli inflammatoires sont capables de réguler l'expression des miARNs. Certains miARNs ont une spécificité cellulaire, en particulier dans les cellules endothéliales. Ils participent à la régulation de nombreuses fonctions endothéliales comme l'angiogénèse, la prolifération et la migration, la perméabilité ou la réponse à l'inflammation.

L'identification de miARNs spécifiques, ou préférentiellement exprimés dans l'endothélium, a principalement été acquise à partir de travaux dans le domaine de la cancérologie. Certains miARNs ont été mis en évidence dans les cultures de cellules endothéliales, HUVECs, de cellules endothéliales artérielles ou issues de la microcirculation. Ces miARNs endothéliaux ont des fonctions de contrôle de la prolifération et de la migration cellulaire, de l'angiogénèse mais aussi l'activation endothéliale. Par exemple, miR-126 module l'expression de VCAM [112]; miR-21, modulé par le stress mécanique [113, 114], est considéré comme un garant de l'intégrité vasculaire.

Ren et al. [115] ont étudié les profils d'expressions des miARN dans les plasmas des patients atteints de maladies coronariennes. Ils ont mis en évidence une signature miARNs composée de deux clusters (miR-106b/25 et 17-92a) et de miARNs individuels (126, 451, 21 et 590-5p) régulés à la hausse chez les patients coronariens par rapport aux patients souffrant d'angor stable ou de douleur thoracique non cardiaque. Parmi ces miARNs surexprimés, aucun miARN cardiomyocytaire n'était dérégulé mais plusieurs miARNs vasculaires et inflammatoires ont été associés à la pathologie coronarienne.

Dans l'athérosclérose et l'activation plaquettaire, d'autres études se sont intéressées à la dérégulation des miARNs. Les recherches de Willeit et al. [116] et de Nazari-Jahantigh et al. [117, 118] ont révélé l'importance des miARNs inflammatoires tels que miR-155 et 146a, et des miARNs endothéliaux, tel que miR-126, dans de tels processus. L'infarctus du myocarde est également l'une des pathologies les plus étudiées. Gidlof et al. [119] ont testé les prélèvements sanguins suivant un pontage

coronarien et la dérégulation de miR-208b et miR-499-5p soutient l'idée que ces miARNs sont issus du myocarde.

L'importance des miARNs circulants dans l'aide au diagnostic de maladies cardiovasculaires a notamment été abordé par Quiat & Olson [120] qui se sont intéressés à l'hypertension (miR-143/145), à l'hyperlipidémie (miR-33a/b, 122), à l'obésité (miR-375, 103, 107), à l'athérosclérose (miR-33, 145, 143, 126), à l'ischémie (miR-499), au remodelage cardiaque (miR-21, 208a/b, 499) et à la régénération cardiaque (famille des miR-15).

Fichtlesher et al. [121, 122] se sont demandés si les miARNs circulants, en plus de leur valeur diagnostique, avaient aussi un rôle de médiateurs dans les maladies cardiovasculaires. Ils pourraient, en effet, agir via des signaux longue distance mais, pour cela, ils doivent être protégés de la dégradation. Les miARNs sont détectés dans le sérum ou le plasma sous une forme remarquablement stable, grâce, entres autres, à leurs modes de transport.

Les miARNs peuvent être stockés dans des vésicules lipidiques de différents types. Les microvésicules/microparticules sont éliminées de la membrane cellulaire de presque tous les types de cellules dans des conditions physiologiques et pathologiques et sont relativement grandes (100 nm à 1 µm). Les exosomes sont, quant à eux, de petits fragments de membrane (30 à 100 nm) dérivant du compartiment endosomique. Enfin, les corps apoptotiques, plus grands (jusqu'à 4 µm), sont libérés lorsque les cellules meurent par apoptose. Plusieurs groupes ont rapporté que les miARNs sont activement sécrétés par une variété de cellules *in vitro*, soit dans des exosomes, soit au sein de microvésicules [123].

Partant de ce constat, on peut émettre l'hypothèse que les miARNs circulants peuvent agir comme des régulateurs de l'expression génique à distance de leur lieu de synthèse. En effet, les ARN extracellulaires peuvent être absorbés par les cellules et plusieurs études suggèrent que des microvésicules sécrétées pourraient transférer les miARNs à une cellule réceptrice et réguler l'expression d'un gène cible dans cette même cellule. Ainsi, il a été prouvé *in vitro* que les microvésicules issues de cellules endothéliales en souffrance contiennent des niveaux élevés de miR-126, et que ce miARN était capable de réguler des gènes cibles dans des cellules endothéliales adjacentes co-cultivées.

## II. miARNs spécifiques de la pathologie du rejet

### A. Les études miARNs en transplantation

En transplantation d'organe solide, plusieurs études ont souligné l'intérêt de l'étude de la modulation, principalement tissulaire, de certains miARNs dans diverses situations au cours de la greffe : rejet cellulaire rénal, rejet intestinal, récurrence de l'hépatite C sur le greffon hépatique... De manière intéressante, dans une lettre au JHLT, une équipe rapporte les résultats d'une étude très préliminaire avec une évaluation d'une dizaine de miARNs circulants en transplantation cardiaque [124].

En greffe rénale, Anglicheau et al. [125] ont examiné la possibilité d'une association entre rejet aigu et altérations de l'expression des miARNs. Sept biopsies parmi 33 (12 en rejet et 21 normales) ont été profilées en utilisant des cartes pangénomiques microfluidiques et un sous-ensemble des miARNs exprimés de manière différentielle lors de cette première analyse a été quantifié dans les 26 biopsies restantes. Leur étude a ensuite porté sur l'expression de ces miARNs dans les PBMC et a montré que les miARNs 142-5p, 155 et 223 étaient surexprimés chez les patients en cours de rejet. En parallèle, ils ont quantifié les miARNs dans des cultures primaires de cellules épithéliales rénales humaines (HREC) et ont montré que miR-30a-3p,-10b, et let-7c étaient fortement exprimés.

En transplantation hépatique, Wei et al. [126] ont écrit une revue faisant part des différents miARNs dérégulés lors des processus pathologiques associés à la greffe. Ainsi, lors du rejet, 28 miARNs étaient fortement dérégulés, dont la baisse de miR-31 et l'augmentation de miR-142-3p. Dans les phénomènes infectieux, miR-155 était également régulé à la hausse dans les sérums des patients atteints d'hépatite C. Hu et al. [127] se sont également intéressés au rejet en transplantation hépatique. En utilisant un modèle de greffe orthotopique chez le rat, ils ont comparé les niveaux d'expression des miARNs dans le plasma. Ils ont ainsi constaté que miR-122, miR-

192 et miR-146a était significativement régulée à la hausse dans les rejets aigus et que cette hausse était sensible à l'immunosuppression.

En transplantation intestinale, Sotolongo et al. [128] ont étudié les miARNs dans le rejet cellulaire aigu, au niveau tissulaire. Ils ont examiné 12 biopsies de muqueuse intestinale, 7 rejets et 5 contrôles, ont extrait l'ARN et ont réalisé des analyses en TLDA (*TaqMan Low Density Array*, contenant 365 miARN humains matures). Ils ont ainsi identifié 62 miARNs régulés à la hausse et 35 régulés à la baisse, dont miR-155 et miR-142, également retrouvés dans les autres greffes d'organes solides. La même équipe a par la suite validé ces résultats [129], confirmant miR-142-3p parmi les miARNs dérégulés lors du rejet.

## **B. Les miARNs circulants dans les processus associés au rejet**

Très récemment, des formes circulantes, au sein de vésicules lipidiques plasmatiques, de certains de ces miARNs ont été identifiées en pathologie vasculaire et cardiaque. Une variation quantitative de ces miARNs circulants a été directement corrélée à des situations pathologiques chez l'homme, telle que le diabète ou la maladie coronarienne. Une signature plasmatique a été mise en évidence chez les patients diabétiques, incluant une réduction de miR-126 [130]. De manière similaire, il existe une réduction du taux circulant de miR-126, et des miARNs du cluster 17-92a chez les patients présentant une maladie coronarienne [115]. Ces résultats suggèrent que les miARNs vasculaires circulants sont de bons biomarqueurs périphériques en pathologie humaine.

### **1. miARNs endothéliaux**

Les miARNs endothéliaux semblent être de bons biomarqueurs potentiels de l'activation endothéliale et l'inflammation microvasculaire observable dans le rejet humoral.

**MiR-126** est un miARN majoritairement endothélial dont les cibles et les rôles variés en font un biomarqueur de la dysfonction endothéliale et des voies de signalisation impliquées dans l'adhésion, la division et la multiplication des cellules endothéliales. Fish et al. [131] ont démontré l'interaction de miR-126 avec la voie de signalisation VEGF dépendante de la PI3K et des MAP kinases : la diminution de miR-126 dans les cellules endothéliales entraînent une perte de l'intégrité vasculaire, avec des hémorragies et une mort embryonnaire. Partant de ces résultats, l'équipe a déterminé que miR-126 jouait un rôle d'inhibiteur de répresseurs de la voie du VEGF, dont la PI3K et SPRED1 (Sprouty-related Protein1), tous deux impliqués dans l'angiogenèse. Harris et al. [132] ont, quant à eux, prouvé l'interaction de VCAM1 et de miR-126. Se basant sur des analyses *in silico* (TargetScan, miRBase) indiquant que VCAM1 avait plusieurs séquences similaires avec miR-126 (région 3'UTR de VCAM1 et une dizaine de nucléotide entre les bases 604 et 617 de VCAM1) ils ont supposé que VCAM1 était une cible potentielle de miR-126 et ont l'ont prouvé dans leur publication de 2008. Des études comme celles de Zampetaki et al.[98] portant sur l'exploration plasmatique de miARNs dans le cadre l'infarctus du myocarde, ont prouvé que miR-126 était significativement associé au risque d'infarctus.

**Le cluster polycistronique 17-92a** code pour 7 miARNs matures : miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, miR-92a. Ces miARNs sont majoritairement exprimés dans les cellules endothéliales et régulent l'angiogénèse. Plus particulièrement, Bonauer et al. [133] ont montré que la présence de miR-92a dans les cellules endothéliales supprimait l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo*. La surexpression de miR-92a vise les intégrines  $\alpha 5$  (ITGa5), S1P1 (sphingosine-1-phosphate receptor 1), MKK4 (mitogen-activated kinase kinase 4) et eNOS (endothelial NO-synthase). Loyer et al. [134] ont étudié les profils d'expression des miARNs dans des cultures d'HUVECs et ont identifié miR-92a comme un atheromiR, dont l'expression était up-réglée dans des conditions de faible contrainte de cisaillement. Chez les souris LDLR  $-/-$ , l'expression de miR- 92a était nettement augmentée par l'hypercholestérolémie, en particulier dans les zones de atherosensible de l'aorte. L'évaluation de l'inflammation endothéliale lors d'expériences de gain/perte de fonction a révélé que miR- 92a permettait l'activation des cellules

endothéliales, plus particulièrement dans des conditions de cisaillement bas, et ce, associé à la modulation du facteur Kruppel -like 2 (KLF2), Kruppel -like 4 (KLF4) et le suppresseur de signalisation cytokinique 5. De surcroit, un blocage spécifique de l'expression de miR-92a *in vivo* chez les souris LDLR *-/-* réduisait l'inflammation endothéliale et le développement d'athérosclérose.

**MiR-10a** est un miARN impliqué dans les phénomènes inflammatoires au niveau de l'endothélium. Fang et al. [135] ont indiqué que miR-10a pouvait inhiber le phénotype pro-inflammatoire de l'endothélium athéro-sensible via une diminution de la voie de signalisation NFκB. Ces résultats ont été confirmés par le knockdown de miR-10a qui conduit à l'activation de la transduction dépendante de NFκB et à l'élévation des marqueurs pro-inflammatoires MCP -1, IL -6, IL -8, VCAM -1 et SELE au sein des cellules endothéliales aortiques humaines. Inversement, le knockin de miR-10a inhibe l'expression basale de VCAM-1 et SELE. De plus, des études comparatives des gènes présents dans l'endothélium de patients athéro-sensibles a identifié une forte régulation de MAP3K7, BTRC et de la protéine nucléaire p65, suggérant que l'expression différentielle de miR-10a contribue à la régulation des phénotypes endothéliaux pro-inflammatoires dans les régions athéro-sensibles *in vivo*.

En-dehors de cette étude, très peu d'équipes se sont intéressées à miR-10a dans la pathologie cardiaque et plus particulièrement aux mécanismes d'inflammation et d'activation endothéliale.

**MiR-296** est un miARN impliqué majoritairement dans l'angiogénèse, relativement peu étudié [136, 137]. Wang et Olson [138] ont étudié les angio-miRs, en particulier miR-296 dans un modèle animal KO pour DICER dans les cellules endothéliales : miARN-126, réglementait l'intégrité vasculaire et l'angiogénèse développement. MiR-296 et le cluster 17-92a, contribuaient à l'angiogénèse tumorale. En transplantation rénale, Cantaluppi et al. [139] ont démontré son effet bénéfique lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion grâce à une augmentation de la néovascularisation et à une reprogrammation locale des cellules rénales résidentes.

**MiR-21** est un miARN quasi-ubiquitaire, retrouvé majoritairement dans les cellules endothéliales et les fibroblastes [140, 141]. Weber et al [114] ont étudié son

expression dans les conditions de stress endothélial, en particulier le shear stress, jouant un rôle important dans la régulation de la signalisation vasculaire et l'expression des gènes dans les cellules endothéliales. Ils ont déterminé le profil d'expression des miARNs dans les cellules endothéliales soumises à une contrainte de cisaillement unidirectionnel et ont défini le rôle de miR-21 dans les changements induits par ce stress. MiR-21 était augmenté de 5,2 fois ( $p = 0,002$ ) par rapport à des cellules témoins et les cellules surexprimant miR-21 présentaient une baisse de l'apoptose et une augmentation de la phosphorylation de eNOS.

Jin et al. [141] ont exploré la relation entre miR-21 et le traitement par la rapamycine des cellules endothéliales. Ils ont découvert une augmentation de miR-21 dans les cellules traitées et ont prouvé que RhoB était sa cible directe. De manière intéressante le knockdown de Raptor imitait les effets de la rapamycine sur l'expression de miR-21, suggérant une interaction entre la voie mTOR et miR-21.

Ma et al. [142] ont étudié les miARNs impliqués dans la régulation de la signalisation induite par NF- $\kappa$ B dans plusieurs pathologies, en particulier le cancer. Ils ont ainsi mis en évidence le rôle de miR-21 et miR-155 dans l'inflammation et leur impact sur la tumorigenèse. De multiples études ont également fait le lien entre l'expression sérique de miR-21 et les pathologies cardiovasculaires, telles que l'infarctus, les maladies coronaires ou le remodelage cardiaque [140, 143-145]

## 2. miARNs inflammatoires

L'inflammation va à la fois entraîner des phénomènes tardifs de fibrose et engendrer un stress oxydatif (dysfonctionnement de la mitochondrie, découplage de la NO synthase endothéliale, polynucléaires neutrophiles). Le stress oxydatif et les troubles ioniques vont entraîner une libération de nombreuses cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 et IL-18...) à la fois par les cardiomyocytes alentour mais aussi par les leucocytes infiltrant le tissu. Des chémokines telles que SDF1 et MCP-1 vont aussi être libérées par les cardiomyocytes permettant le recrutement de cellules comme les monocytes [15]. HIF-1 $\alpha$  va également jouer un rôle dans l'expression de molécules inflammatoires [146].

**MiR-155** est largement exprimé dans divers tissus et est considéré comme un

oncomiR, du fait de sa localisation et de sa surexpression dans les cancers [147, 148]. Cependant, miR-155 est également exprimé dans d'autres types cellulaires normaux, en particulier les cellules inflammatoires, et présente différentes fonctions dépendantes du tissu dans lequel il se trouve.

Ainsi, les rôles principaux de miR-155 semblent être inflammatoire et immunitaire. Lind et Ohashi [149] ont décrit plusieurs des fonctions inflammatoires de miR-155 en 2010. L'activation du T-Cell receptor (TCR) induit l'expression de miR-155 dans les lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs. Les lymphocytes ainsi activés sont ensuite différenciés en lymphocytes Th1 grâce à l'action de miR-155 qui réprime l'expression du facteur de transcription c-Maf et de la sous-unité 1 du récepteur à l'IFN $\gamma$ . Dans les lymphocytes B et après induction de miR-155 par stimulation au LPS ou à l'IL-4, il contribue au changement de classe des Ig en réprimant l'expression du facteur de transcription Pu.1 et de la phosphatidylinositol 5'-phosphatase SHIP1. Enfin, lors de la différenciation des cellules dendritiques immatures en cellules dendritiques matures et après stimulation par les TLR, miR-155 induit la répression DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) via la répression de Pu.1, promulguant ainsi la phagocytose chez les cellules dendritiques immatures.

Plusieurs équipes ont montré que des souris déficientes en miR-155 (miR-155<sup>-/-</sup>) avaient une réponse immunitaire très diminuée, notamment au niveau des lymphocytes B [150]. Ainsi, l'implication de miR-155 dans des cellules du système immunitaire et la modification de son expression dans des processus pathologiques, souvent inflammatoires, ont été largement étudiées. Stanczyk et al. [151] ont ainsi montré que l'expression de miR-155 peut être augmentée dans des fibroblastes de la synovie de patients atteints d'arthrite rhumatoïde par différents stimuli pro-inflammatoires dont le TNF $\alpha$  et le LPS. O'Connell et al. [152] ont confirmé que l'expression de miR-155 était augmentée par la stimulation par l'INF $\alpha$  et le TNF $\alpha$ , ainsi que par l'activation du TLR.

En parallèle, Trotta et al. [153] ont démontré que non seulement miR-155 augmente la synthèse et la maturation des cellules NK mais il augmente aussi la cytotoxicité de ces cellules et leur synthèse d'INF $\alpha$ , entretenant ainsi l'activation de miR-155 par une boucle de stimulation. Liu et al. [154] ont montré que miR-155 pouvait diminuer la nécrose via la répression de RIP1, soulignant un rôle important dans l'inflammation et la mort cellulaire.

Bien que de nombreuses cibles aient été prédites in silico, seules quelques cibles avérées de miR-155 ont été décrites et le fonctionnement de ce miARN reste à approfondir.

**MiR-451** est également un miARN inflammatoire mais son rôle est plus flou, souvent associé à la prolifération cellulaire [155, 156] en particulier dans les cancers solides. Morandi et Pistola [157] l'ont étudié dans des cellules T CD4 + activées en culture en présence ou en absence de HLA-G soluble (sHLA-G). Ils ont observé une diminution de l'expression de miR-451 dans les cellules traitées et que cette modulation n'était pas liée à l'inhibition de la prolifération et de l'expression de CXCR3 par sHLA-G. Ils ont également étudié l'expression de gènes cibles de miR-451 dans des cellules T CD4 + activées, traitées ou non avec du sHLA-G, et ont observé une augmentation de l'expression de RAP-1 (facteur de transcription à boîte HMG 1) et une diminution de l'expression de CXCL16 (chimiokine CXC motif ligand 16). MiR-451 semble également impliqué dans la régulation de DICER et Ago2 et donc, de la synthèse des miARNs [158, 159]

**MiR-142-3p** est un miARN inflammatoire dont les rôles restent peu connus. Scian et al. [160]. l'ont mis en évidence dans le rejet d'allogreffe rénale, par analyse microarray des urines de patients présentant un rejet. Il faisait partie d'un set de cinq miARNs dont l'expression était dérégulée dans l'analyse microarray et a été validée par qPCR dans une cohorte de validation. Danger et al. [161] ont étudié, en transplantation rénale, les mécanismes par lesquels certains receveurs peuvent atteindre la tolérance opérationnelle et ont comparé les profils d'expression de microARNs dans les PBMC de patients tolérants avec ceux de patients stables. L'expression de miR-142-3p était augmentée de manière stable, non modulée par l'immunosuppression. Leurs résultats suggéraient également l'existence d'une boucle de rétrocontrôle négatif impliquant le TGF- $\beta$ .

**MiR-181** est un miARN de jonction. Son rôle a été étudié dans l'inflammation, en particulier dans la signalisation NF- $\kappa$ B [142]. Sun et al. [162, 163] ont étudié son rôle dans l'activation et la dysfonction des cellules endothéliales où miR-181 sert de régulateur de la signalisation en aval de NF- $\kappa$ B, en ciblant l'importine  $\alpha$ 3. MiR-181 régulait également indirectement les molécules d'adhésion VCAM-1 et E-sélectine.

### 3. miARNs cardiomyocytaires et fibroblastiques

La fibrose est l'augmentation de composants de la matrice extracellulaire remplaçant le parenchyme fonctionnel d'un tissu. Elle conduit à une diminution de l'activité fonctionnelle de celui-ci et fait souvent suite à des processus inflammatoires et immunitaires. La plupart des cellules immunitaires jouant un rôle dans l'inflammation sont également inductrices de fibrose. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence que les lymphocytes T CD4+, CD8+, les macrophages et les cellules dendritiques participent à l'initiation de la fibrose et que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B permet son amélioration [5, 13, 164]

Les cytokines et les chémokines jouent un rôle central dans la transmission du signal qui semble en grande partie médiée de façon paracrine. En effet, les foyers de fibrose cardiaque sont souvent en périphérie de vaisseaux sanguins où l'activation des cellules endothéliales peut créer un microenvironnement inflammatoire propice. Les chémokines vont permettre le recrutement de leucocytes libérant des facteurs profibrosants, de précurseurs circulants de fibroblastes et de fibroblastes déjà présents *in situ* et vont pouvoir moduler l'angiogenèse [165]. La sécrétion de cytokines va entraîner la prolifération et l'activation des fibroblastes.

Suarez et al. [166] ont décrit les rôles de **miR-31** dans la régulation de l'expression de E-selectine et d'ICAM1, induite par la voie du TNF dans les cellules endothéliales. De manière intéressante, ils prouvent que l'expression de miR-31 est induite par le TNF et qu'un feedback négatif se met en place grâce à la régulation par miR-31 des signaux pro-inflammatoires. Ainsi, l'expression augmentée de miR-31, dans des circonstances inflammatoires, entraîne une baisse de sécrétion d'ICAM1 et diminue ainsi l'affinité des cellules circulantes pour l'endothélium.

Chen et al. [167] ont, quant à eux, étudié la régulation des intégrines par les miARNs, décrivant miR-31 comme un régulateur important des sous-unités  $\alpha$ 2 (fixation aux domaines RGD de la fibronectine et d'autres intégrines),  $\alpha$ 5 (reconnaissance du collagène) et  $\beta$ 1 (sous-unité la plus retrouvée dans les hétérodimères), indiquant ainsi un rôle majeur de miR-31 dans la régulation de l'adhésion inter/intra-cellulaire.

**MiR-208a** est un miARN dérivé des cardiomyocytes. Ji et al. [168] ont évalué son rôle dans le sérum de rats présentant une lésion myocardique induite par l'isoproténérol et ont noté une augmentation significative de son expression. La troponine cardiaque plasmatique I (cTnI) a été mesurée en parallèle par ELISA miR-208 évoluait de manière similaire à cTnI, un biomarqueur classique de lésion myocardique. Montgomery et al. [169] se sont intéressés à son rôle dans la dysfonction diastolique en réponse à l'hypertrophie et ont démontré que l'inhibition thérapeutique de miR-208a par un antimiR-208a pendant l'insuffisance cardiaque empêche le remodelage cardiaque en diminuant le switch de la myosine et ce, de manière dose-dépendante. Fichtlscherer, et al. [121] ont évalué l'expression des miARNs de la circulation chez les patients atteints de maladie coronarienne stable dans une cohorte case-control (8 vs 8) puis dans une cohorte sélectionnée de 36 patients et de 17 volontaires sains. MiR-208a avait tendance à être plus élevé chez les patients atteints de la maladie de l'artère coronaire. D'autres études ont parcouru le rôle de miR-208a dans les phénomènes aigus d'atteinte coronarienne ou myocardique [170-172].

**MiR-182** est également dérégulé dans les maladies coronariennes [173]. Wei et al [174] ont examiné l'expression des miARNs dans un modèle de transplantation cardiaque hétérotopique par microarray et un profil unique a été détecté dans le rejet des greffes allogéniques par rapport à transplantés syngéniques. MiR-182 était augmenté de façon significative dans les cellules mononucléées infiltrantes, dans le tissu myocardique et le plasma. Les protéines FOX, une famille de facteurs de transcription, étaient également régulées, dont FOXO1, cible de miR-182. FOXO1 était ainsi diminué à la fois des cardiomyocytes et des cellules T CD3 +.

Notre équipe s'est basée sur ces données de la littérature pour établir une liste de miARNs dont l'action pourrait être en lien avec un mécanisme de rejet tant cellulaire que humoral. Nous avons sélectionné des miARNs majoritairement endothéliaux : mir-92a, miR-126, miR-296 et miR-10a, dont l'expression a été démontrée comme variable dans les situations d'activation endothéliale, phénomène que l'on observe dans les rejets humoraux. Nous avons également sélectionné des miARNs inflammatoires : miR-451, miR-142-3p, miR-181 et miR-155, dont l'action est liée à la présence de cellules inflammatoires dans le tissu, situation proche d'un rejet

cellulaire (lymphocytes T) et/ou humoral (lymphocytes B, macrophages). Enfin, nous avons sélectionné des miARNs majoritairement cardiomyocytaires/fibroblastiques : miR-208, miR-31, miR-21 et miR-182, qui apparaissaient comme modulés dans des conditions de remodelage cardiovasculaire. Le principal intérêt de ces miARNs est qu'ils existent également en périphérie (sérum).

Nous avons suivi leur expression par qPCR dans le tissu, puis dans le sérum, de patients en cours de rejet (cellulaire ou humoral) et corrélié ces résultats à l'incidence du rejet et la survenue de DSA au sein d'une cohorte de type case-control de transplantés cardiaques.



## MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection

Jean-Paul Duong Van Huyen<sup>1,2,3†\*</sup>, Marion Tible<sup>1,2‡</sup>, Arnaud Gay<sup>4</sup>, Romain Guillemain<sup>5</sup>, Olivier Aubert<sup>1</sup>, Shaïda Varnous<sup>6</sup>, Franck Iserin<sup>7</sup>, Philippe Rouvier<sup>6</sup>, Arnaud François<sup>4</sup>, Dewi Vernerey<sup>1</sup>, Xavier Loyer<sup>1</sup>, Pascal Leprince<sup>6</sup>, Jean-Philippe Empana<sup>1</sup>, Patrick Bruneval<sup>1,2,5</sup>, Alexandre Loupy<sup>1,2‡</sup>, and Xavier Jouven<sup>1,2‡</sup>

<sup>1</sup>Paris Translational Research Center for Organ Transplantation, INSERM UMR 970, Biostatistics and Histopathology Platform, PARCC Cardiovascular Research Institute, Paris F-75015, France; <sup>2</sup>Université Sorbonne Paris Cité, France; <sup>3</sup>Department of Pathology, Necker Hospital, APHP, Paris F-75015, France; <sup>4</sup>Cardio-Thoracic Surgery Unit and Pathology Department, Rouen University Hospital, France; <sup>5</sup>Department of Pathology and Department of Cardiovascular Surgery, Hôpital Européen Georges Pompidou, APHP, Paris F-75015, France; <sup>6</sup>Cardio-Thoracic Surgery Unit and Pathology Department, La Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris F-75013, France; and <sup>7</sup>Department of Cardiology, Necker Hospital, APHP, Paris F-75015, France

Received 10 July 2014; revised 31 July 2014; accepted 5 August 2014

### Aim

Rejection is one of the major causes of late cardiac allograft failure and at present can only be diagnosed by invasive endomyocardial biopsies. We sought to determine whether microRNA profiling could serve as a non-invasive biomarker of cardiac allograft rejection.

### Methods

We included 113 heart transplant recipients from four referral French institutions (test cohort,  $n = 60$ , validation cohort,  $n = 53$ ). In the test cohort, we compared patients with acute biopsy-proven allograft rejection ( $n = 30$ ) to matched control patients without rejection ( $n = 30$ ), by assessing microRNAs expression in the heart allograft tissue and patients concomitant serum using RNA extraction and qPCR analysis. Fourteen miRNAs were selected on the basis of their implication in allograft rejection, endothelial activation, and inflammation and tissue specificity.

### Results

We identified seven miRNAs that were differentially expressed between normal and rejecting heart allografts: miR-10a, miR-21, miR-31, miR-92a, miR-142-3p, miR-155, and miR-451 ( $P < 0.0001$  for all comparisons). Four out of seven miRNAs also showed differential serological expression (miR-10a, miR-31, miR-92a, and miR-155) with strong correlation with their tissular expression. The receiver-operating characteristic analysis showed that these four circulating miRNAs strongly discriminated patients with allograft rejection from patients without rejection: miR-10a (AUC = 0.975), miR-31 (AUC = 0.932), miR-92a (AUC = 0.989), and miR-155 (AUC = 0.998,  $P < 0.0001$  for all comparisons). We confirmed in the external validation set that these four miRNAs highly discriminated patients with rejection from those without. The discrimination capability of the four miRNAs remained significant when stratified by rejection diagnosis (T-cell-mediated rejection or antibody-mediated rejection) and time post-transplant.

### Conclusion

This study demonstrates that a differential expression of miRNA occurs in rejecting allograft patients, not only at the tissue level but also in the serum, suggesting their potential relevance as non-invasive biomarkers in heart transplant rejection.

### Keywords

Transplant rejection • Biomarker • MicroRNA • Non-invasive • Heart transplantation • Molecular medicine • Personalized medicine

\* Corresponding author. Tel: +33 1 44 49 49 49, Fax: +33 1 44 49 44 99, Email: [jp.dvh@wanadoo.fr](mailto:jp.dvh@wanadoo.fr)

† J.-P.D.V.H. and M.T. contributed equally.

‡ Co-senior authorship.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2014. For permissions please email: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com).

## Translational perspective

Rejection still represents a major threat to heart allografts. The current gold standard for heart rejection monitoring relies on repeated heart transplant biopsies that are invasive procedures and represent a serious burden in the clinical management of heart transplant recipients. Here, we studied in heart transplant tissue and in the concomitant serum the expression of relevant micro-RNAs involved in immune response and relevant biology related to allograft rejection. We demonstrate that the assessment of these four miRNAs (miR-10a, miR-31, miR-92a, and miR-155) in sera discriminates with a very high accuracy between patients with allograft rejection and those without. Taken together, our results support that miRNAs represent relevant and non-invasive biomarkers that may serve to better investigate heart transplant rejection and guide the clinical management of heart recipients.

## Introduction

Heart transplantation is a life-saving treatment for patients with end-stage heart failure, which represents a severe burden worldwide.<sup>1</sup> Despite considerable advances in transplantation, allograft rejection remains a major issue leading to allograft loss and mortality.<sup>1</sup>

Currently, the gold standard for diagnosing and monitoring acute heart rejection relies on multiple and repeated endomyocardial biopsies (EMB) performed for acute clinical indications (heart failure, decrease in left ventricular function) or carried out on a regular basis in patients in a steady state<sup>2</sup> in order to screen for subclinical rejection.<sup>3,4</sup> Despite their usefulness, EMB remains an invasive procedure associated with rare but potentially serious complications, discomfort for the patients and increased cost for the community.

Identifying non-invasive and reliable biomarkers for screening heart transplant rejection is one of the major challenges of solid organ transplantation.<sup>5</sup> While attempts have been made to isolate such biomarkers using peripheral blood gene expression in low-risk heart transplant recipients, this question is still unanswered.<sup>6,7</sup>

A recent breakthrough has occurred with the discovery of small and non-coding RNAs called microRNAs that regulate gene expression.<sup>8</sup> Though miRNAs are known to be involved in many biological processes<sup>9</sup> such as development,<sup>10</sup> cell proliferation,<sup>11,12</sup> differentiation,<sup>13</sup> apoptosis,<sup>14</sup> and oncogenesis;<sup>15</sup> emerging data suggest that they may play a critical role in the regulation of immune cell development and in the modulation of innate and adaptive immune responses.<sup>16–20</sup> Consequently, miRNAs have become a potential interest in the field of organ transplant rejection.<sup>19,20</sup>

In the present study, we hypothesized that specific miRNAs could be used as relevant biomarkers for heart transplant rejection. We sought to identify a miRNA signature in rejecting heart allografts and to determine whether assessment of miRNAs post-transplant could serve as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. Such information could have a major impact on the clinical management of heart transplant recipients.

## Methods

### Study design

This study included heart transplant recipients from Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) between January 2004 and October 2010 who had a diagnosis of biopsy-proven allograft rejection ( $n = 43$ ). Thirteen patients were excluded because of a lack of suitable material for miRNA biopsy assessment, leaving 30 rejecting heart allograft patients as the study sample. This group of patients was compared with a matched control group of 30 patients transplanted during the same period of time

but without allograft rejection. These patients were matched based on the following criteria: recipient age, donor age, cold ischaemia time, time from transplantation to index biopsy and maintenance immunosuppressive regimen. All the patients had conventional graft histopathology together with concomitant assessment of microRNA expression in the allograft and serum taken at the time of biopsy.

We used an additional independent validation sample of 53 patients from three heart transplant centres [Necker ( $n = 25$ ), Rouen ( $n = 19$ ), and Pitié-Salpêtrière hospitals ( $n = 9$ )].

All of the transplants were ABO compatible and had current negative IgG T cell and B cell complement-dependent cytotoxicity cross-matching at the time of transplantation. The transplantation allocation system was identical for all four centres and followed the rules of the French national agency for organ procurement (Agence de la Biomédecine).

### Clinical data

Clinical data for the donors and recipients in the development and validation cohorts were obtained from reviews of the patients' charts. We recorded the data for all the patients regarding donor age, donor gender, recipient age, recipient gender, primary heart disease, date of transplantation, follow-up, severe bacterial infection, CMV-related disease, cold ischaemia time, and immunosuppressive drug regimen.

### Histology and immunohistochemistry

Endomyocardial biopsies were formalin-fixed, paraffin-embedded, and routinely stained with haematoxylin-eosin. Immunohistochemistry was performed on tissue sections with specific antibodies: rabbit monoclonal anti-C4d (DB Biotech, Kosice, Slovak Republic) and monoclonal anti-CD68 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) using an immunoperoxidase method as previously described.<sup>4</sup>

### Definition of heart allograft rejection

Endomyocardial biopsies were carefully examined for the presence of rejection by three trained pathologists (P.B., P.R., and J.P.D.V.H.) according to updated international classification criteria. T-cell-mediated rejection was defined according to the International Society for Heart and Lung transplantation (ISHLT) 2004 classification.<sup>21</sup> Antibody-mediated rejection was defined according to the last recommendation of the pathology task force of the ISHLT<sup>22</sup> as follows: pAMR0: no features of ABMR; pAMR1: suspicious ABMR subdivided into pAMR1(H+) with histopathology positive and immunohistochemistry negative and pAMR1(I+) with histopathology negative and immunohistochemistry positive; pAMR2: histopathology and immunohistochemistry both positive; pAMR3: severe ABMR.<sup>22</sup> The rejection episodes were considered in both test and validation cohorts as early (occurring before 1-year post-transplant) and late (occurring after 1-year post-transplant). Supplementary material online, Table S1.

## Detection of antibodies against donor-specific HLA molecules

Patients with available serum at the time of biopsy were screened for the presence of circulating anti-HLA antibodies. Antibodies against the HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ, and HLA-DP epitopes were tested using single-antigen flow bead assays (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) on a Luminex platform as previously described.<sup>23,24</sup>

## MicroRNA analysis

Extraction of total RNA from frozen EMBs and serum was conducted anonymously. Sample information was replaced by numbers, and the technician was blinded to clinical information regarding allograft rejection status.

Extractions were performed with the Ambion Extraction Kit (Ambion, Austin, TX, USA) and the Qiagen miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to the manufacturer's recommendations. The yield and purity of RNA were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. RNAs were then individually retrotranscribed using the microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Each reverse transcription was performed with 5  $\mu$ L of a 1 ng/ $\mu$ L RNA solution, 7  $\mu$ L of master mix [containing 100 U of transcriptase Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and a mix of dNTP], 3  $\mu$ L of specific miRNAs probes (Ambion, Austin, TX, USA) in a BioRad Thermal Cycler using the following parameter values: 16°C for 30 min, 42°C for 30 and 85°C for 5 min. MicroRNAs were then quantified by real-time PCR using specific probes of the cDNA obtained from RT. Real-time PCR was performed with 2.5  $\mu$ L of RT product mixed with 15  $\mu$ L of AbsoluteTM QPCR Mix (ABgene, Epsom, UK) in a 385-well plate in a ABI 7500FAST real-time PCR system. miRNA with more than half of the cycle threshold (Ct) values >35 per group were excluded from the analysis.<sup>25</sup>

MicroRNA copy numbers were normalized using RNU48 small nuclear RNA copy numbers to obtain  $\Delta$ Ct values.  $\Delta\Delta$ Ct was then obtained by subtracting the average of  $\Delta$ Ct to each  $\Delta$ Ct values. Finally, we determined fold values for each sample ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).<sup>26,27</sup>

## Selection strategy of relevant miRNAs related to allograft rejection

Selection of miRNAs was first conducted by careful *in silico* analysis, studying the literature for relevant miRNAs associated with allograft rejection. We also screened for miRNAs related to cardiovascular pathogenesis including endothelial injury, endothelial activation, and vascular inflammation.

We then performed a database screening (TargetScan.org, miRBase.org, microRNA.org) to determine relevant miRNA biomarker candidates according to their predicted interactions with molecules of interest (VCAM, ICAM, eNOS, heparan sulfate, CD68, and CD40) and signalling pathways (inflammatory, ischaemic and endothelial activation pathways, such as mTOR or NFkappaB).

Following this analysis, we identified 14 miRNAs of interest for heart transplant rejection (Supplementary material online, Table S2): (i) miRNAs predominantly expressed in endothelium and associated with endothelial activation (miR-92a, miR-126, miR-221, and miR-296);<sup>28–32</sup> (ii) miRNAs expressed in cardiomyocytes and associated with cardiovascular tissue remodelling (miR-21, miR-31, and miR-208);<sup>29,30,33,34</sup> (iii) miRNAs related with inflammation (miR-10a, miR-142-3p, miR-155, miR-181a, miR-181b, miR-182, and miR-451).<sup>26,35–41</sup>

## In situ hybridization

MicroRNA *in situ* hybridization (ISH) was performed on FFPE tissue as previously described.<sup>31</sup> After deparaffinization of the tissue sections,

the tissue was incubated with PFA 4%, washed with PBS-DEPC and bathed with the acetylation solution. Sections were then washed and incubated with proteinase K (5  $\mu$ g/mL) at 37°C. After washing, saturation followed with the incubation of sections with the hybridization buffer for 5 h. The probe for each miRNA (miRCURY LNA, microRNA detection probes from Exiqon, Vedbaek, Denmark) was then added to a preparation containing the hybridization buffer, CHAPS 10% and Tween 20%. Sections were incubated with this solution overnight at 56°C and rinsed afterward with SSC buffers. Sections were then incubated with B1 solution and with the blocking solution. Anti-DIG was added to the blocking solution and sections were incubated overnight. Sections were then washed with B1 solution and a NTMT/Levamisole solution. Sections were then revealed with NBT/BCIP mix for 3 h to 5 days depending on the specific miRNA. Sections were washed, incubated with PFA 4% and mounted. The negative control of ISH was performed using scrambled probe control (Supplementary material online, Figure S1).

## Statistical methods

Continuous variables are reported as median, min max, and inter-quartile range. We compared means and proportions with Student's *t*-test and the  $\chi^2$  test (or Fisher's exact test if appropriate). Non-parametric analysis (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests) was performed when appropriate. We used a conventional receiver-operating characteristic (ROC) curve to analyse miRNA levels to determine the cut-off points that yielded the highest combined sensitivity and specificity with respect to distinguishing subjects with acute rejection from subjects with normal biopsy results. We calculated the area under the curve (AUC) and 95% confidence intervals for the AUC. The association between intragraft miRNAs and serum levels of miRNAs was analysed using Pearson correlation coefficient.

The association of miRNAs of interest with rejection patterns was investigated using unsupervised methods such as hierarchical cluster analysis and principal component analysis based on the combination of the expression of the 14 miRNAs [fold values ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )] obtained from the  $\Delta\Delta$ Ct value for each patient and each miRNA ( $\Delta$ Ct of the miRNA for a patient – mean  $\Delta$ Ct of the population)]. Hierarchical cluster analysis and dendrograms were performed with the hcluster module of the amap package of the R software, while principal component analysis was carried out using the dudi.pca module of the ade4 package of the R software (version 2.10.1). Other statistical analyses were performed using the STATA 11.0 software (Stata Corporation, College Station, TX, USA) and the Graphpad PRISM 5 software.

## Results

### Patient's characteristics

The main analysis included 60 heart transplant patients: heart recipients with a biopsy-proven acute rejection (acute rejection group,  $n = 30$ ) and 30 matched control recipients with a normal heart allograft biopsy (normal allograft group). The two groups were similar with regard to recipient age, gender, primary heart disease, donor age, cold ischaemia time and maintenance immunosuppression. The median time since transplantation and index biopsy was also similar between the two groups: 22 months in the rejection group (25–75 IQR: 12–49) and 24 months (25–75 IQR: 10–52). No patient had ongoing sepsis or CMV infection at the time of index biopsy. Anti-HLA donor-specific antibodies assessment at the time of index EMB revealed that 2 out of 30 (7%) patients from the control group had DSA when compared with 21/30 in the rejection group

**Table 1** Baseline patient's characteristics in the principal cohort

	Normal allografts (n = 30)	Rejecting allografts (n = 30)	P-value
Recipient age, [median, IQR (25–75)]	43 (33–51)	41 (32–48)	0.6
Recipient gender, male, n (%)	21 (70)	17 (57)	0.4
Primary heart disease, n (%)			
Congenital cardiopathy	4 (13)	5 (17)	1.0
Non-ischaemic cardiopathy	11 (37)	15 (50)	0.4
Ischaemic cardiopathy	10 (33)	6 (20)	0.4
Valvular cardiomyopathy	3 (10)	2 (7)	1.0
Retransplant	0 (0)	1 (3)	1.0
Miscellaneous	2 (7)	1 (3)	1.0
Donor age [median, IQR (25–75)]	44 (31–49)	42 (25–52)	0.6
Donor gender, male, n (%)	24 (80)	20 (67)	0.4
Cold ischaemia time, min [median, IQR (25–75)]	210 (147–235)	208 (120–242)	0.8
Maintenance immunosuppression n (%)			
Steroids	28 (93)	29 (97)	1.0
Calcineurin inhibitors	28 (93)	30 (100)	0.5
Mycophenolate acid	25 (83)	22 (73)	0.5
m-TOR inhibitors	15 (50)	14 (47)	1.0
Azathioprine	5 (17)	2 (7)	0.4
Circulating donor specific anti-HLA antibodies (DSA) at time of index EMB n (%)	2/30 (7)	TCMR (n = 2/11,18) ABMR <sup>a</sup> (n = 19/19,100)	<0.0001*
Time between Tx and Index EMB, months IQR (25–75)	22 (12–49)	24 (10–52)	0.9

TCMR, T-cell-mediated rejection; ABMR, antibody-mediated rejection.

\*P-value comparing the % of patients with circulating donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) in the normal allograft group vs. rejecting allograft group.

<sup>a</sup>P < 0.0001: P-value comparing the % of patients with circulating donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) in the TCMR group vs. ABMR group.

(70%,  $P < 0.0001$ ). The baseline patient characteristics are detailed in Table 1. The acute rejection group included 11 cases of T-cell-mediated rejection and 19 cases of AMR. Both groups received similar maintenance therapy. The detail of rejection histopathological grade is given in Supplementary material online, Table S3.

### MicroRNAs expression in heart allograft biopsies

The dendrogram and unsupervised principal component analysis were examined in all heart transplant biopsies and the respective expression of the 14 miRNAs identified in primary analysis (Supplementary material online, Figure S2). Among the 14 miRNAs, we identified 7 miRNAs that were highly ( $P < 0.0001$ ) differentially expressed (over or under expressed) between normal and rejecting heart allografts: miR-10a, miR-21, miR-31, miR-92a, miR-142-3p, miR-155, and miR-451 (Figure 1A). Four miRNAs (miR-126, miR-181b, miR-182, and miR-296) showed some association with rejection, but at a lower significance ( $0.001 < P < 0.05$ ). Three remaining miRNAs were not found to be associated with rejection (miR-181a, miR-208, and miR-221).

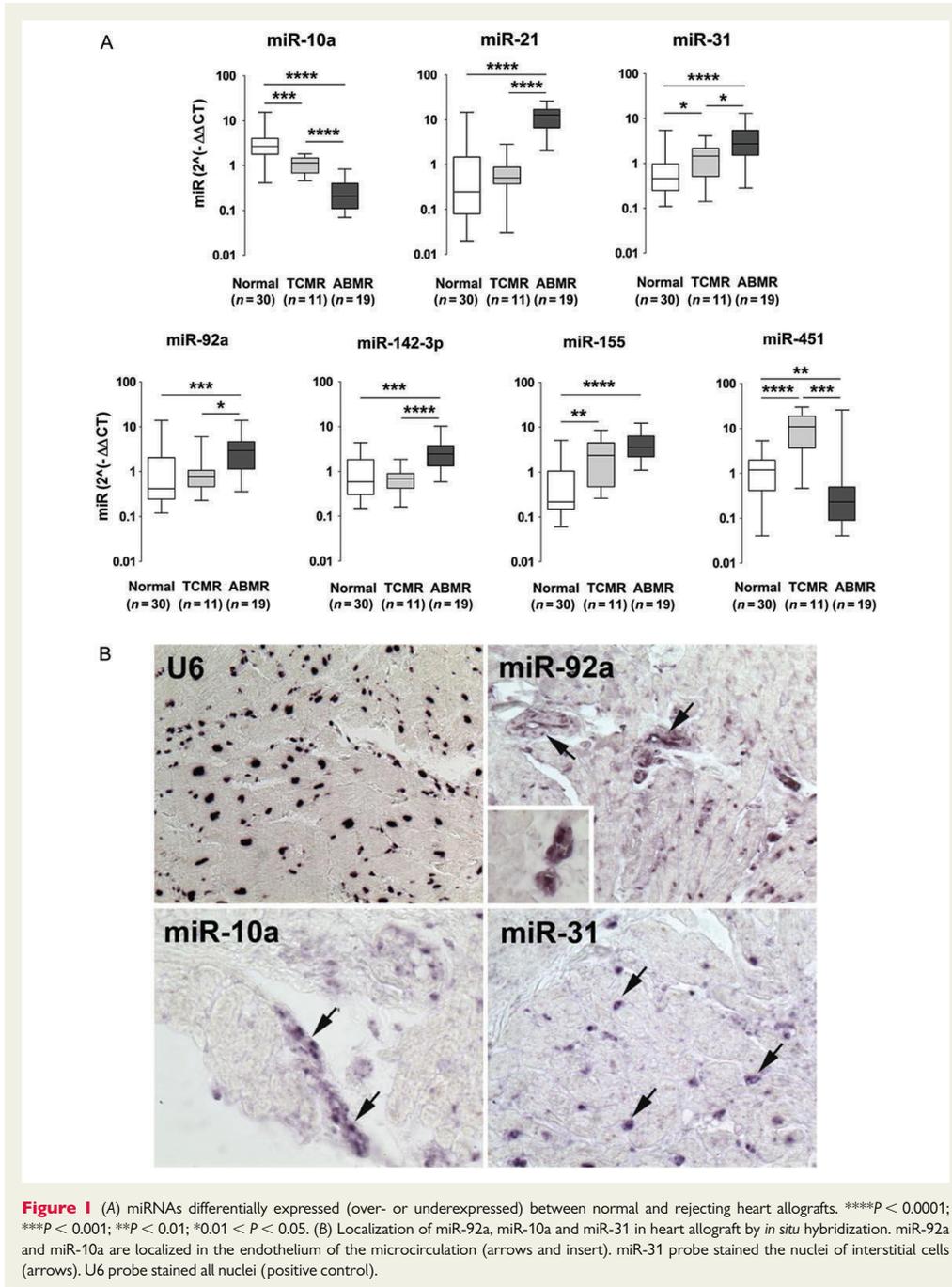
*In situ* hybridization performed in heart allograft biopsy showed that miR-10a and miR-92a were expressed in endothelial cells,

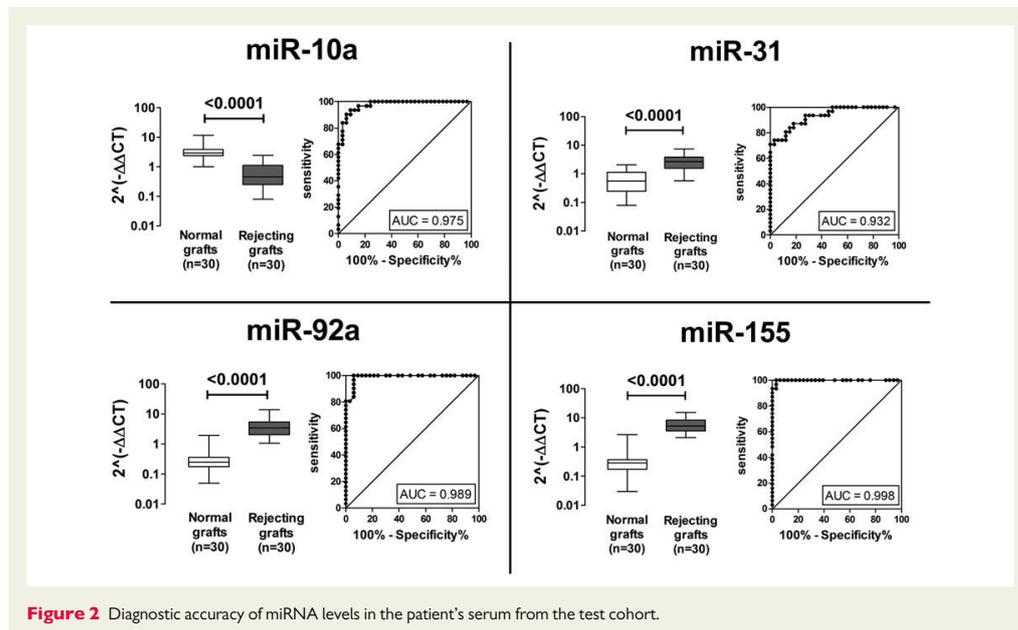
while miR-31 was localized in interstitial cells (Figure 1B). *In situ* hybridization analysis was not available for the remaining four miRNAs of interest.

### Circulating microRNAs predict cardiac allograft rejection

We tested whether the seven miRNAs differentially expressed in EMBs showed distinct expression in the concomitant patient's serum. Three miRNAs (miR-21, miR-142-3p, and miR-451) were not amenable to qPCR amplification in the serum (CT value > 35, see Methods), leaving four miRNAs (miR-10a, miR-31, miR-92a, and miR-155) that demonstrated distinct expression with regard to the heart allograft status; normal vs. rejection (Figure 2). Levels of miR-31, miR-92a, and miR-155 were significantly higher in the sera of patients with rejecting allografts compared with patients without rejection ( $P < 0.0001$  for all comparisons). The level of miR-10a was significantly lower in the sera of patients with rejecting allografts compared with patients without rejection ( $P < 0.0001$ ).

The ROC analysis showed that these four circulating miRNAs strongly discriminated patients with allograft rejection from patients without rejection [miR-10a: AUC = 0.975, CI<sub>95%</sub> = (0.946–1.005); miR-31: AUC = 0.932, CI<sub>95%</sub> = (0.876–0.989), miR-92a: AUC =





**Figure 2** Diagnostic accuracy of miRNA levels in the patient's serum from the test cohort.

0.989,  $CI_{95\%} = (0.971-1.007)$ , and miR-155:  $AUC = 0.998$ ,  $CI_{95\%} = (0.993-1.003)$ ,  $P < 0.0001$  for all comparisons] (Figure 2).

Finally, there was a high correlation between tissue and serological expression of the four miRNAs (Pearson analysis, miR-10a:  $R^2 = 0.369$ ,  $P = 0.0006$ ; miR-31:  $R^2 = 0.207$ ,  $P = 0.015$ ; miR-92a:  $R^2 = 0.326$ ,  $P = 0.0015$ ; miR-155:  $R^2 = 0.4702$ ,  $P < 0.0001$ ).

### External validation of the circulating microRNA rejection signature

The external validation set was composed of 53 heart transplant recipients from three different centres randomly selected on the basis of the heart allograft status: biopsy-proven acute rejection or normal allograft biopsy, all having serum available at the time of biopsy. The baseline characteristics of the validation set are shown in Supplementary material online, Table S4.

Of the 53 patients included, 31 had allograft rejection (T-cell-mediated rejection  $n = 14$  and AMR,  $n = 17$ ), while 22 had normal allograft EMB (Supplementary material online, Table S3).

We confirmed that the four relevant miRNAs found in the primary analyses highly discriminated patients with rejection from those without (Figure 3): miR-10a [ $AUC = 0.981$ ,  $CI_{95\%} = (0.947-1.015)$ ], miR-31 ( $AUC = 0.867$ ,  $CI_{95\%} = (0.771-0.963)$ ), miR-92a ( $AUC = 0.959$ ,  $CI_{95\%} = (0.908-1.009)$ ), and miR-155 ( $AUC = 0.974$ ,  $CI_{95\%} = (0.940-1.007)$ ] ( $P < 0.0001$  for all comparisons).

### Sensitivity analysis

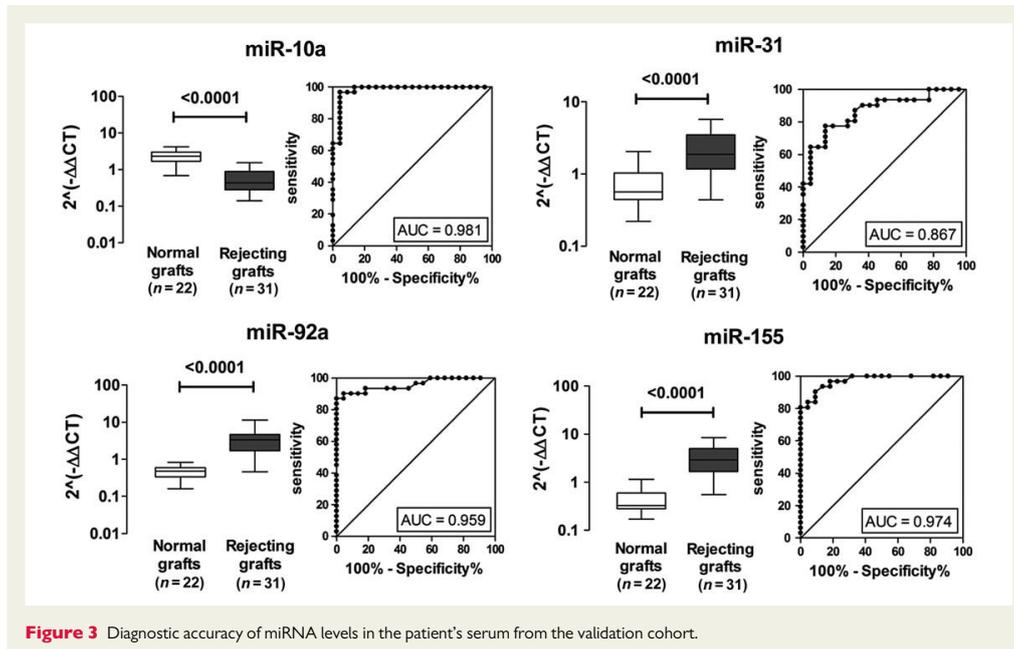
The sensitivity analysis was conducted to confirm that the miRNA rejection signature was robust across the two rejection entities

(i.e. T-cell-mediated rejection and antibody-mediated rejection). We stratified the ROC analysis by rejection diagnosis and found that all four miRNAs were associated with T-cell-mediated rejection [miR-10a ( $AUC = 0.981$ ), miR-31 ( $AUC = 0.902$ ), miR-92a ( $AUC = 0.977$ ), and miR-155 ( $AUC = 0.984$ , Supplementary material online, Figure S3) and also discriminated patients with antibody-mediated rejection (miR-10a ( $AUC = 0.969$ ), miR-31 ( $AUC = 0.903$ ), miR-92a ( $AUC = 0.984$ ), and miR-155 ( $AUC = 0.986$ ), (Supplementary material online, Figure S4  $P < 0.0001$  for all comparisons between normal and rejection biopsies). We also confirmed that the four miRNAs are differentially expressed in normal allografts vs. rejecting allografts in both early (before 1 year) and late (after 1 year) rejection cases (Supplementary material online, Figure S5).

### Discussion

In this study, we demonstrated that four miRNAs, miR-10a, miR-31, miR-92a, and miR-155, showed differential tissue expression between rejecting and normal heart allografts. We also showed that strong correlations exist between tissue and serological expression of these four miRNAs and that their assessment in patients' sera permits discrimination with very high accuracy between patients with allograft rejection and those without. Taken together, our results suggest that these miRNAs are of potential clinical interest as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection.

Personalized medicine<sup>42</sup> has gained momentum in the transplantation field.<sup>5,43</sup> The improvement of knowledge regarding rejection pathophysiology together with the implementation of technologies



**Figure 3** Diagnostic accuracy of miRNA levels in the patient's serum from the validation cohort.

has led to the emergence of new potential biomarker candidates for predicting allograft rejection.<sup>19,44</sup> In recent years, the field of kidney transplantation has moved to molecular medicine with growing evidence that molecular techniques applied to biopsies<sup>45</sup> and urine analysis<sup>46,47</sup> could be useful for both investigating biopsies and screening patients at risk for allograft rejection in a non-invasive manner.

In heart transplantation, defining non-invasive and relevant biomarkers for allograft rejection is an unmet need. This is particularly true in the context of current clinical practice that includes repeated and routine EMBs for screening allograft rejection, a procedure that is not without consequences for the patient.<sup>2</sup> An important study published in 2006 provided proof that a peripheral blood gene-expression profiling strategy could be used in heart transplantation without an increased risk of serious adverse outcomes.<sup>6</sup> However, this study was limited by several factors including the low immunological risk of the population studied as well as the exclusive attention to T-cell-mediated rejection without assessment of antibody-mediated rejection,<sup>7</sup> which today represents a serious threat to heart allografts.<sup>3,4</sup> Moreover, this approach was limited to the genes expressed in leucocytes, potentially ignoring significant genes expressed in other cell types or heart tissue specific genes. Finally, in this study, the gene signature found in the peripheral blood was not tested in allograft biopsies.<sup>7</sup>

MicroRNAs have recently emerged as relevant candidates in the field of organ rejection because of their capacity to regulate thousands of genes that are key elements of both innate and adaptive immune responses.<sup>16–18</sup> The potential interest of microRNAs lies in the fact that their expression is regulated by several inflammatory

stimuli. Further, some miRNAs have tissue specificity and are involved in a number of processes such the regulation of adhesion and inflammation or angiogenesis,<sup>29,48</sup> making them markers of choice for microvascular inflammation observed the humoral rejection in heart transplantation.<sup>22</sup> These properties were the basis for selecting potentially relevant miRNAs and for testing whether these were differentially expressed in rejecting allografts in both tissue and peripheral blood.

The four miRNAs identified in our analysis (miR-10a, miR-155, miR-31, and miR-92a) were specific for inflammatory burdens in endothelial cells, inflammatory pathways, cardiomyocytes/interstitial cells, and endothelial cells, respectively. MiR-10a has been shown to inhibit NF $\kappa$ B signalling pathway and consequently is involved in increasing the pro-inflammatory markers MCP-1, IL -6, IL -8, -1, and VCAM in endothelial cells.<sup>35</sup> Lind *et al.*<sup>36</sup> described several inflammatory functions of miR-155 that include its increased expression following the activation of the T-cell receptor, the repression of the expression of the IFN receptor and the contribution to Ig class switching in B cells. MiR-31 mainly regulates the expression of E-selectin and ICAM-1 when induced by the TNF pathway<sup>49</sup> as well as integrins ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ , and  $\beta 1$  subunit), indicating its major role in the regulation of inter-/intra-cell adhesion. Finally, miR-92a targets the integrin  $\alpha 5$ , S1P1, MKK4, and eNOS, demonstrating an endothelial tropism and a potentially important role in the vascular inflammatory response.<sup>50</sup> All of these functions have been linked to processes implicated in both humoral and cellular rejection in solid organ transplantation. In support of this possibility, we demonstrated that miR-10a and MiR-92a are mainly expressed in heart allograft

endothelial cells, which are the primary target for the alloimmune response, while miR-31 is localized in heart allograft interstitial cells (note that we were not able to obtain a reliable and robust signal for miR-155 reaching our standards for ISH).

### Strengths and limitations

In this paper, we employed a unique tissue and serological approach using relevant pathogenesis-based miRNAs that reflected immune response and heart tissue specificity. We also used an extensive allograft phenotyping with contemporary tools to diagnose cases of T-cell and antibody-mediated rejection. Our study also includes rejection episodes occurring in the first year post-transplant (41%) as well as rejection occurring after 1-year post-transplant (59%), most of late cases antibody-mediated rejection (67% of late rejections). Therefore, this represents stereotypical clinical situations and the contemporary picture of allograft rejection encountered in the modern era of heart transplantation. The important differences that we found in miRNA expression between normal and rejecting allografts could partly be explained by the 'sick vs. well' strategy as part of our case selection criteria. While this approach is relevant to isolate relevant biomarkers as part of discovery sets (and we confirmed the associations in independent validation set), our results need to be tested in unselected prospective cohorts of heart recipients. Moreover, we used in the present study a pathogenesis-based strategy of miRNA selection. Despite our results are robust, we cannot exclude that other potentially relevant miRNAs could be involved in heart allograft rejection. We believe our results will serve as a basis for future investigations regarding the clinical relevance of applying a non-invasive miRNA strategy to detect normal or rejecting heart allografts, to establish thresholds and decisions based on the miRNA values and to determine the kinetics of miRNA as well as response to treatment.

Finally, we are not seeking to compare the clinical relevance of a peripheral miRNA signature to histopathology assessment, which still represent the gold standard for the diagnosis of heart allograft rejection. In current practice, a heart biopsy remains mandatory in clinical situations. However, we believe that the peripheral profiling of miRNAs could guide clinicians in the setting of stable heart allografts and aid in monitoring and determining in which cases a screening biopsy would be mandatory.

### Conclusion

In this study, we demonstrated that regulation in the expression of miRNAs occurs during heart transplant rejection, not only at the tissue level but also in the patient's serum. We also showed that the assessment of miRNAs miR-10a, miR-31, miR-92a, and miR-155 in patients' sera discriminates with a very high accuracy between patients with allograft rejection and those without. This suggests that miRNAs may represent relevant and non-invasive biomarkers that may serve to better investigate heart transplant rejection and guide the clinical management of heart recipients.

### Supplementary material

Supplementary material is available at *European Heart Journal* online.

### Funding

This research has been supported by funding and/or resources from Novartis Pharma France and Astellas France.

**Conflict of interest:** The authors declare no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous three years. There are no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work. All authors, external and internal, had full access to all of the study data (including statistical reports and tables) and take full responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

### References

- Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Dipchand AI, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Yusen RD, Stehlik J, International Society for Heart and Lung T. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report—2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant* 2013;**32**:951–964.
- Gradek WQ, D'Amico C, Smith AL, Vega D, Book WM. Routine surveillance endomyocardial biopsy continues to detect significant rejection late after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2001;**20**:497–502.
- Wu GW, Kobashigawa JA, Fishbein MC, Patel JK, Kittleson MM, Reed EF, Kiyosaki KK, Ardehali A. Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes. *J Heart Lung Transplant* 2009;**28**:417–422.
- Loupy A, Cazes A, Guillemin R, Amrein C, Hedjoudje A, Tible M, Pezzella V, Fabiani JN, Suberbielle C, Nochy D, Hill GS, Empana JP, Jouven X, Bruneval P, Duong Van Huyen JP. Very late heart transplant rejection is associated with microvascular injury, complement deposition and progression to cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2011;**11**:1478–1487.
- Kobashigawa JA. The future of heart transplantation. *Am J Transplant* 2012;**12**:2875–2891.
- Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, Kobashigawa J, Johnson FL, Starling RC, Murali S, Pauly DF, Baron H, Wohlgemuth JG, Woodward RN, Klingler TM, Walther D, Lal PG, Rosenberg S, Hunt S, Investigators C. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 2006;**6**:150–160.
- Pham MX, Teuteberg JJ, Kloury AG, Starling RC, Deng MC, Cappola TP, Kao A, Anderson AS, Cotts WG, Ewald GA, Baran DA, Bogaev RC, Elashoff B, Baron H, Yee J, Valentine HA, Group IS. Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2010;**362**:1890–1900.
- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 2012;**13**:358–369.
- Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012;**148**:1172–1187.
- Penzkofer D, Bonauer A, Fischer A, Tups A, Brandes RP, Zeiher AM, Dimmeler S. Phenotypic characterization of miR-92a<sup>-/-</sup> mice reveals an important function of miR-92a in skeletal development. *PLoS One* 2014;**9**:e101153.
- Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, Manman PP, Rothermel BA, Olson EN, Sadek HA. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;**110**:187–192.
- Jin C, Zhao Y, Yu L, Xu S, Fu G. MicroRNA-21 mediates the rapamycin-induced suppression of endothelial proliferation and migration. *FEBS Lett* 2013;**587**:378–385.
- Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, Lovat F, Fadda P, Mao C, Nuovo GJ, Zanesi N, Crawford M, Ozer GH, Wernicke D, Alder H, Caligiuri MA, Nana-Sinkam P, Perrotti D, Croce CM. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;**109**:E2110–6.
- Chen L, Wang Y, Pan Y, Zhang L, Shen C, Qin G, Ashraf M, Weintraub N, Ma G, Tang Y. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;**431**:566–571.
- Sun D, Yu F, Ma Y, Zhao R, Chen X, Zhu J, Zhang CY, Chen J, Zhang J. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *J Biol Chem* 2013;**288**:9508–9518.
- Sun Y, Tawara I, Zhao M, Qin ZS, Toubai T, Mathewson N, Tamaki H, Nieves E, Chinnaiyan AM, Reddy P. Allogeneic T cell responses are regulated by a specific miRNA-mRNA network. *J Clin Invest* 2013;**123**:4739–4754.
- Takahashi H, Kanno T, Nakayama S, Hirahara K, Sciume G, Muljo SA, Kuchen S, Casellas R, Wei L, Kanno Y, O'Shea JJ. TGF-beta and retinoic acid induce the

- microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nat Immunol* 2012;**13**:587–595.
18. Trotta R, Chen L, Ciarliello D, Josyula S, Mao C, Costinean S, Yu L, Butchar JP, Triandapani S, Croce CM, Caligiuri MA. miR-155 regulates IFN-gamma production in natural killer cells. *Blood* 2012;**119**:3478–3485.
  19. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, Seshan SV, Suthanthiran M. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**:5330–5335.
  20. Wei L, Wang M, Qu X, Mah A, Xiong X, Harris AG, Phillips LK, Martinez OM, Krams SM. Differential expression of microRNAs during allograft rejection. *Am J Transplant* 2012;**12**:1113–1123.
  21. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suci-Focia N, Zeevi A, Billingham ME. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005;**24**:1710–1720.
  22. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, Bruneval P, Fedrigo M, Fishbein MC, Goddard M, Hammond EH, Leone O, Marboe C, Miller D, Neil D, Rassi D, Revello MP, Rice A, Rene Rodriguez E, Stewart S, Tan CD, Winters GL, West L, Mehra MR, Angelini A. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013;**32**:1147–1162.
  23. Lefaucheur C, Loupy A, Vermeré D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, Verine J, Beuscart T, Nochy D, Bruneval P, Charron D, Delahousse M, Empana JP, Hill GS, Glotz D, Legendre C, Jouven X. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet* 2013;**381**:313–319.
  24. Loupy A, Lefaucheur C, Vermeré D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, Suberbielle C, Fremaux-Bacchi V, Mejean A, Desgrandchamps F, Anglicheau D, Nochy D, Charron D, Empana JP, Delahousse M, Legendre C, Glotz D, Hill GS, Zeevi A, Jouven X. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013;**369**:1215–1226.
  25. Danger R, Paul C, Giral M, Lavault A, Foucher Y, Degauque N, Pallier A, Durand M, Castagnet S, Duong Van Huyen JP, Delahousse M, Renaudin K, Souillou JP, Brouard S. Expression of miR-142–5p in peripheral blood mononuclear cells from renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection. *PLoS One* 2013;**8**:e60702.
  26. Danger R, Pallier A, Giral M, Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Degauque N, Sanchez-Fueyo A, Souillou JP, Brouard S. Upregulation of miR-142–3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol* 2012;**23**:597–606.
  27. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 2014;**18**:371–390.
  28. Qin B, Yang H, Xiao B. Role of microRNAs in endothelial inflammation and senescence. *Mol Biol Rep* 2012;**39**:4509–4518.
  29. Fish JE, Srivastava D. MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research. *Sci Signal* 2009;**2**:pe1.
  30. Karunakaran D, Rayner KJ. MicroRNAs in cardiovascular health: from order to disorder. *Endocrinology* 2013;**154**:4000–4009.
  31. Loyer X, Potteaux S, Vion AC, Guerin CL, Boulkroun S, Rautou PE, Ramkhalawon B, Esposito B, Dalloz M, Paul JL, Julia P, Maccario J, Boulanger CM, Mallat Z, Tedgui A. Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circ Res* 2014;**114**:434–443.
  32. Gilad S, Meiri E, Yegorov Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;**3**:e3148.
  33. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. miR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;**393**:643–648.
  34. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009;**55**:1944–1949.
  35. Fang Y, Shi C, Manduchi E, Civelek M, Davies PF. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:13450–5.
  36. Lind EF, Ohashi PS. miR-155, a central modulator of T-cell responses. *Eur J Immunol* 2014;**44**:11–15.
  37. Sullivan RP, Fogel LA, Leong JW, Schneider SE, Wong R, Romee R, Thai TH, Sexl V, Matkovich SJ, Dorn GW II, French AR, Fehniger TA. MicroRNA-155 tunes both the threshold and extent of NK cell activation via targeting of multiple signaling pathways. *J Immunol* 2013;**191**:5904–5913.
  38. Feng Z, Xia Y, Zhang M, Zheng J. MicroRNA-155 regulates T cell proliferation through targeting GSK3beta in cardiac allograft rejection in a murine transplantation model. *Cell Immunol* 2013;**281**:141–149.
  39. Sun X, Icli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, Hunninghake GM, Vera MP, Registry M, Blackwell TS, Baron RM, Feinberg MW. MicroRNA-181b regulates NF-kappaB-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest* 2012;**122**:1973–1990.
  40. Kelada S, Sethupathy P, Okoye IS, Kistasis E, Czieso S, White SD, Chou D, Martens C, Ricklefs SM, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, Belkaid Y, Wynn TA, Wilson MS. miR-182 and miR-10a are key regulators of Treg specialisation and stability during Schistosome and Leishmania-associated inflammation. *PLoS Pathog* 2013;**9**:e1003451.
  41. Wang X, Zhu H, Zhang X, Liu Y, Chen J, Medvedovic M, Li H, Weiss MJ, Ren X, Fan GC. Loss of the miR-144/451 cluster impairs ischaemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting Rac-1. *Cardiovasc Res* 2012;**94**:379–390.
  42. Hamburg MA, Collins FS. The path to personalized medicine. *N Engl J Med* 2010;**363**:301–304.
  43. Mengel M, Campbell P, Gebel H, Randhawa P, Rodriguez ER, Colvin R, Conway J, Hachem R, Halloran PF, Keshavjee S, Nickerson P, Murphy C, O'Leary J, Reeve J, Tinckam K, Reed EF. Precision diagnostics in transplantation: from bench to bedside. *Am J Transplant* 2013;**13**:562–568.
  44. Sellares J, Reeve J, Loupy A, Mengel M, Sis B, Skene A, de Freitas DG, Kreepala C, Hidalgo LG, Famulski KS, Halloran PF. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant* 2013;**13**:971–983.
  45. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, Matas A, Picton M, De Freitas D, Bromberg J, Seron D, Sellares J, Einecke G, Reeve J. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *Am J Transplant* 2013;**13**:2865–2874.
  46. Matignon M, Ding R, Dadhania DM, Mueller FB, Hartono C, Snopkowski C, Li C, Lee JR, Sjoberg D, Seshan SV, Sharma VK, Yang H, Nour B, Vickers AJ, Suthanthiran M, Muthukumar T. Urinary cell mRNA profiles and differential diagnosis of acute kidney graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2014;**25**:1586–1597.
  47. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, Knechtle SJ, Friedewald J, Becker YT, Sharma VK, Williams NM, Chang CS, Hoang C, Muthukumar T, August P, Keslar KS, Fairchild RL, Hricik DE, Heeger PS, Han L, Liu J, Riggs M, Ikle DN, Bridges ND, Shaked A. Clinical Trials in Organ Transplantation 04 Study I. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med* 2013;**369**:20–31.
  48. Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008;**79**:581–588.
  49. Suarez Y, Wang C, Manes TD, Pober JS. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J Immunol* 2010;**184**:21–25.
  50. Zhang L, Zhou M, Wang Y, Huang W, Qin G, Weintraub NL, Tang Y. miR-92a inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis: role of the MKK4-JNK pathway. *Apoptosis* 2014;**19**:975–983.

# Editorial to the European Heart Journal Publication

European Heart Journal Advance Access published August 31, 2014



European Heart Journal  
doi:10.1093/eurheartj/ehu376

EDITORIAL

## Towards novel theranostic approaches in cardiac transplantation medicine

Sandor Batkai<sup>1,2</sup> and Thomas Thum<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular and Translational Therapeutic Strategies, Hannover Medical School, Hannover, Germany; <sup>2</sup>Integrated Research and Treatment Centre Transplantation, Hannover Medical School, Hannover, Germany; and <sup>3</sup>National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK

**This editorial refers to 'MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection', by J.-P.D. Van Huyen et al., on page doi:10.1093/eurheartj/ehu346**

Patients' life expectancy after heart transplant (HTX) has increased tremendously since the first human transplantation in 1967.<sup>1</sup> This has been achieved by refined surgical techniques, advances in organ preservation and dramatic improvements in immunosuppressive therapies, delivered as a collective effort by multiple clinical and scientific disciplines. One of the most important areas that nowadays require further improvement in the optimization of clinical outcome is patient care following transplantation.<sup>2</sup> In general, the aim of post-operative care is to deliver adequate immunosuppression, prevent graft injury and rejection, and minimise the side effects and toxicity of drugs, guided by systematic monitoring of organ functions, clinical symptoms, therapeutic drug concentrations and biopsy results. Acute cardiac allograft rejection (ACAR) occurs in approximately 30% of cardiac transplant patients during the first year and at a rate of 1–7% per year thereafter.<sup>3,4</sup> Optimization of the therapy is challenging; none of the existing diagnostic tools are able to predict clinical outcomes that could reliably guide therapeutic decisions. To overcome this, novel biomarkers are being developed that have adequate predictive potential; these biomarkers could complement or replace current diagnostic tools. Although it is invasive and costly, and false negative results are not uncommon, the 'gold standard' tool is still endomyocardial biopsy (EMB). Clinical indicators such as electrocardiogram (ECG) and imaging techniques (echocardiography, MRI) have been relatively unsuccessful in providing additional diagnostic or prognostic benefits. Biochemical markers of cardiomyocyte injury and stress, as well as inflammation, have also been assessed; these biomarkers have been measured mostly in blood samples to detect graft rejection. Cell-specific molecules such as troponin-I/T (TnI/T) or B-natriuretic peptide (BNP) (and NT-proBNP) are released from cardiomyocytes and are the 'gold standard' for ischaemic injury.<sup>5</sup> These markers are increased during cardiac rejection but are rather non-specific.<sup>6</sup> Tissue inflammation is part of the immunological process after transplantation; C-reactive

protein (CRP) is an inflammatory marker highly associated with cardiac rejection; however, CRP elevation is rather non-specific and often does not indicate graft rejection.<sup>7</sup> A key component in ACAR is the activation of cell-mediated immunity, which can be assessed by the US Food and Drug Administration (FDA)-approved Cyclex<sup>®</sup> ImmuKnow<sup>™</sup> (which is approved by the FDA and bears the CE mark), an innovative approach that tests CD4+ T-Cell adenosine triphosphate (ATP) content after phytohemagglutinine-L stimulation.<sup>8</sup> Low scores in the test appear to predict infectious risk in heart transplant patients; however the association between high scores and rejection risk is so far inconclusive.<sup>9</sup> The detection of single or multiple genetic markers of ACAR in the patient's blood by gene expression profiling is complex and technically challenging. Out of the large number of different genetic markers so far studied, one approach, Allomap<sup>®</sup> (XDx, Inc., Brisbane, Australia) is approved by the FDA and available in Europe. The test uses 20 genes of relevant pathways from circulating mononuclear cells, reflecting the host response after transplantation. This test has been validated through the Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational (CARGO) and the subsequent CARGO II studies and the test proved to be useful for ruling out.<sup>10,11</sup> The more recent Invasive Monitoring Attenuation by Gene Expression Profiling (IMAGE) study demonstrated that Allomap<sup>®</sup> testing not only indicates the probability of acute cellular rejection by a single ordinal gene-expression profiling test score but, in individual patients, the variability of a gene expression profiling test score over time may provide additional prognostic utility.<sup>12</sup> Another innovative marker of graft cellular injury is the appearance of circulating donor-specific cell-free deoxyribonucleic acid (DScf-DNA). Although costs and the complexity of genotyping limited its usefulness a recent study, using a cost-effective targeted quantitative genotyping approach, demonstrated that the percentage of DScf-DNA was increased in patients with rejection and can rule out ACAR with high accuracy.<sup>13</sup>

The underlying molecular mechanism of acute graft rejection begins well before the appearance of pathogenic biomarkers, or of histological features. A novel approach in biomarker discovery focuses on circulating non-coding RNAs, such as microRNAs, or

The opinions expressed in this article are not necessarily those of the Editors of the *European Heart Journal* or of the European Society of Cardiology.

\* Corresponding author. Institute of Molecular and Translational Therapeutic Strategies, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Strasse 1, 30625 Hannover, Germany. Tel: +49 511 532 5273, Fax: +49 511 532 5274, E-Mail: [thum.thomas@mh-hannover.de](mailto:thum.thomas@mh-hannover.de)

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2014. For permissions please email: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com).

long non-coding RNAs from blood samples. MicroRNAs are key regulators of protein synthesis at the post-transcriptional level. These short, approximately 22 nucleotide, RNA molecules regulate multiple gene networks and they play a particularly important role in disease development.<sup>14–16</sup> MicroRNAs are surprisingly stable in the extracellular space and readily detectable by highly selective and sensitive assay platforms from all tissues including blood. Many of these characteristics have shown circulating microRNAs to be a promising biomarker in all medical departments, including cardiology.<sup>17,18</sup> In recent years, circulating microRNAs as potential biomarkers were also analysed in solid organ transplantation studies, including small, pilot studies in cardiac transplantations. In a study of seven patients, miR-133a, miR-133b and miR-208a showed dynamic changes, similar to cTnI, early after transplantation. Circulating miR-133b outperformed cTnI by predicting graft dysfunction. Despite the limitations of the study, circulating miR-133b could be one of the new, sensitive markers for monitoring and forecasting myocardial injury and recovery after heart transplantation.<sup>19</sup> Another pilot study with 10 patients identified circulating miR-326 and miR-142-3p as having significant discrimination power to distinguish between normal and pathological histologies of the EMB samples.<sup>20</sup>

A major study by Doung Van Huyen *et al.*,<sup>21</sup> published elsewhere in this journal, tested circulating miRNAs as potential biomarkers for acute allograft rejection. Blood samples were collected at the time of biopsies taken during the post-operative follow-up over a one-year period. Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis of the cardiac biopsies showed that seven microRNAs were differentially expressed between normal and rejecting hearts. Most importantly, four microRNAs out of the seven (miR-10a, miR-31, miR-92a and miR-155) were also differentially detectable in blood samples, and correlated well with tissue expression. With the impressive number of 113 included heart transplant recipients, the study was well powered. All four microRNAs had significant discriminating power in the set cohort, which was further confirmed in additional samples from the validation cohort. As the authors pointed out, further studies are needed to confirm their findings in even larger, unselected prospective cohorts. Further stratification of patients may yield additional diagnostic benefits for patient subgroups, particularly for paediatric transplant patients. The study is based on a single blood collection; evidently more data is needed to explore the nature of circulating microRNA kinetics.

Biomarker discovery studies commonly employ two different approaches: large-scale screening of candidates, whose data are then analysed for association with disease pathology, or a pathogenesis-driven strategy based on pre-selecting potentially relevant candidates and testing their performance. In this study, the authors chose the latter approach and selected 14 microRNAs relevant to cardiac allograft rejection, endothelial activation, injury and vascular inflammation. The obvious advantage of this approach was, arguably, the simpler study design and faster validation. On the other hand, it would be valuable to screen samples from the author's large cohorts for novel microRNAs or other non-coding RNAs, such as lncRNAs or circular RNAs (circRNAs), which could provide not only additional biomarker candidates but also valued scientific information on the pathomechanism of allograft rejection. The usefulness of biomarkers depends on an accurate and easy-to-perform assay. In this study qPCR, the current state-of-the-art

method for microRNA quantification, was used. Although qPCR is the mainstream technology; several other technology platforms are currently emerging.<sup>22</sup> There are several major obstacles, such as low presence of microRNAs or other non-coding RNAs, normalization, issues interlab variability, and inconsistent sample processing standards, that need to be overcome before microRNA detection assays can be used in a clinical setting.

Improving cardiac transplant patients' long-term management and quality of life continues to be a major challenge. In addition to post-operative care, another area where improvement is needed is in evaluation, monitoring and decision-making regarding the listing of patients, especially children.<sup>23</sup> Current policies on the selection of candidates and the allocation of hearts for transplantation give priority to patients who are at greatest risk if they do not receive a transplant.<sup>24</sup> Further refinement of allocation will be possible, based on solid evidence from large-scale, longitudinal, randomized clinical trials using validated biomarkers. On the other hand, large, randomized clinical trials cannot help with individualization of post-transplantation immunotherapies that are sufficient to avoid ACAR and adapted to individual changes in immune status. Personalized or 'stratified' medicine is a novel concept and holds enormous potential to increase the efficacy, safety and cost-effectiveness of treatments. New, validated biomarkers—quite possibly the above-mentioned circulating microRNAs—may also be the cornerstones of patient stratification and theranostic approaches. These markers are needed to identify subgroups that can benefit from specific treatment options and that are at higher risk of toxicity or adverse effects, in order to improve organ–recipient matching and to predict outcomes. The study by Doung Van Huyen *et al.*<sup>21</sup> is a major step in the right direction. Innovative future studies are emerging that employ novel biotargets, including circulating miRNAs, and may help to develop future diagnostic/predictive bioassays in cardiac transplantation medicine.

## References

- Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: An interim report of a successful operation performed at groote schuur hospital, cape town. *S Afr Med J* 1967; **41**:1271–1274.
- Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S *et al.* The international society of heart and lung transplantation guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2010; **29**:914–956.
- Stehlik J, Starling RC, Movsesian MA, Fang JC, Brown RN, Hess ML *et al.* Utility of long-term surveillance endomyocardial biopsy: A multi-institutional analysis. *J Heart Lung Transplant* 2006; **25**:1402–1409.
- Taylor DO, Stehlik J, Edwards LB, Aurora P, Christie JD, Dobbels F *et al.* Registry of the international society for heart and lung transplantation: Twenty-sixth official adult heart transplant report-2009. *J Heart Lung Transplant* 2009; **28**:1007–1022.
- Dengler TJ, Zimmermann R, Braun K, Muller-Bardorff M, Zehlelein J, Sack FU *et al.* Elevated serum concentrations of cardiac troponin T in acute allograft rejection after human heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1998; **32**:405–412.
- Damodaran A, Dardas T, Wu AH, Dyke DB, Hummel SL, Cowger JA *et al.* Changes in serial B-type natriuretic peptide level independently predict cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2012; **31**:708–714.
- Martinez-Dolz L, Almenar L, Reganon E, Vila V, Sanchez-Soriano R, Martinez-Sales V *et al.* What is the best biomarker for diagnosis of rejection in heart transplantation? *Clin Transplant* 2009; **23**:672–680.
- Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M *et al.* Immune cell function testing: An adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant* 2003; **17**:77–88.
- Kobashigawa JA, Kiyosaki KK, Patel JK, Kittleson MM, Kuback BM, Davis SN *et al.* Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes. *J Heart Lung Transplant* 2010; **29**:504–508.
- Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G *et al.* Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 2006; **6**:150–160.

11. Crespo-Leiro MG, Zuckermann A, Bara C, Mohacsi P, Schulz U, Boyle A et al. Concordance among pathologists in the second cardiac allograft rejection gene expression observational study (CARGO II). *Transplantation* 2012;**94**:1172–1177.
12. Deng MC, Elashoff B, Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, Starling RC et al. Utility of gene expression profiling score variability to predict clinical events in heart transplant recipients. *Transplantation* 2014;**97**:708–714.
13. Hidestrand M, Tomita-Mitchell A, Hidestrand PM, Oliphant A, Goetsch M, Stamm K et al. Highly sensitive noninvasive cardiac transplant rejection monitoring using targeted quantification of donor-specific cell-free deoxyribonucleic acid. *J Am Coll Cardiol* 2014;**63**:1224–1226.
14. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**51**:872–875.
15. Jaguszewski M, Osipova J, Ghadiri J, Napp LC, Widera C, Franke J et al. A signature of circulating microRNAs differentiates takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2014;**35**:999–1006.
16. Kumarswamy R, Batters C, Volkmann I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res* 2014;**114**:1569–1575.
17. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;**456**:980–984.
18. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:18255–18260.
19. Wang E, Nie Y, Zhao Q, Wang W, Huang J, Liao Z et al. Circulating miRNAs reflect early myocardial injury and recovery after heart transplantation. *J Cardiothorac Surg* 2013;**8**:165,8090-8-165.
20. Dewi IS, Gidlöf O, Ivars F, Öhman J. The alteration of MiR-326 and MiR-142-3p expressions during immune activation is positively correlated with graft-protective cytokine TGF-beta. *J Heart Lung Transplant* 2014;**33**:S253–S254.
21. Van Huyen J-PD, Tible M, Gay A, Guillemain R, Aubert O, Varnous S, Iserin F, Rouvier P, François A, Vernerey D, Loyer X, Leprince P, Empana J-P, Bruneval P, Loupy A, Jouven X. MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. *Eur Heart J* 2014; doi:10.1093/eurheartj/ehu346.
22. Batkai S, Thum T. Analytical approaches in microRNA therapeutics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2014;**964**:146–152.
23. Lipshultz SE, Chandar JJ, Rusconi PG, Fomoni A, Abitbol CL, Burke GW 3rd et al. Issues in solid-organ transplantation in children: Translational research from bench to bedside. *Clinics (Sao Paulo)* 2014;**69**(Suppl 1):55–72.
24. Krakauer H, Lin MJ, Bailey RC. Projected survival benefit as criterion for listing and organ allocation in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2005;**24**:680–689.

### III. Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré que 9 miARNs avaient une expression tissulaire différentielle entre rejet et allogreffes cardiaques normales. Nous avons également montré que de fortes corrélations existaient entre le tissu et l'expression sérologique de 4 miARNs (miR-10a, miR-31, miR-92a et miR-155) et que leur évaluation dans le sérum a permis la discrimination des patients présentant un rejet.

En transplantation rénale, il est devenu de plus en plus évident que les techniques moléculaires réalisées sur biopsies ou sur les urines pouvaient être utiles pour le dépistage non invasif des patients à risque de rejet d'allogreffe [78, 125, 175].

En transplantation cardiaque, la définition de nouveaux biomarqueurs non invasifs des rejets reste un besoin qui, malgré les efforts de plusieurs études, reste insatisfait. Une importante étude publiée en 2006 a fourni la preuve qu'une stratégie genome-wide pourrait être utilisée en transplantation cardiaque à partir de sang, diminuant ainsi les risques liés au prélèvement biopsique [83]. Cependant, cette étude a été limitée par plusieurs facteurs, notamment le faible risque immunologique de la population étudiée, ainsi que l'étude du rejet cellulaire sans évaluation du rejet humoral. En outre, cette approche a été limitée à des gènes exprimés dans les leucocytes, en ignorant potentiellement gènes significatifs dans d'autres types cellulaires ou des gènes spécifiques du tissu cardiaque.

Ainsi, les microARNs, régulateurs de gènes et éléments essentiels de la réponse immunitaire innée et adaptative sont devenus des candidats idéaux pour le screening plasmatique des patients rejeteurs. De plus, leur expression est régulée par plusieurs stimuli inflammatoires et la majorité des miARNs a une spécificité tissulaire et est impliquée dans des procédés tels que la régulation de l'adhésion et de l'inflammation ou l'angiogenèse, ce qui en fait des marqueurs de choix pour l'inflammation microvasculaire observée dans le rejet humoral transplantation cardiaque.

Les quatre miARNs identifiés dans notre analyse (miR-10a, miR-155, miR-31 et miR-92a) étaient spécifiques de l'inflammation, des cardiomyocytes / cellules

interstitielles et des cellules endothéliales, respectivement. Leurs fonctions ont été liées à des processus impliqués à la fois dans le rejet humoral et cellulaire en transplantation d'organe solide.

Dans cette étude, nous avons utilisé une approche d'abord tissulaire puis sérologique, à l'aide d'une analyse bibliographique pertinente et aussi exhaustive que possible des fonctions de miARNs, reflétant les différentes réponses immunitaires du tissu cardiaque lors du rejet (activation endothéliale, fibrose, lésion myocytaire, inflammation et infiltration des cellules de l'immunité).

Les différences importantes d'expression des miARNs entre les patients normaux et les rejeteurs pourrait en partie s'expliquer par le design de notre étude, une « case-control », dans laquelle nous avons sélectionné des malades présentant des signes de rejet avéré (>1B-3A pour l'ACR et >pAMR1 pour l'AMR). Bien que cette approche soit pertinente dans le but d'isoler les biomarqueurs, nos résultats doivent être testés dans cohortes prospectives non sélectionnés de transplantés cardiaques. De plus, malgré nos résultats robustes, nous ne pouvons pas exclure que d'autres miARNs potentiellement pertinents pourraient être impliqués dans le rejet d'allogreffe cardiaque.

Ainsi, nos résultats serviront de base à de futures études sur la pertinence clinique de l'approche non-invasive miARN. Enfin, dans la pratique actuelle, la biopsie cardiaque reste obligatoire dans les situations cliniques, mais nous pensons que l'analyse des miARN sériques pourrait guider les cliniciens, aider au suivi et déterminer dans quels cas une biopsie de dépistage serait obligatoire.

#### **IV. Conclusion et perspectives**

Dans cette étude, nous avons démontré que la régulation de l'expression des miARN se produit pendant le rejet de greffe cardiaque, et pas seulement au niveau des tissus, mais aussi dans le sérum. Nous avons également montré que l'évaluation des miARN miR-10a, miR-31, miR-92a et miR-155 dans le sérum discriminait avec une grande précision les patients rejeteurs des patients non-rejeteurs. Cette étude suggère donc que les miARNs peuvent constituer des

biomarqueurs pertinents et non-invasifs permettant l'étude plus approfondie des phénomènes de rejet et le guidage du clinicien lors de la prise en charge des patients transplantés. Une pratique en routine n'est pas à exclure, au vu de la facilité technique, de la rapidité, de la bonne reproductibilité et de l'excellent caractère prédictif des dérégulations de ces quatre miARNs.

Une étude prospective est bien entendue nécessaire afin de valider ces résultats. Celle-ci va être mise en place grâce à une collaboration inter-centres à la rentrée 2014. Tous les patients transplantés sur une période d'un an vont être inclus dans la cohorte d'étude, à raison d'une biopsie à 1 mois, 3 mois, 6 mois et un an avec un prélèvement de sérum concomitant. La liste active des transplantés sera également prise en compte lors des bilans annuels des patients, avec un prélèvement sérique au moment de la biopsie de contrôle. Ces sérums seront extraits et testés pour les 4 miARNs mise en évidence dans l'étude test.

Le principal avantage de cette cohorte reposera sur le caractère non-sélectif des échantillons et de l'approche multi-centrique, offrant un nombre d'échantillons important. Néanmoins, l'incidence du rejet étant relativement faible, nous pourrions nous heurter à une faible abondance de biopsie d'intérêt, avec une redondance des biopsies R0-pAMR0.

En parallèle, certains de nos collaborateurs ayant mis au point un modèle murin miR-92a KO, des cultures de cellules endothéliales primitives ou encore des modèles de transplantation hétérotopique chez le rat, des modèles animaux et/ou cellulaires pourrait être mis en place afin d'étudier plus amplement les mécanismes d'interactions entre les miARNs d'intérêt et leurs molécules cibles dans l'endothélium, les lymphocytes, les fibroblastes et/ ou les cardiomyocytes. En effet, ces quatre miARNs ont une multitude de cibles potentielles, dont peu ont été formellement confirmées et, dans l'optique d'un traitement spécifique, une étude approfondie de ces cibles pourrait être bénéfique.

## **Conclusions et Perspectives Générales**

L'objectif actuel des chercheurs et cliniciens en transplantation est de faciliter le suivi de la greffe, de trouver des solutions afin d'alléger la prise en charge du patient et de moduler les traitements immunosuppresseurs pour l'adapter au plus près de la situation du greffon. Afin d'atteindre ces objectifs, la détection adéquate et précise du rejet aigu semble constituer la pierre angulaire des défis actuels en transplantation cardiaque.

Ce travail de thèse s'est donc intéressé à l'implémentation de la classification histologique du rejet aigu, d'une part *in situ*, avec l'activation de la voie mTOR détectable en immunohistochimie, et d'autre part, dans la circulation, avec la dérégulation des miARNs détectable par qPCR, lors du rejet.

Nous avons prouvé que la détection précoce de l'activation endothéliale par immunohistochimie P70S6K et pS6RP constituait un outil complémentaire aux immunomarquages déjà existants et permettait la classification correcte de formes tronquées, C4d négatives. Nous avons également étudié les corrélations entre les dérégulations des miARNs et l'incidence du rejet/des DSA et prouvé que ces dérégulations sériques étaient un marqueur du rejet. Ainsi, grâce à ces approches complémentaires, nous avons affiné la définition du rejet aigu permettant un meilleur et plus léger suivi du patient.

### ***Une autre application de ces biomarqueurs ?***

Le rejet chronique, de causes multiples mais avant tout immunologiques, est responsable d'une altération progressive et irréversible de la fonction du greffon. Au sein des cœurs en rejet, on observe une vasculopathie chronique spécifique de l'organe greffé, essentiellement fibrosante et proliférante. Les lésions d'artériosclérose accélérée du greffon diffèrent de celles de l'athérome classique, par leur diffusion et l'hyperplasie concentrique de l'intima qui respecte la limitante élastique interne.

Après transplantation cardiaque, se développe donc une coronaropathie chronique. L'apparition de signes cliniques d'insuffisance cardiaque est très tardive mais s'aggrave rapidement. Cette entité reste, à ce jour, l'un des défis majeurs de la transplantation cardiaque, du fait de son caractère fluctuant, chronique et silencieux.

Nous pouvons nous demander si les marqueurs mis en évidence par nos études ne seraient pas de bons marqueurs du rejet chronique et donc, de la vasculopathie d'allogreffe.

En effet, une partie des mécanismes régissant la mise en place d'une dysfonction chronique sont similaires à ceux observés dans le rejet aigu humoral, à savoir une activation endothéliale par les anticorps anti-HLA, suivie d'une prolifération néointimale via la voie mTOR et une fibrose des parois vasculaires.

Le marquage immunohistochimique mTOR aurait donc une place dans le diagnostic du rejet chronique, en caractérisant l'atteinte endothéliale dans la microcirculation des biopsies. Les miARNs pourraient également être étudiés, en reprenant les miARNs déjà mis en évidence dans le rejet aigu. D'autres miARNs endothéliaux et interstitiels pourraient être découverts via une approche par microarray.

## **Matériels et Méthodes**

# I. Cohortes d'études

## A. Partie I : Etude de la voie mTOR

### 1. Sélection des malades

La cohorte d'étude pour ce travail était prospective, exhaustive et non sélectionnée. Un total de 293 biopsies protocolaires issues de 113 patients, ont été réalisées au sein de l'HEGP entre Octobre 2009 et Novembre 2010. Un total de 280 EMB (sur les 293) était disponible et adéquat pour les évaluations histologiques et les marquages immunohistochimiques (complément et CD68). Parmi celles-ci, 149 disposaient de sérums concomitants et ont été testés pour les DSA. Enfin, toutes les biopsies démontrant une histologie positive pour le rejet humoral (pAMR1 et pAMR2, 32 cas) et disposant d'un dosage des DSA ont été évaluées pour l'activation *in situ* de la voie m-TOR en comparaison à 32 cas de pAMR0 randomisés.

Toutes les transplantations étaient ABO compatibles et crossmatch négatif au moment de la transplantation. Le système d'attribution de la transplantation était identique pour les 4 centres et a suivi les règles de l'organisme national français de l'achat d'organes (Agence de la biomédecine).

Dans notre centre, tous les greffés cardiaques bénéficient d'un protocole de suivi prédéterminé, à hauteur de trois biopsies dans le premier mois suivant la transplantation, puis une par mois jusqu'au sixième mois, puis une tous les six mois. La BEM protocolaire est effectuée dans une situation considérée comme stable, sans incident immunologique récent, chez des patients présentant des paramètres cliniques normaux, sans évolution négative de fraction d'éjection. Tous les patients étaient ainsi asymptomatiques au jour de la biopsie, définie par une fraction d'éjection normale ou stable évaluée par échocardiographie transthoracique.

Pour tous les patients, les données ont été recueillies en ce qui concerne le sexe, l'âge du receveur, de maladie cardiaque primaire, la date de la transplantation, le suivi, le temps d'ischémie froide et le régime d'immunosuppression. Pour l'évaluation de la vasculopathie d'allogreffe cardiaque (CAV), les angiographies et IVUS ont été

examinés. L'angiographie a été évaluée selon le rapport de notation ISHLT CAV 2010 [176].

## **2. Protocole d'étude**

Les 293 biopsies protocolaires prélevées chez les patients suivis à l'HEGP ont été relues et 13 d'entre elles ont été exclues car inadéquates pour l'analyse. Les 280 biopsies restantes ont fait l'objet d'une relecture histologique : en HES pour les lésions morphologiques et en immunohistochimie pour l'identification des capillaires positifs pour le C4d et des cellules intravasculaires CD68+.

Parmi ces 280 biopsies, 130 ont été exclues pour absence de DSA concomitant. Sur les 150 biopsies restantes, les 30 biopsies présentant un rejet ont été évaluées pour la voie mTOR et 30 biopsies R0-pAMR0 ont été randomisées pour former le groupe contrôle et testées pour la voie mTOR.

## **B. Partie II : Etude des miARNs**

### **1. Sélection des malades**

La seconde étude a inclus les transplantés cardiaques de l'hôpital Pitié-Salpêtrière (Paris, France) entre Janvier 2004 et Octobre 2010 ayant eu un diagnostic de rejet d'allogreffe (n = 43). Treize patients ont été exclus en raison d'un manque de matériel approprié pour l'évaluation des miARNs, résultant en un groupe rejet de 30 patients dans la cohorte test. Ce groupe de patients a été comparé à un groupe témoin de 30 patients transplantés au cours de la même période de temps, ne présentant pas de rejet d'allogreffe. Ces patients ont été appariés sur la base des critères suivants: l'âge du destinataire et sexe, l'âge et le sexe des bailleurs de fonds, le temps d'ischémie froide, traitements immunosuppresseurs, les maladies cardiaques primaire et le temps entre la transplantation et la biopsie. Tous les patients ont bénéficié d'un diagnostic histopathologique classique en même temps

que l'évaluation de l'expression des miARNs dans le tissu et de sérum prélevé au moment de la biopsie.

La cohorte de validation indépendante a été constituée de 53 patients issus de 3 centres de transplantation cardiaque (Necker (n = 25), Rouen (n = 19) et les hôpitaux de la Pitié-Salpêtrière n = 9)).

## **2. Protocole d'étude**

Cette étude a inclus deux cohortes distinctes.

La cohorte test incluait les patients de l'HEGP, dont le rejet était avéré et disposant d'un tissu congelé et de sérums concomitants (n=30) ainsi que des cas contrôles randomisés (n=30). L'analyse tissulaire s'est effectuée sur les biopsies congelées disponibles : après extraction, les ARNs ont été retro-transcrits puis analysés en qPCR. Sur cette cohorte test, les sérums concomitants des patients ont également été analysés par qPCR.

Dans un deuxième temps, une cohorte de validation, réunissant 53 patients issus de 3 centres hospitaliers indépendants de l'HEGP et dont le sérum concomitant des biopsies était disponible, a été analysé en qPCR.

## **C. Diagnostic histopathologique**

Les diagnostics sur biopsie ont été effectués de manière anonyme par les pathologistes des hôpitaux suivants : Hôpital Européen Georges Pompidou, Hôpital Necker, Enfants Malades, CHU de Rouen, CHU de Strasbourg et Hôpital de la Pitié Salpêtrière. Ces diagnostics étaient en accord avec la classification actuelle [177, 178].

Les DSA ont également été évalués pour chaque biopsie/patient en aveugle.

**Table 5** The 2013 ISHLT Working Formulation for Pathologic Diagnosis of Cardiac Antibody-Mediated Rejection

Grade	Definition	Substrates
pAMR 0	Negative for pathologic AMR	Histologic and immunopathologic studies are both negative.
pAMR 1 (H+)	Histopathologic AMR alone	Histologic findings are present and immunopathologic findings are negative.
pAMR 1 (I+)	Immunopathologic AMR alone	Histologic findings are negative and immunopathologic findings are positive (CD68+ and/or C4d+).
pAMR 2	Pathologic AMR	Histologic <b>and</b> immunopathologic findings are both present.
pAMR 3	Severe pathologic AMR	Interstitial hemorrhage, capillary fragmentation, mixed inflammatory infiltrates, endothelial cell pyknosis, and/or karyorrhexis, and marked edema <b>and</b> immunopathologic findings are present. These cases may be associated with profound hemodynamic dysfunction and poor clinical outcomes.

AMR, antibody-mediated rejection.

Figure 14. ISHLT working formulation pour le diagnostic de rejet humoral [178].

## II. Marquages histologiques

### A. Techniques de marquages morphologiques

Les blocs d'inclusion en paraffine des biopsies étudiées lors des deux études, ont été coupés pour les techniques d'immunohistochimie. Des colorations à l'Hémalum Eosine Safran ont été réalisées après déparaffinage (deux bains successifs de xylène pendant 5 min chacun) et réhydratation des lames (deux bains successifs dans de l'alcool à 95° puis à 80° suivis d'un bain dans l'eau, pendant 5 min chacun) par un automate de coloration.

### B. Immunohistochimie C4d/CD68

En immunohistochimie, la technique de coloration est enzymatique et consiste en une réaction utilisant la peroxydase et un substrat coloré, la DAB (diaminobenzidine). Les lames ont subi six bains successifs : trois bains de xylène de 10 min chacun, puis trois bains d'alcool à 100° de 2 min chacun. La technique de marquage du C4d (Biomedica, dilution au 1/100) est réalisée ensuite dans un

automate Nexes (Ventana). Le montage des lames (grâce au liquide de montage Pertex®) a été effectué après rinçage à l'eau savonneuse puis passage bref dans les trois bains de xylène et les trois bains d'Alcool 100°. Le marquage CD68 a été réalisé avec un anticorps monoclonal (DackoCytomation, Glostrup, Denmark) en utilisant la même technique d'immunoperoxidase.

### **C. Immunohistochimie mTOR**

L'immunohistochimie mTOR a été réalisée suivant le même protocole que Lepin et al., [46, 179] avec une mise au point spécifique aux anticorps utilisés.

Les biopsies endomyocardiques ont été déparaffinées dans le xylène et réhydratées dans des gradients d'alcool. Elles sont ensuite placées dans une étuve avec 10 mM de tampon de citrate de sodium (pH 6.0) pendant 25 min. L'activité endogène de la peroxydase a été inhibée par l'incubation des biopsies dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 15 min. Les coupes ont été incubées dans du sérum de chèvre à 10% dilué dans le PBS afin de bloquer les sites non spécifiques.

Les anticorps anti-phospho-S6RP (Serine 235/236) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) et anti-P70S6K (Threonine 389) ont été dilués au 1/100 et 1/1000 respectivement. Cent microlitres ont été appliqués sur chaque lame. L'anticorps primaire a été incubé pendant la nuit à 4°C. Le second anticorps une IgG goat anti-rabbit biotinylée (Vector) dilué au 1/200 a été incubé pendant 40 min à température ambiante. Après trois lavages dans le PBS, les coupes sont incubées avec du HRP (horseradish peroxidase avidin D) dilué au 1/1000. Après trois lavages en PBS, les biopsies ont été développées avec le kit DAB (Vector). Enfin, les coupes ont été réhydratées en gradient d'alcool, passées dans un bain de xylène et montées.

Les biopsies ont été gradées par deux pathologistes selon la gradation suivante  
0 = pas de marquage; 1 = marquage rare; 2 = marquage focal; 3 = marquage multifocal; 4 = marquage diffus.

Un score supérieur ou égal à 3 était considéré comme positif. Le marquage des

myocytes et des cellules inflammatoires intra-capillaires n'a pas été pris en compte dans la gradation.

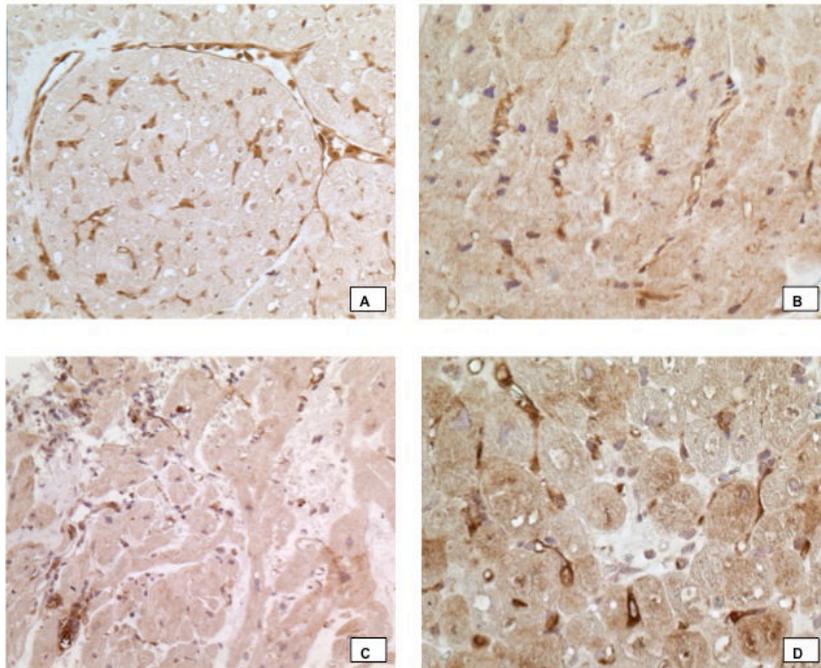


Figure 15. Marquage endothélial de la voie mTOR sur des biopsies endomyocardiques.

(A) P70S6K x20, (B) P70S6K x40, (C) pS6RP x 20, (D) pS6RP x40.

### III. Etudes *in silico*

Afin de déterminer s'il existe des liens entre les miRNAs étudiés et des protéines d'intérêt engagées dans l'adhérence cellulaire (VCAM, ICAM), l'inflammation (Heparane Sulfate, CD40) ou le dommage endothélial (eNOS), nous avons procédé à une analyse *in silico*. Ces divers phénomènes étant très liés à l'activation endothéliale observable dans les rejets humoraux, il nous a paru essentiel de se concentrer sur la recherche d'interactions avec les protéines citées et ce, dans un contexte tissu-spécifique. Les spécificités tissulaires et les cibles potentielles des miRNAs d'intérêt ont été identifiés par analyse bio-informatique à l'aide des algorithmes TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) MicroRNA (<http://www.microrna.org/>) et STRING (<http://www.string-db.org/>). Ces algorithmes prennent en compte plusieurs paramètres pour déterminer les cibles potentielles: en premier lieu la complémentarité de bases avec la « seed-sequence » située en 5' UTR du miRNA, mais aussi la présence de MRE (MiRNA Recognition Element), la

proximité d'un codon stop, la position par rapport à la région 3'UTR, la composition en séquences AU et la structure de l'ARNm cible.

Le résultat de ces recherches est résumé dans le tableau 2.

	<b>Known implications in heart/transplantation - related diseases</b>	<b>in Known regulations/interactions</b>
<b>miRNAs mostly found in the endothelium</b>		
miR-92a	Apoptosis	eNOS, JUN/FOS pathway, integrin $\alpha$ 5, KLF2/4
miR-221	Hypertrophy, endothelial dysfunction	ICAM1, p27, c-kit, Ets-1
miR-296	Angiogenesis, hypertension, ischemia	VEGFR2
miR-126	Endothelial damage and injury, lipid metabolism, angiogenesis	VCAM1, SPRED1, <i>PIK3RS</i> , CXCL12. Reduced in coronary heart disease.
<b>miRNAs involved in inflammatory response</b>		
miR-155	Cellular migration, cell survival (cytokines), necrosis, NK cells.	eNOS, RIP1, Ang2, Bcl6, Ets-1, HO-1. Increased in coronary artery disease
miR-142-3p	Inflammatory response	
miR-451	Cell migration	Pi3K, ROS, Ago2, AMPK
miR-182	Present in PBMC	Increased in kidney transplanted patients with AR
miR-10a	Atherosclerosis, shear stress	MAPK, NF $\kappa$ B Increased in kidney transplanted patients with AR
miR-181b	Vascular inflammation, atherosclerosis	NF $\kappa$ B (importin $\alpha$ 3), TGF $\beta$
miR-181a	Acute cellular rejection, endothelial senescence	Increased in CD4 cells
<b>Cardiac-enriched miRNAs</b>		
miR-21	Ischemia, endothelial cell proliferation, pro-fibrosis, pro-apoptosis, hypertension, shear stress	<i>Spry1</i> , ERK/MAPK, PI3K/AKT, eNOS, BCL2/PTEN, Smad family, PPAR $\alpha$
miR-31	Fibrosis	HIF-1, IL-2, e-selectin
miR-208a	Infarct, hypertrophy	$\alpha/\beta$ myosin, connexins

Tableau 2. Résultat des explorations in silico concernant les miARNs d'intérêt.

## **IV. Extraction des ARNs**

### **A. Dans le tissu**

Les biopsies endomyocardiques décongelées ont été broyées avec 1ml de tampon de lyse et 100 µl d'Homogenate Additive du miRVANA miRNA Extraction Kit® (Ambion ®). L'ensemble des ARN totaux (ARNm et miARNs) a été extrait sur colonnes à l'aide du même kit, selon le protocole du fabricant. La concentration d'ARN total a ensuite été mesurée avec le spectrophotomètre NanoDrop Technologies ND-1000® (Labtech France).

### **B. Dans le sérum**

L'extraction d'ARN total (et miARN) à partir de sérum a été réalisée avec le kit Qiagen miRNeasy sérum / plasma suivant les recommandations du Fabricant (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). ARN sont ensuite dosés et évalués avec un Nanodrop.

## **V. PCR en temps réel**

### **A. Reverse transcription**

Toutes les étapes qui suivent sont réalisées en prenant les précautions nécessaires pour éviter la dégradation des ARN par les ribonucléases exogènes.

Une transcription inverse «amorce-spécifique» a d'abord été réalisée. Cinq µl d'ARN total préalablement dilués à 1 µg/µl ont été mélangés à 3 µl d'amorces spécifiques du miRNA à étudier et à 7 µl d'une solution comprenant 0,15 µl de nucléotides, 1 µl de MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1,5 µl de RT Buffer, 0,19 µl de RNase inhibitor et 4,16 µl d'eau RNase-free. La

réaction a été effectuée dans un thermocycleur PTC 200 (WTR International) et comporte une étape de 30 minutes à 16°, puis 30 minutes à 42° suivis de 5 minutes à 95°.

## **B. PCR en temps réel**

Le niveau d'expression des miRNAs a été quantifié par qPCR. Chaque échantillon a été testé en duplicat, sur des plaques 384 puits. Dans chaque puit, 2,5 µl de la solution d'ADNc ont été mélangés à 9,46 µl de TaqMan 2X Universal PCR Master Mix No Emperase UNG (Applied Biosystems), 0,95 µl de primers 20X TaqMan MicroRNA Assay et 7,09 µl d'eau RNase-free afin d'obtenir un volume final de 20 µl. Le programme de qPCR comprenait une étape d'activation de la Taq polymérase de 10 minutes à 95° puis 40 cycles comprenant chacun 15 secondes à 95° et 1 minute à 60°. Il a été réalisé avec un système de détection ABI PRISM® 7900HT Fast System en mode 9600 Emulation, à l'aide du logiciel SDS 2.3 (Applied Biosystems).

## **C. Analyse des données**

L'analyse des données brutes a été effectuée par la méthode des Fold, en utilisant comme gène rapporteur l'ARN nucléolaire RNU48. Le Ct du gène rapporteur a été soustrait aux Ct de chaque miARN afin d'obtenir le  $\Delta Ct$ . A cette valeur a été soustraite la moyenne des  $\Delta Ct$  de la population pour obtenir le  $\Delta\Delta Ct$ . Enfin, le fold a été calculé suivant la formule suivante  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Toutes les analyses statistiques ont ensuite été effectuées avec cette valeur.

Lors de notre analyse, une amplification était considérée comme non exploitable si le Ct était supérieur à 35. Si un miARN amplifiait à un  $Ct > 35$  pour plus de 50% des échantillons, ce miARN était également considéré comme non exploitable.

## **VI. Hybridation *in situ***

### **A. Préparation des sondes**

Les sondes utilisées lors de ces expériences sont les sondes LNA-probe de Exiqon (Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark). Elles sont toutes marquées DIG en 3' et 5' et sont préparées afin d'obtenir une concentration de 20 nM pour les sondes miARNs spécifiques et 10 nM pour le contrôle U6. Avant incubation, elles sont préparées selon le protocole Exiqon et mélangées avec la Denaturing Hybridization Solution détaillée ci-après.

### **B. Hybridation et rinçages**

Après deparafinisation des coupes (xylène, alcool décroissant 100%-30%), le tissu a été fixé avec du PFA 4% pendant 10 min, lavé au PBS-DEPC et baigné dans la solution d'acétylation (thiéthanolamide 0,1%, HCl 37%, anhydride acétique et H<sub>2</sub>O DEPC). Les coupes ont été ensuite lavées et incubées avec la protéinase K (5µg/mL, Sigma-Aldrich) à 37°C pendant 10 min. Après lavage, les lames sont incubées en chambre humide (SSC 2X) pendant 5h avec le tampon d'hybridation (Formamide 50%, SSC 5X, Denhardt 5X, Yeast RNA 200µg/ml, salmon sperm DNA 500 µg/ml, Roche Blocking Reagent). La sonde pour chaque miARN a été ensuite ajoutée à une préparation contenant le tampon d'hybridation complété de CHAPS 10% et 20% Tween (Denaturing Hybridization Solution). Les coupes ont été incubées avec cette solution pendant une nuit à 56°C dans une étuve sèche puis rincées en SSC (5X, 1X et 0,2X) d'abord à 56°C puis à température ambiante. Les sections ont ensuite été rincées avec une solution de B1 (Tris pH 7,5, 0,1M, NaCl 0.15M) pendant 10 min et incubées avec la solution de blocage (FCS filtré 3%, Solution B1 et tween 0,1%) pendant 1h. Les anticorps anti-DIG (dilué au 1/2000) sont ensuite ajoutés à la solution de blocage et les sections sont incubées pendant une nuit à 4°C. Les coupes sont ensuite lavées avec la solution B1 pendant 5 min et

une solution NTMT/lévamisole (Tris pH 9,5, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, Tween 20%, Levamisole 0,2mM) pendant 10 min. Les sections ont ensuite été révélées avec la solution de NBT / BCIP (Promega) pendant 3 heures à 5 jours, en fonction du miRNA concerné.

Les coupes sont finalement lavées au NTMT/Levamisole, au PBS puis incubées avec du PFA 4% et montées (Aqueous mount).

## VII. Outils statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels Statview (Abacus Concept Inc., Berkeley, Ca, USA), STATA 11,0 logiciel (Stata Corporation, College Station, Texas, USA) et GraphPad Prism (Ritme, Paris). La comparaison multiple des moyennes a été effectuée par l'analyse de la variance (ANOVA). Lorsque approprié, les moyennes et les proportions ont été étudiées avec le test t de Student et le test du chi-2 (ou le test exact de Fisher). L'analyse non paramétrique (Kruskal Wallis et Mann Whitney tests) ont été effectuées, le cas échéant. La significativité a été obtenue lorsque  $p < 0,05$ .

La pertinence de l'expression des miARN identifiés dans les rejets d'allogreffes a été étudiée par des méthodes non supervisées, telles que l'analyse par clustering hiérarchique et l'analyse en composantes principales basée sur la combinaison de l'expression des 14 miARN (valeur de fold ( $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ )). L'analyse et les dendrogrammes de classification hiérarchique ont été effectuées avec le module de hcluster du logiciel AMAP (Rsoftware) tandis que les analyses en composantes principales ont été effectuées à l'aide du module de dudi.pca du logiciel R (version 2.10.1). Tous les tests étaient bilatéraux.

## **Bibliographie**

1. Loupy, A., G.S. Hill, and S.C. Jordan, *The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(6): p. 348-57.
2. Soleimani, B., et al., *Role of alloantibodies in the pathogenesis of graft arteriosclerosis in cardiac transplantation*. Am J Transplant, 2006. **6**(8): p. 1781-5.
3. Raichlin, E., et al., *Cardiac allograft remodeling after heart transplantation is associated with increased graft vasculopathy and mortality*. Am J Transplant, 2009. **9**(1): p. 132-9.
4. Kumbala, D. and R. Zhang, *Essential concept of transplant immunology for clinical practice*. World J Transplant, 2013. **3**(4): p. 113-8.
5. Wei, L., *Immunological aspect of cardiac remodeling: T lymphocyte subsets in inflammation-mediated cardiac fibrosis*. Exp Mol Pathol, 2011. **90**(1): p. 74-8.
6. Dong, M., et al., *Cellular and physiological mechanisms of new-onset diabetes mellitus after solid organ transplantation*. Diabet Med, 2012. **29**(7): p. e1-12.
7. Zakliczynski, M., et al., *In the era of the universal use of statins dyslipidemia's are still common in heart transplant recipients: a cross-sectional study*. Transplant Proc, 2011. **43**(8): p. 3071-3.
8. Cohen, D., et al., *Pros and cons for C4d as a biomarker*. Kidney Int, 2012. **81**(7): p. 628-39.
9. Loupy, A., et al., *Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA)*. Am J Transplant, 2011. **11**(1): p. 56-65.
10. Crespo-Leiro, M.G., et al., *Humoral heart rejection (severe allograft dysfunction with no signs of cellular rejection or ischemia): incidence, management, and the value of C4d for diagnosis*. Am J Transplant, 2005. **5**(10): p. 2560-4.
11. Fedrigo, M., et al., *Can C4d immunostaining on endomyocardial biopsies be considered a prognostic biomarker in heart transplant recipients?* Transplantation, 2010. **90**(7): p. 791-8.
12. Cornell, L.D., R.N. Smith, and R.B. Colvin, *Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 189-220.

13. Ma, F., et al., *The requirement of CD8+ T cells to initiate and augment acute cardiac inflammatory response to high blood pressure*. J Immunol, 2014. **192**(7): p. 3365-73.
14. Charreau, B.a., *Signaling of endothelial cytoprotection in transplantation*. Hum Immunol, 2012. **73**: p. 1245-1252.
15. Coggins, M. and A. Rosenzweig, *The fire within: cardiac inflammatory signaling in health and disease*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 116-25.
16. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-93.
17. Miura, M., et al., *Monokine Induced by IFN- Is a Dominant Factor Directing T Cells into Murine Cardiac Allografts During Acute Rejection*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(6): p. 3494-3504.
18. Al-Lamki, R.S., J.R. Bradley, and J.S. Pober, *Endothelial cells in allograft rejection*. Transplantation, 2008. **86**(10): p. 1340-8.
19. Drachenberg, C.B. and J.C. Papadimitriou, *Endothelial injury in renal antibody-mediated allograft rejection: a schematic view based on pathogenesis*. Transplantation, 2013. **95**(9): p. 1073-83.
20. G. Einecke, P.F.H., *Comment, les lymphocytes t, rejettent-ils les greffes de rein ?mecanismes du rejet d'allogreffe medie par les lymphocytes t*. Flammarion Medecine-Sciences, 2009.
21. Wu, G.W., et al., *Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes*. J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(5): p. 417-22.
22. Loupy, A., et al., *Very Late Heart Transplant Rejection is Associated with Microcirculation Injury, Complement Deposition and Progression to Chronic Allograft Vasculopathy* Am J Transplant, 2011. **11**(7): p. 1478-87.
23. Tambur, A.R., et al., *The Presence of HLA-Directed Antibodies after Heart Transplantation Is Associated with Poor Allograft Outcome*. Transplantation, 2005. **80**(8): p. 1019-1025.
24. 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.
25. Mehra, N.K., et al., *Clinical relevance of antibody development in renal transplantation*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1283**: p. 30-42.

26. Smith, J.D., et al., *C4d fixing, luminex binding antibodies - a new tool for prediction of graft failure after heart transplantation*. Am J Transplant, 2007. **7**(12): p. 2809-15.
27. Loupy, A., et al., *Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival*. N Engl J Med, 2013. **369**(13): p. 1215-26.
28. Zhang, Q., et al., *HLA and MICA: targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation*. Transplantation, 2011. **91**(10): p. 1153-8.
29. Terasaki, P.I., M. Ozawa, and R. Castro, *Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival*. Am J Transplant, 2007. **7**(2): p. 408-15.
30. Yizhou Zou, et al., *Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection*. New Engl. J. Med., 2007. **357**(13).
31. Kwun, J., et al., *Altered Distribution of H60 Minor H Antigen-Specific CD8 T Cells and Attenuated Chronic Vasculopathy in Minor Histocompatibility Antigen Mismatched Heart Transplantation in Cxcr3<sup>-/-</sup> Mouse Recipients*. The Journal of Immunology, 2007. **179**(12): p. 8016-8025.
32. Beatrice Bolinger, et al., *Immunologic ignorance of vascular endothelial cells expressing minor histocompatibility antigen*. Blood, 2007. **111**(9).
33. Reinsmoen, N.L., et al., *Increased negative impact of donor HLA-specific together with non-HLA-specific antibodies on graft outcome*. Transplantation, 2014. **97**(5): p. 595-601.
34. Sigdel, T.K. and M.M. Sarwal, *Moving beyond HLA: a review of nHLA antibodies in organ transplantation*. Hum Immunol, 2013. **74**(11): p. 1486-90.
35. Opelz, G., *Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies*. The Lancet, 2005. **365**(9470): p. 1570-1576.
36. Servettaz, A., et al., *Natural anti-endothelial cell antibodies*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(6): p. 426-30.
37. Amico, P., et al., *Incidence and prediction of early antibody-mediated rejection due to non-human leukocyte antigen-antibodies*. Transplantation, 2008. **85**(11): p. 1557-63.
38. Zhang, X. and E.F. Reed, *Effect of antibodies on endothelium*. Am J Transplant, 2009. **9**(11): p. 2459-65.

39. Azimzadeh, A.M., et al., *Humoral immunity to vimentin is associated with cardiac allograft injury in nonhuman primates*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(10): p. 2349-59.
40. Rose, M.L., *Role of anti-vimentin antibodies in allograft rejection*. *Hum Immunol*, 2013. **74**(11): p. 1459-62.
41. Duska Dragun, et al., *Angiotensin II Type 1–Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection*. *New Engl. J. Med.*, 2005. **352**(6).
42. Stegall, M.D., M.F. Chedid, and L.D. Cornell, *The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation*. *Nat Rev Nephrol*, 2012. **8**(11): p. 670-8.
43. Hirohashi, T., et al., *A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody*. *Am J Transplant*, 2012. **12**(2): p. 313-21.
44. Colvin, R.B., *Antibody - mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis*. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007. **18**: p. 1046-1056.
45. Hidalgo, L.G., et al., *NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection*. *Am J Transplant*, 2010. **10**(8): p. 1812-22.
46. Lepin, E.J., et al., *Phosphorylated S6 ribosomal protein: a novel biomarker of antibody-mediated rejection in heart allografts*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(7): p. 1560-71.
47. Masetti, M., et al., *Differential Effect of Everolimus on Progression of Early and Late Cardiac Allograft Vasculopathy in Current Clinical Practice*. *American Journal of Transplantation*, 2013: p. n/a-n/a.
48. Shah, A., et al., *Treatment of C4d-Positive Acute Humoral Rejection with Plasmapheresis and Rabbit Polyclonal Antithymocyte Globulin*. *Transplantation*, 2004. **77**(9): p. 1399-1405.
49. Kobashigawa, J.A., et al., *Tacrolimus with mycophenolate mofetil (MMF) or sirolimus vs. cyclosporine with MMF in cardiac transplant patients: 1-year report*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(6): p. 1377-86.
50. Devos, J.M., et al., *Intermediate-term graft loss after renal transplantation is associated with both donor-specific antibody and acute rejection*. *Transplantation*, 2014. **97**(5): p. 534-40.

51. Hanf, W., C.S. Bonder, and P.T. Coates, *Transplant glomerulopathy: the interaction of HLA antibodies and endothelium*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 549315.
52. Peters, K., *Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis*. Cardiovascular Research, 2003. **60**(1): p. 49-57.
53. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.
54. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 8): p. 1713-9.
55. Sciarretta, S., M. Volpe, and J. Sadoshima, *Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease*. Circ Res, 2014. **114**(3): p. 549-64.
56. Yano, T., et al., *Pivotal role of mTORC2 and involvement of ribosomal protein S6 in cardioprotective signaling*. Circ Res, 2014. **114**(8): p. 1268-80.
57. Avery, R.K., *Cardiac-Allograft Vasculopathy*. New Engl. J. Med., 2003. **349**(9).
58. Hulsmans, M. and P. Holvoet, *The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(1-2): p. 70-8.
59. Labarrere, C.A., et al., *Early prediction of cardiac allograft vasculopathy and heart transplant failure*. Am J Transplant, 2011. **11**(3): p. 528-35.
60. Wu, Y.-W., et al., *Value of circulating adhesion molecules in assessing cardiac allograft vasculopathy*. J. Heart Lung Transplant., 2003. **22**(11): p. 1284-1287.
61. Michaels Paul J., et al., *Humoral Rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease*. J. Heart Lung Transplant., 2002.
62. Jon Kobashigawa, et al., *Longitudinal Study of Vascular Remodeling in Coronary Arteries after Heart Transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2000.
63. Cheuk-Kit Wong, et al., *Role of Vascular Remodeling in the Pathogenesis of Early Transplant Coronary Artery Disease: A Multicenter Prospective Intravascular Ultrasound Study*. J Heart Lung Transplant, 2000.
64. Fearon, W.F., et al., *Changes in coronary arterial dimensions early after cardiac transplantation*. Transplantation, 2007. **83**(6): p. 700-5.

65. Lund, L.H., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report--2013; focus theme: age*. J Heart Lung Transplant, 2013. **32**(10): p. 951-64.
66. Howard J. Eisen, et al., *Everolimus for the Prevention of Allograft Rejection and Vasculopathy in Cardiac- Transplant Recipients*. New Engl. J. Med., 2003. **349**(9).
67. Carmen Lefaucheur, et al., *Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study*. The Lancet, 2013. **381**.
68. George JF, et al., *Serial measurements of interleukin-6, interleukin-8, tumor necrosis factor-alpha, and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in the peripheral blood plasma of human cardiac allograft recipients*. J Heart Lung Transplant, 1997. **16**(10): p. 1046-53.
69. Perez-Villa, F., et al., *Elevated levels of serum interleukin-6 are associated with low grade cellular rejection in patients with heart transplantation*. Transplant Proc, 2006. **38**(9): p. 3012-5.
70. Masters, R.G., et al., *Discoordinate Modulation of Natriuretic Peptides During Acute Cardiac Allograft Rejection in Humans*. Circulation, 1999. **100**(3): p. 287-291.
71. E. Campana, et al., *Are elevated levels of soluble ICAM-1 a marker of chronic graft disease in heart transplant recipients?* Atherosclerosis, 2000. **148**: p. 293-295.
72. Alexandre Loupy, et al., *Molecular Microscope Strategy To Improve Risk Stratification In Kidney Allograft Rejection*. JASN, 2013.
73. Scian, M.J., et al., *Identification of biomarkers to assess organ quality and predict posttransplantation outcomes*. Transplantation, 2012. **94**(8): p. 851-8.
74. Srivastava, M., et al., *Elevated expression levels of ANXA11, integrins beta3 and alpha3, and TNF-alpha contribute to a candidate proteomic signature in urine for kidney allograft rejection*. Proteomics Clin Appl, 2011. **5**(5-6): p. 311-21.
75. Chen, R., et al., *Differentially expressed RNA from public microarray data identifies serum protein biomarkers for cross-organ transplant rejection and other conditions*. PLoS Comput Biol, 2010. **6**(9).

76. Le Roux, S., et al., *Biomarkers for the diagnosis of the stable kidney transplant and chronic transplant injury using the ProtoArray(R) technology*. *Transplant Proc*, 2010. **42**(9): p. 3475-81.
77. Mueller, T.F. and V.R. Mas, *Microarray applications in nephrology with special focus on transplantation*. *J Nephrol*, 2012. **25**(5): p. 589-602.
78. Halloran, P.F., et al., *Potential impact of microarray diagnosis of T cell-mediated rejection in kidney transplants: The INTERCOM study*. *Am J Transplant*, 2013. **13**(9): p. 2352-63.
79. Sis, B., et al., *Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining*. *Am J Transplant*, 2009. **9**(10): p. 2312-23.
80. Karason, K., et al., *Evaluation of CXCL9 and CXCL10 as circulating biomarkers of human cardiac allograft rejection*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2006. **6**: p. 29.
81. Deng, M.C., et al., *Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(1): p. 150-60.
82. Michael X. et al., *Gene-Expression Profiling for Rejection Surveillance after Cardiac Transplantation*. *New Engl. J. Med.*, 2010. **362**(20).
83. Mengel, M., et al., *The molecular phenotype of heart transplant biopsies: relationship to histopathological and clinical variables*. *Am J Transplant*, 2010. **10**(9): p. 2105-15.
84. Holweg, C.T., et al., *Identification and classification of acute cardiac rejection by intragraft transcriptional profiling*. *Circulation*, 2011. **123**(20): p. 2236-43.
85. Lamirault, G., et al., *Molecular risk stratification in advanced heart failure patients*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(6B): p. 1443-52.
86. Lin, D., et al., *Molecular signatures of end-stage heart failure*. *J Card Fail*, 2011. **17**(10): p. 867-74.
87. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.
88. Sonkoly, E. and A. Pivarcsi, *Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(1): p. 24-38.

89. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
90. Berezikov, E., *Evolution of microRNA diversity and regulation in animals*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(12): p. 846-60.
91. Schanen, B.C. and X. Li, *Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes*. Genomics, 2011. **97**(1): p. 1-6.
92. Oszolak, F., et al., *Chromatin structure analyses identify miRNA promoters*. Genes Dev, 2008. **22**(22): p. 3172-83.
93. Hwang, H.W., E.A. Wentzel, and J.T. Mendell, *A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import*. Science, 2007. **315**(5808): p. 97-100.
94. Berezikov, E., et al., *Mammalian mirtron genes*. Mol Cell, 2007. **28**(2): p. 328-36.
95. Julia Winter, S.J., Sarina Keller, Richard I. Gregory, Sven Diederichs, *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3).
96. Nottrott, S., M.J. Simard, and J.D. Richter, *Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1108-14.
97. Petersen, C.P., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 533-42.
98. Zampetaki, A., et al., *Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(4): p. 290-9.
99. Garzon, R., G. Marcucci, and C.M. Croce, *Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(10): p. 775-89.
100. Kota, J., et al., *Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1005-17.
101. Zeevi, A., et al., *Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients*. J Heart Lung Transplant, 2013. **32**(1): p. 98-105.
102. Bachelet, T., et al., *Kidney intragraft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome*. Am J Transplant, 2013. **13**(11): p. 2855-64.

103. Loupy, A., et al., *Very late heart transplant rejection is associated with microvascular injury, complement deposition and progression to cardiac allograft vasculopathy*. Am J Transplant. **11**(7): p. 1478-87.
104. Bayliss, J., et al., *Late onset antibody-mediated rejection and endothelial localization of vascular endothelial growth factor are associated with development of cardiac allograft vasculopathy*. Transplantation, 2008. **86**(7): p. 991-7.
105. Jindra, P.T., et al., *HLA Class I Antibody-Mediated Endothelial Cell Proliferation via the mTOR Pathway*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(4): p. 2357-2366.
106. Jin, Y.P., et al., *Everolimus inhibits anti-HLA I antibody-mediated endothelial cell signaling, migration and proliferation more potently than sirolimus*. Am J Transplant, 2014. **14**(4): p. 806-19.
107. Li, F., M.E. Atz, and E.F. Reed, *Human leukocyte antigen antibodies in chronic transplant vasculopathy-mechanisms and pathways*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(5): p. 557-62.
108. Ketroutsi, F., et al., *Lymphocyte cell-cycle inhibition by HLA-G is mediated by phosphatase SHP-2 and acts on the mTOR pathway*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22776.
109. Zhang, L., et al., *Abrogation of chronic rejection in rat model system involves modulation of the mTORC1 and mTORC2 pathways*. Transplantation, 2013. **96**(9): p. 782-90.
110. M Fedrigo , et al., *Inflammatory cell burden and phenotype in endomyocardial biopsies with antibody-mediated rejection (AMR) - A multicenter pilot study from the AECVP*. Am J Transplant, in press.
111. Murata, K. and W.M. Baldwin, 3rd, *Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection*. Transplant Rev (Orlando), 2009. **23**(3): p. 139-50.
112. Asgeirsdottir, S.A., et al., *MicroRNA-126 contributes to renal microvascular heterogeneity of VCAM-1 protein expression in acute inflammation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(12): p. F1630-9.
113. Jing Zhou, K.-C.W., Wei Wu, Shankar Subramaniam, John Y.-J. Shyy, Jeng-Jiann Chiu, Julie Y.-S. Li, Shu Chien, *MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators- activated receptor- $\alpha$  in an autoregulatory loop to modulate flow-*

- induced endothelial inflammation*. Proc Natl Acad Sci, 2011. **108**(25): p. 10355–10360.
114. Weber, M., et al., *MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(4): p. 643-8.
  115. Ren, J., et al., *Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e80738.
  116. Willeit, P., et al., *Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation*. Circ Res, 2013. **112**(4): p. 595-600.
  117. Nazari-Jahantigh, M., Y. Wei, and A. Schober, *The role of microRNAs in arterial remodelling*. Thromb Haemost, 2012. **107**(4): p. 611-8.
  118. Nazari-Jahantigh, M., et al., *MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages*. J Clin Invest, 2012. **122**(11): p. 4190-202.
  119. Olof Gidlöf, J.G.S., Kazuma Miyazu, Patrik Gilje, Anna Spencer, Sten Blomquist and David Erlinge, *Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction*. BMC Genomics, 2013. **13**(12).
  120. Quiat, D. and E.N. Olson, *MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 11-8.
  121. Fichtlscherer, S., et al., *Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease*. Circ Res, 2010. **107**(5): p. 677-84.
  122. Fichtlscherer, S., A.M. Zeiher, and S. Dimmeler, *Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2383-90.
  123. Diehl, P., et al., *Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation*. Cardiovasc Res. **93**(4): p. 633-44.
  124. Sukma Dewi, I., et al., *Altered serum miRNA profiles during acute rejection after heart transplantation: potential for non-invasive allograft surveillance*. J Heart Lung Transplant, 2013. **32**(4): p. 463-6.
  125. Anglicheau, D., et al., *MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status*. Proc Natl Acad Sci, 2009. **106**(13): p. 5330-5.

126. Wei, L., et al., *Differential expression and functions of microRNAs in liver transplantation and potential use as non-invasive biomarkers*. *Transpl Immunol*, 2013. **29**(1-4): p. 123-9.
127. Hu, J., et al., *Plasma microRNA, a potential biomarker for acute rejection after liver transplantation*. *Transplantation*, 2013. **95**(8): p. 991-9.
128. Sotolongo, B., et al., *Gene expression profiling of MicroRNAs in small-bowel transplantation paraffin-embedded mucosal biopsy tissue*. *Transplant Proc*, 2010. **42**(1): p. 62-5.
129. Asaoka, T., et al., *MicroRNA signature of intestinal acute cellular rejection in formalin-fixed paraffin-embedded mucosal biopsies*. *Am J Transplant*, 2012. **12**(2): p. 458-68.
130. Zampetaki, A., et al., *Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes*. *Circ Res*, 2010. **107**(6): p. 810-7.
131. Fish, J.E., et al., *miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity*. *Dev Cell*, 2008. **15**(2): p. 272-84.
132. Harris, T.A., et al., *MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1*. *Proc Natl Acad Sci*, 2008. **105**(5): p. 1516-21.
133. Bonauer, A., et al., *MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice*. *Science*, 2009. **324**(5935): p. 1710-3.
134. Loyer, X., et al., *Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice*. *Circ Res*. **114**(3): p. 434-43.
135. Fang, Y., et al., *MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(30): p. 13450-5.
136. Wurdinger, T., et al., *miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(5): p. 382-93.
137. Anand, S. and D.A. Cheresh, *Emerging Role of Micro-RNAs in the Regulation of Angiogenesis*. *Genes Cancer*, 2011. **2**(12): p. 1134-8.
138. Wang, S. and E.N. Olson, *Angiomirs--key regulators of angiogenesis*. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. **19**(3): p. 205-11.

139. Cantaluppi, V., et al., *Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells*. *Kidney Int*, 2012. **82**(4): p. 412-27.
140. Thum, T., et al., *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. *Nature*, 2008. **456**(7224): p. 980-4.
141. Jin, C., et al., *MicroRNA-21 mediates the rapamycin-induced suppression of endothelial proliferation and migration*. *FEBS Lett*, 2013. **587**(4): p. 378-85.
142. Ma, X., et al., *MicroRNAs in NF-kappaB signaling*. *J Mol Cell Biol*, 2011. **3**(3): p. 159-66.
143. Da Costa Martins, P.A. and L.J. De Windt, *miR-21: a miRaculous Socratic paradox*. *Cardiovasc Res*, 2010. **87**(3): p. 397-400.
144. Jiang, Y., et al., *Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular diseases*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 5026.
145. Patrick, D.M., et al., *Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(11): p. 3912-6.
146. Takahashi, M., et al., *Angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha synergistically promote monocyte chemoattractant protein-1 expression: roles of NF-kappaB, p38, and reactive oxygen species*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(6): p. H2879-88.
147. Tili, E., C.M. Croce, and J.J. Michaille, *miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer*. *Int Rev Immunol*, 2009. **28**(5): p. 264-84.
148. Esmerina Tili, J.-J.M., Carlo M. Croce, *MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer*. *Immunological Reviews*, 2013. **253**: p. 167-184.
149. Lind, E.F. and P.S. Ohashi, *Mir-155, a central modulator of T-cell responses*. *Eur J Immunol*. **44**(1): p. 11-5.
150. Heymans, S., et al., *Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure*. *Circulation*, 2013. **128**(13): p. 1420-32.
151. Stanczyk, J., et al., *Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(4): p. 1001-9.
152. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. *Proc Natl Acad Sci*, 2007. **104**(5): p. 1604-9.

153. Trotta, R., et al., *miR-155 regulates IFN-gamma production in natural killer cells*. Blood, 2012. **119**(15): p. 3478-85.
154. Liu, J., et al., *MicroRNA-155 prevents necrotic cell death in human cardiomyocyte progenitor cells via targeting RIP1*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(7): p. 1474-82.
155. Godlewski, J., et al., *microRNA-451: A conditional switch controlling glioma cell proliferation and migration*. Cell Cycle, 2010. **9**(14): p. 2814-2820.
156. Kim, Y., et al., *miR451 and AMPK mutual antagonism in glioma cell migration and proliferation: a mathematical model*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28293.
157. Morandi, F. and V. Pistoia, *Soluble HLA-G modulates miRNA-210 and miRNA-451 expression in activated CD4+ T lymphocytes*. Int Immunol, 2013. **25**(5): p. 279-85.
158. Dueck, A., et al., *microRNAs associated with the different human Argonaute proteins*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(19): p. 9850-62.
159. Jr-Shiuan Yang, T.M., et al., *Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis*. Proc Natl Acad Sci, 2010. **107**(34): p. 15163–15168.
160. Scian, M.J., et al., *MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate with chronic allograft dysfunction with IF/TA*. Am J Transplant, 2011. **11**(10): p. 2110-22.
161. Danger, R., et al., *Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant*. J Am Soc Nephrol. **23**(4): p. 597-606.
162. Sun, X., et al., *MicroRNA-181b regulates NF-kappaB-mediated vascular inflammation*. J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 1973-90.
163. Sun, X., et al., *Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor-kappaB activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circ Res, 2014. **114**(1): p. 32-40.
164. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(4): p. 549-74.
165. Frangogiannis, M.D.a.N.G., *Chemokines and cardiac fibrosis*. Front Biosci 2010. **1**: p. 391-405.
166. Suarez, Y., et al., *Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on*

- human endothelial cells: feedback control of inflammation.* J Immunol. **184**(1): p. 21-5.
167. Chen, W., et al., *MicroRNA regulation of integrins.* Transl Res. **162**(3): p. 133-43.
168. Ji, X., et al., *Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury.* Clin Chem, 2009. **55**(11): p. 1944-9.
169. Montgomery, R.L., et al., *Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure.* Circulation, 2011. **124**(14): p. 1537-47.
170. Wang, G.K., et al., *Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans.* Eur Heart J, 2010. **31**(6): p. 659-66.
171. Widera, C., et al., *Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome.* J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(5): p. 872-5.
172. Kukreja, R.C., C. Yin, and F.N. Salloum, *MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection.* Mol Pharmacol, 2011. **80**(4): p. 558-64.
173. Taurino, C., et al., *Gene expression profiling in whole blood of patients with coronary artery disease.* Clin Sci (Lond), 2010. **119**(8): p. 335-43.
174. Wei, L., et al., *Differential expression of microRNAs during allograft rejection.* Am J Transplant. **12**(5): p. 1113-23.
175. Sellares, J., et al., *Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants.* Am J Transplant, 2013. **13**(4): p. 971-83.
176. Mandeep R. Mehra, M., et al., *International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy—2010.* J Heart Lung Transplant, 2010. **29**(7): p. 717-727.
177. Stewart, S., et al., *Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection.* J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(11): p. 1710-20.
178. Berry, G.J., et al., *The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation.* J Heart Lung Transplant, 2013. **32**(12): p. 1147-62.

179. Gheeyoung Choe, et al., *Analysis of the Phosphatidylinositol 3' -Kinase Signaling Pathway in Glioblastoma Patients in Vivo*. *Cancer res*, 2003. **63**: p. 2742-2748.