



HAL
open science

Rejet aigu en transplantation pulmonaire: intérêts de l'histologie et de l'immunomarquage C4d dans le diagnostic de rejet aigu humoral et de l'évaluation de la polarisation des macrophages alvéolaires

Sonia Holifanjaniaina

► To cite this version:

Sonia Holifanjaniaina. Rejet aigu en transplantation pulmonaire: intérêts de l'histologie et de l'immunomarquage C4d dans le diagnostic de rejet aigu humoral et de l'évaluation de la polarisation des macrophages alvéolaires. Immunologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLV045 . tel-01865802

HAL Id: tel-01865802

<https://theses.hal.science/tel-01865802>

Submitted on 2 Sep 2018

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.

NNT : 2016SACLV045

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
Préparée à l'Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines

ÉCOLE DOCTORALE N°577

Structure et dynamique des systèmes vivants

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Mme Sonia Holifanjaniaina

Rejet aigu en transplantation pulmonaire: intérêts de l'histologie et de l'immunomarquage C4d dans le diagnostic de rejet aigu humoral et de l'évaluation de la polarisation des macrophages alvéolaires

Thèse présentée et soutenue à Suresnes, le 16 juin 2016 :

Composition du Jury :

Dr Nelly FROSSARD

Présidente du jury, Rapporteur

Pr Vincent LAGENTE

Rapporteur

Dr Stanislas GRASSIN DELYLE

Examineur

Pr Philippe DEVILLIER

Directeur de thèse



Avant de présenter ce travail, je tiens à remercier les personnes sans qui tout ceci ne serait jamais arrivé.

A mes rapporteurs, le Docteur Nelly FROSSARD et le Professeur Vincent LAGENTE

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant la charge d'être rapporteurs de cette thèse et d'apporter vos expertises.

Au Professeur Philippe DEVILLIER

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et d'avoir accepté de diriger ce travail. Malgré vos multiples occupations, vous avez toujours pu trouver du temps à me consacrer. Merci pour tous vos conseils et de votre soutien qui m'ont été d'un apport essentiel pour la réalisation de ce travail.

Au Docteur Magali COLOMBAT

Je vous remercie de m'avoir recruté et permis de faire ce travail. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, ce fut un honneur et un plaisir de travailler à vos côtés. C'était une expérience très enrichissante à tout point de vue pour moi. Je regrette profondément que notre collaboration ne puisse pas continuer.

Au Docteur Marc STERN

Je vous remercie d'avoir fait germer l'idée de ce travail et de votre soutien. Vous avez été le pilier de ce travail. Cette thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer toute mon admiration et mon respect pour vos qualités humaines et professionnelles.

Au Docteur Stanislas GRASSIN-DELYLE

Je te remercie de m'avoir fait profiter de tes connaissances et de m'avoir guidé tout au long de ce travail. Merci de ton optimisme qui m'a encouragé de continuer.

Au Professeur Martine REYNAUD-GAUBERT

Je vous remercie de votre collaboration et de votre expertise de pneumologue transplantateur. Merci de votre réactivité dans tous nos échanges qui m'a permis d'avancer dans ce travail.

Au Docteur Antoine ROUX

Je te remercie de ta disponibilité et pour tout ce que tu m'as appris en pratique clinique comme scientifique. Merci pour tes remarques constructives.

Au Docteur Chantal GAUTREAU

Je vous remercie de votre collaboration et de m'avoir aidé à comprendre un peu mieux le monde si compliqué du système HLA.

Au Docteur Emmanuel NALINE

Je te remercie de ton soutien et tous ces moments de bonne humeur au laboratoire.

Au Docteur Hélène SALVATOR, merci pour tes encouragements et de ton aide.

A Charlotte, merci pour tous les petits moments de discussion et pour tes encouragements.

A Marion, merci de ta présence, ton accompagnement et tes encouragements répétés. Tu as été toujours là pour moi et ce malgré les moments difficiles.

Je remercie l'association Vaincre La Mucoviscidose pour le soutien financier de ce travail.

Je souhaite également exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail : les membres de l'équipe du service d'anatomopathologie de l'Hôpital Foch et de l'Hôpital Nord Marseille et toute l'équipe du groupe de la transplantation pulmonaire de l'Hôpital Foch.

A mes amis : Carole, Chifaou, Christina, Emina, Mélanie, Renoo, Ruddy, Sulax, Vy, Yseult.
Merci pour votre soutien et votre amitié qui dure malgré l'éloignement et une vie bien remplie.

A ma belle-famille, qui m'est devenue une véritable famille. Merci particulièrement à Rojo pour ton aide et tes encouragements.

A toute ma famille pour son soutien depuis toujours et ce malgré la distance.

A mes parents, merci pour votre amour, votre soutien indéfectible et vos encouragements sans cesse. Vous avez réussi !

A mes sœurs Anja et Poussy, j'ai de la chance de vous avoir comme sœur.

A mon petit frère Tojo, le petit gâté de la famille que j'adore.

A mes beaux-frères, Rova et Eric, et ma petite nièce **Rotsy** qui me donne toujours le sourire.

Enfin le dernier et non le moindre, **à Jonathan**, merci de ta patience et de m'avoir supporté durant toutes mes années d'études. Merci d'être à mes côtés.

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. TRANSPLANTATION PULMONAIRE : DONNEES GENERALES	4
II. COMPLICATIONS FREQUENTES NON IMMUNOLOGIQUES EN TRANSPLANTATION PULMONAIRE	8
II.1 DYSFONCTION PRIMAIRE DU GREFFON	8
II.2 COMPLICATIONS BRONCHIQUES.....	9
II.3 INFECTIONS	9
III. COMPLICATIONS IMMUNOLOGIQUES EN TRANSPLANTATION PULMONAIRE	11
III.1 REJET AIGU CELLULAIRE	11
III.1.a <i>Physiopathologie du rejet aigu cellulaire</i>	14
III.2 REJET AIGU HUMORAL	17
III.2.a <i>Aspects générales</i>	18
III.2.b <i>Physiopathologie du rejet aigu humoral</i>	27
III.2.c <i>Diagnostic du rejet aigu humoral</i>	35
III.2.d <i>Prise en charge thérapeutique du rejet aigu humoral</i>	40
III.3 MACROPHAGES DANS LE REJET AIGU	42
III.3.a <i>Etat d'activation des macrophages : concept de polarisation</i>	44
III.4 REJET CHRONIQUE	53
III.4.a <i>Syndrome de bronchiolite oblitérante</i>	53
III.4.b <i>Syndrome restrictif d'allogreffe</i>	56
III.4.c <i>Macrophages dans le rejet chronique</i>	57
TRAVAUX DE RECHERCHE	58
MATERIELS ET METHODES	60
PARTIE 1 : INTERET DES LESIONS HISTOLOGIQUES ET DU MARQUAGE C4D DANS LE DIAGNOSTIC DU REJET AIGU HUMORAL	61
I. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE	62
II. PARAMETRES SEROLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES	64
III. IMMUNOMARQUAGE DE C4D : MISE AU POINT ET DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE	65
III.1 PRINCIPE DE L'IMMUNOMARQUAGE	66
III.2 MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'IMMUNOMARQUAGE C4D.....	68
III.3 SCORING DE L'EXPRESSION DU C4D	71
III.4 FIXATION DES BIOPSIES TRANSBRONCHIQUES	73

PARTIE 2 : REJET AIGU ET POLARISATION DES MACROPHAGES	75
I. LAVAGES BRONCHIOLO-ALVEOLAIRES	76
II. CYTOMETRIE EN FLUX : ASPECTS TECHNIQUES	76
III. POLARISATION DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES	79
IV. ANALYSE STATISTIQUE	82
RESULTATS	83
PARTIE 1 : INTERET DES LESIONS HISTOLOGIQUES ET DU MARQUAGE C4D DANS LE DIAGNOSTIC DU REJET AIGU HUMORAL	84
I. REJET HUMORAL	86
I.1 REJET AIGU HUMORAL	86
I.1.a Description de la population	86
I.1.b Description histologique et immunomarquage C4d des patients avec rejet aigu humoral	93
I.2 REJET HUMORAL INFRA/SUB-CLINIQUE	94
I.2.a Description de la population	94
I.2.b Description histologique et immunomarquage C4d	96
I.3 COMPARAISON DES PATIENTS AVEC REJET AIGU HUMORAL CLINIQUE VERSUS PATIENTS AVEC REJET HUMORAL INFRA/SUB-CLINIQUE	96
I.3.a Lésions histologiques	97
I.3.b Immunomarquage C4d	97
I.3.c Impact du marquage C4d dans le devenir du greffon	98
II. GROUPES CONTROLES	100
II.1 PATIENTS CONTROLES TRANSPLANTES	100
II.2 PATIENTS CONTROLES NON TRANSPLANTES	101
III. DISCUSSION	102
IV. CONCLUSION	109
PARTIE 2 : REJET AIGU ET POLARISATION DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES	110
I. PRESENTATION DES RESULTATS	111
II. DISCUSSION - CONCLUSION	118
BIBLIOGRAPHIES	120
ANNEXE	143

Liste des figures

Figure 1 : Courbe de survie des patients transplantés pulmonaires par période.....	5
Figure 2 : Nombre de transplantation pulmonaire par an et par type de procédure.....	5
Figure 3 : Rejet aigu cellulaire (A1) : manchon inflammatoire de lymphocytes disposés autour d'une veinule ..	13
Figure 4 : Voies de reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T	14
Figure 5 : Mécanisme moléculaire du rejet aigu cellulaire	16
Figure 6 : Représentation schématique des molécules du CMH	19
Figure 7 : Différentes techniques de détection des anticorps anti-HLA	23
Figure 8 : Voies d'activation du complément	29
Figure 9 : Effets des anticorps et du complément sur les cellules endothéliales humain	32
Figure 10 : Représentation schématique de l'évolution du rejet humoral au cours du temps	34
Figure 11 : Stratégies thérapeutiques du RAH.....	41
Figure 12 : Plasticité et fonction des macrophages dans un contexte de rejet de greffe.....	44
Figure 13 : Chimioquinas et cytokines spécifique de chaque phénotype de polarisation des macrophages	49
Figure 14 : Aspect histologique typique d'une BO.....	54
Figure 15 : Différentes mécanismes contribuant au développement de la BO	55
Figure 16 : Facteurs susceptibles d'influencer les résultats de l'immunomarquage	67
Figure 17 : Paramètres techniques à modifier en fonction signal obtenu.....	68
Figure 18 : Exemple de marquage C4d avec l'anti-C4d de biomedica (A) et cell marque (B).....	70
Figure 19 : Intensité du bruit de fond, Anti-C4d de Biomedica Groupe versus Cell Marque.....	71
Figure 20 : Exemple de marquage C4d sur les fibres élastiques (A), l'endothélium vasculaire (B) et le plasma (C)	73
Figure 21 : Exemple de marquage C4d, BTB fixée en formol (A) et en AFA (B)	74
Figure 22 : Détermination de la limite entre les populations positive et négative.....	77
Figure 23 : Avant et après compensation.	78
Figure 24 : Identification de la population de macrophages dans le LBA.....	79
Figure 25 : Organigramme des groupes de patients étudiés.....	85
Figure 26 : Délai de survenue du RAH.....	89
Figure 27 : Délai post-transplantation de la détection du C4d+	95
Figure 28 : Répartition du marquage C4d dans le groupe RAH et C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH..	98
Figure 29 : Survenue de CLAD (A) et analyse de survie (B) des patients avec un marquage C4d+	99
Figure 30 : Organigramme des groupes de patients étudiés avec les résultats du marquage C4d	101
Figure 31 : Phénotypage des macrophages alvéolaires polarisés.....	115
Figure 32 : Production de marqueurs cytokiniques M1/M2 par les macrophages alvéolaires	116
Figure 33 : Expression des marqueurs transcriptionnels M1/M2 par les macrophages alvéolaires	117

Liste des tableaux

Tableau 1 : Indications pour la transplantation pulmonaire.....	6
Tableau 2 : Causes de décès en transplantation pulmonaire	7
Tableau 3 : Score de gravité de la DPG	9
Tableau 4 : Facteurs de risque d'infection.....	10
Tableau 5 : Classification du rejet aigu cellulaire.....	12
Tableau 6 : Marqueurs de la polarisation des macrophages	52
Tableau 7 : Définition et classification de la BOS.....	54
Tableau 8 : Différents phénotypes de CLAD	56
Tableau 9 : Groupes contrôles	62
Tableau 10 : Données cliniques recueillies pour chaque patient	63
Tableau 11 : Lésions histologiques analysées	65
Tableau 12 : Score de l'inflammation microvasculaire	65
Tableau 13 : Les différents anticorps anti-C4d testés.....	69
Tableau 14 : Protocole de marquage optimal pour chaque anticorps anti-C4d	69
Tableau 15 : Marquage C4d des groupes contrôles.....	72
Tableau 16 : Matrice de compensation	77
Tableau 17 : Caractéristiques des patients	87
Tableau 18 : Protocole d'immunosuppression	88
Tableau 19 : Caractéristiques cliniques des patients au moment du diagnostic de RAH	90
Tableau 20 : Caractéristiques des DSA.....	91
Tableau 21 : Prise en charge thérapeutique des patients avec un rejet aigu humoral	92
Tableau 22 : Fréquence des lésions histologiques.....	97
Tableau 23 : Caractéristiques des LBA	112
Tableau 24 : Caractéristiques des patients et du LBA.....	113
Tableau 25 : Proportion des macrophages alvéolaires polarisés.....	114

Liste des abréviations

AECA : Anti-endothelial cell antibody
BO : Bronchiolite Oblitérante
BOS : Bronchiolitis Obliterans Syndrom
BTB : Biopsie Transbronchique
CCR : CC chemokine receptor
CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément
CLAD Chronic Lung Allograft Dysfunction
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
COX : Cylooxygénase
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CPT : Capacité Pulmonaire Totale
CSF : Colony Stimulating Factors
CVF : Capacité Vitale Forcée
CX3CR : CX3C chemokine receptor
CXCR : CXC chemokine receptor
DAF : Decay Accelerating Factor
DCL-1 : C-type lectin receptor
DC-SIGN : Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DEM25-75 : Débit Expiratoire Maximal médian
DSA : Donor Specific Antibody
DTT : Dithiotreitol
EDTA : Ethylène diamine tétraacétique
EFR : Epreuve Fonctionnelle Respiratoire
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HLA : Human Leucocyte Antigen
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule
IL : Interleukine
ISHLT : International Society for Heart and Lung Transplantation
LAM : Lymphangioliomyomatose
LCT : Lymphocytotoxicité
LOX : Lipoxygénase

LPS : Lipopolysaccharide
MARCO : Macrophage Receptor with Collagenous Structure
MCP : Monocyte chemoattractant protein, :
Membrane cofactor protein
MICA : Major histocompatibility class I related chain A
MIF : Macrophage migration inhibitory factor
MRC1 : Mannose receptor C-type lectin 1
NIH : National Institute of Health
NO : Nitric oxyde
PG : Prostaglandin
PPR : Pattern recognition receptors
PRA : Panel Reactive Antibody
PTGS : Prostaglandin-Endoperoxide Synthase
RA : Rejet aigu
RAC : Rejet Aigu Cellulaire
RAH : Rejet Aigu Humoral
RAS : Restrictive Allograft Syndrom
RGO : Reflux Gastro-Oesophagien
RNS : Reactive nitrogen species
ROS : Reactive oxygen species
TCR : T Cell Receptor (récepteur des cellules T)
TDM-HR : Tomodensitométrie Haute Résolution
TGF : Transforming growth factor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TP : Transplantation Pulmonaire
VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1
VEMS : Volume Expiratoire Maximal par Seconde

INTRODUCTION

La transplantation pulmonaire (TP) est depuis une vingtaine d'années une option thérapeutique valide pour une grande variété de pathologies pulmonaires au stade terminal. Dans de nombreuses indications, un bénéfice en termes de survie a été démontré après ce traitement. Cependant, les transplantés pulmonaires sont exposés à de nombreuses complications notamment infectieuses et immunologiques et les taux de survie actuarielle après TP restent inférieurs à ceux observés au cours d'autres transplantations d'organe solide. Malgré les progrès réalisés ces dernières années en matière de traitement immunosuppresseur, les rejets aigus et chroniques restent les principales complications en termes de fréquence et de gravité. Le rôle pathogénique et l'implication pronostique des anticorps anti-HLA (*Human Leucocyte Antigen*) dirigés contre le donneur (DSA, donor specific antibody) dans les rejets hyperaigu, aigu et chronique sont démontrés depuis plusieurs années en transplantation rénale et cardiaque. En TP, le rôle de l'immunité humorale est reconnu dans la genèse des rejets hyperaigus survenant quelques minutes après la transplantation, notamment en cas d'incompatibilité ABO (Bittner et al., 2001; Choi et al., 1999; Lau et al., 2000; Scornik et al., 1999). La présence de DSA est associée au risque de survenue d'une bronchiolite oblitérante (BO) (forme de rejet chronique). Cependant, les données de la littérature sur le rejet aigu humoral (RAH) en TP sont limitées. Les résultats de quelques études sur le sujet sont contradictoires et les descriptions histologiques de RAH pulmonaire rapportés dans la littérature sont très variées. Dans un premier temps, notre travail a consisté à mettre au point la technique d'immunomarquage des dépôts de C4d dans le tissu pulmonaire et de définir un immunomarquage C4d positif. Dans un second temps, nous avons évalué sur une cohorte de patients répondant aux critères de RAH selon les recommandations de l'ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation) (Berry et al., 2013b), les lésions histologiques et l'immunomarquage C4d sur des biopsies transbronchiques. Enfin, nous avons étudié en cytométrie de flux des marqueurs membranaires de polarisation des macrophages obtenus par lavage alvéolaire chez des patients transplantés avec et sans rejet aigu.

Notre travail montre l'intérêt des marqueurs tissulaires du rejet aigu humoral en transplantation pulmonaire. A l'avenir, la recherche de C4d au niveau capillaire sur les biopsies transbronchiques, dans le suivi des patients greffés pulmonaires, devrait contribuer à mettre en place précocement une thérapeutique graduée et spécifique et qui pourrait

améliorer les résultats de la transplantation. A l'inverse, notre travail sur les macrophages alvéolaires montre les limites des marqueurs de membrane (HLA-DR et CD206) dans l'évaluation de l'état d'activation de ces cellules au cours des rejets.

I. TRANSPLANTATION PULMONAIRE : DONNEES GENERALES

Historique

La première tentative de TP (cœur-poumon) a été réalisée chez le chien dans les années 1940 par Vladimir Demikhov (Cooper, 1969). Une vingtaine d'année plus tard, la première TP humaine a été réalisée par l'équipe de James Hardy à l'université de Mississippi (Hardy JD et al., 1963) chez un patient souffrant d'une pneumopathie grave sur cancer pulmonaire non résecable. L'intervention chirurgicale a été un succès mais, le patient n'a survécu que 18 jours. Durant les vingt années qui ont suivies, une quarantaine de tentatives de TP ont été réalisées sans succès. La durée de survie était de courte durée du fait de la survenue des rejets et des infections. Ce n'est que vers la fin des années 1970 et au début des années 1980 avec la découverte et la mise sur le marché de la cyclosporine A que les transplantations d'organes ont commencé à progresser. En 1981, l'équipe de Norman Shumway et Bruck Reitz réalisa avec succès les premières transplantations cardio-pulmonaires (Reitz et al., 1982). Puis très rapidement, d'autres centres ont pratiqué des transplantations monopulmonaires (1983) et bipulmonaires (1989).

En France, la première transplantation cardio-pulmonaire a été réalisée par l'équipe de Christian Cabrol à la Pitié-Salpêtrière en 1982 et la première TP en 1987. Depuis, plus de 45 000 transplantations pulmonaires ont été réalisées dans le monde (Stehlik et al., 2013).

Aspects épidémiologiques

En transplantation pulmonaire, la prise en charge et la survie (Figure 1) des patients sont en amélioration permanente. Le nombre de TP augmente ainsi de plus en plus chaque année avec 3893 transplantations pulmonaires réalisées dans le monde en 2013 (Figure 2) (Yusen et al., 2015). En France le nombre de patients inscrits sur liste d'attente est en constante évolution avec une augmentation majeure entre 2010 et 2011 (+20%) alors que le nombre de décès sur liste d'attente est en baisse (www.agence-biomedecine.fr).

Figure 1 : Courbe de survie des patients transplantés pulmonaires par période (registre de l'ISHLT, 2015)

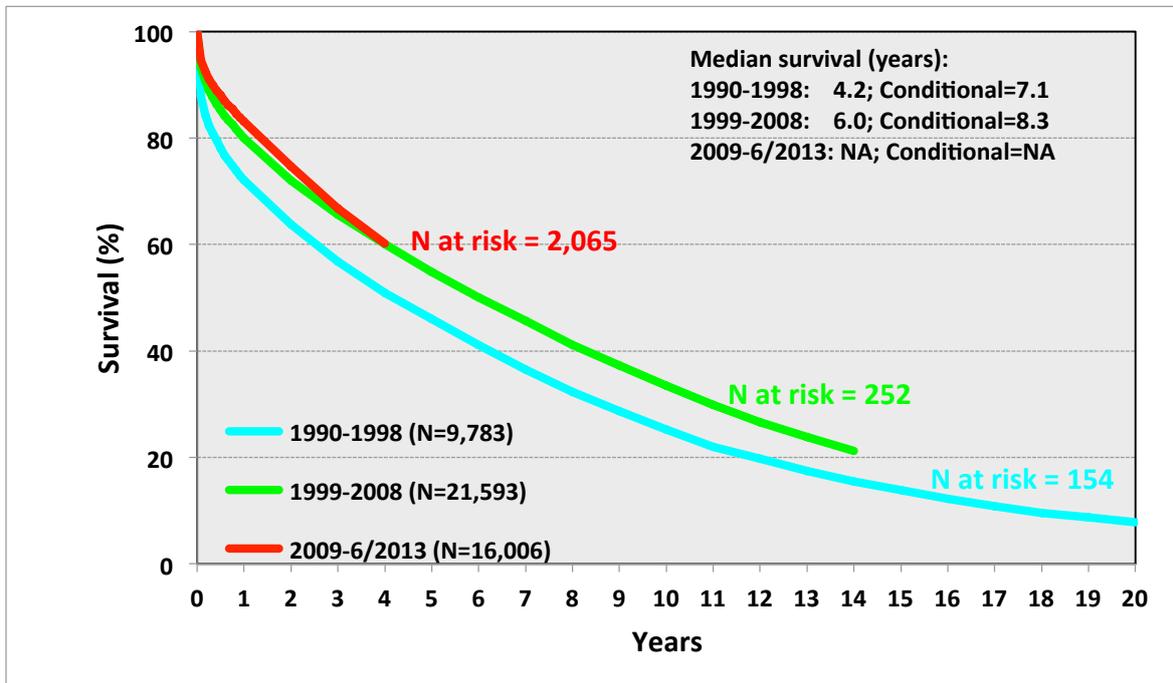
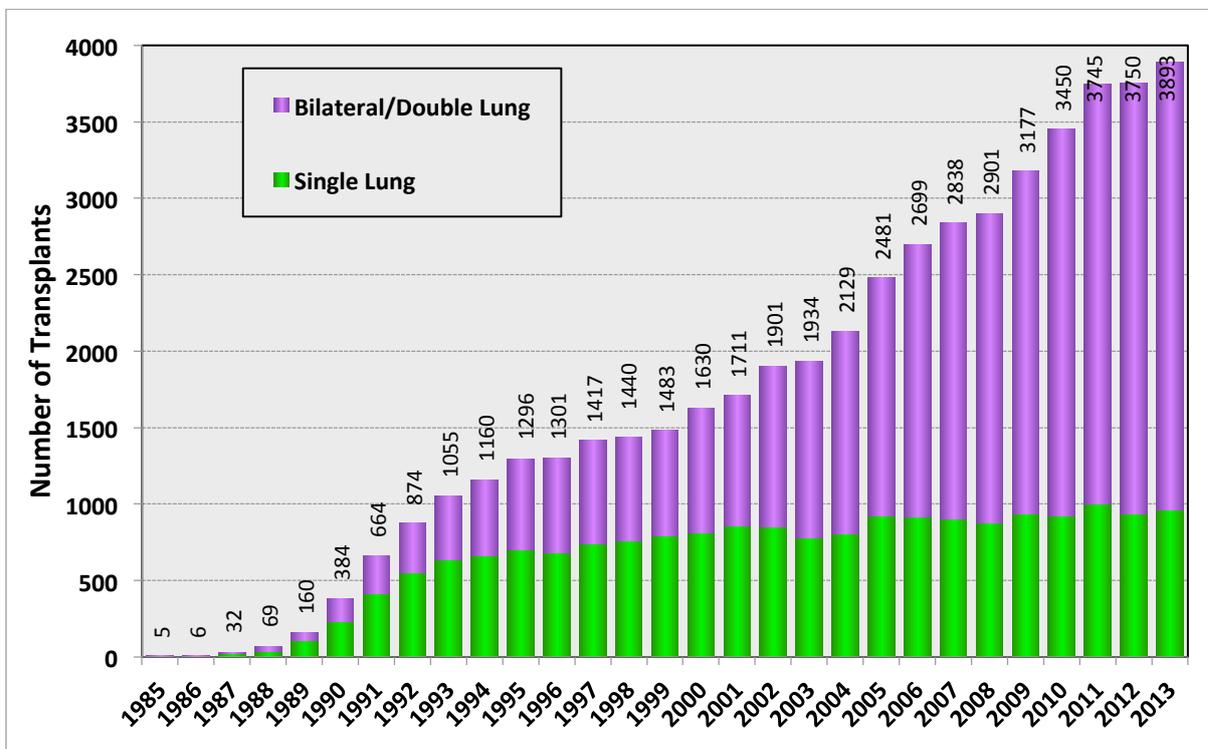


Figure 2 : Nombre de transplantation pulmonaire par an et par type de procédure (registre de l'ISHLT, 2015)



Une TP peut être envisagée chez tout patient avec une insuffisance respiratoire terminale à condition que les risques encourus n'excèdent pas les bénéfices escomptés et qu'il n'existe pas de contre-indications. Les principales indications pour la TP sont l'emphysème, la fibrose pulmonaire et la mucoviscidose (Yusen et al., 2015) (Tableau 1).

Tableau 1 : Indications pour la transplantation pulmonaire (registre de l'ISHLT, 2015)

	MP (N = 16226)	BP (N = 29457)	TOTAL (N = 45683)
BPCO/Emphysème	6826 (42.1%)	7856 (26.7%)	14682 (32.1%)
Fibrose pulmonaire idiopathique	5561 (34.3%)	5442 (18.5%)	11003 (24.1%)
Mucoviscidose	228 (1.4%)	7,191 (24.4%)	7419 (16.2%)
Déficit en Alpha-1 antitrypsine	792 (4.9%)	1,667 (5.7%)	2459 (5.4%)
HTAP idiopathique	91 (0.6%)	1,250 (4.2%)	1341 (2.9%)
Fibrose pulmonaire, Autres	758 (4.7%)	1,125 (3.8%)	1883 (4.1%)
Bronchectasie	65 (0.4%)	1,167 (4.0%)	1232 (2.7%)
Sarcoidose	301 (1.9%)	857 (2.9%)	1158 (2.5%)
Retransplantation: BO	338 (2.1%)	440 (1.5%)	778 (1.7%)
Maladies du tissu conjonctif	200 (1.2%)	481 (1.6%)	681 (1.5%)
BO (hors retransplantation)	110 (0.7%)	381 (1.3%)	491 (1.1%)
Lymphangioléiomyomatose (LAM)	142 (0.9%)	330 (1.1%)	472 (1.0%)
Retransplantation: hors BO	210 (1.3%)	246 (0.8%)	456 (1.0%)
Cardiopathie congénitale	93 (0.6%)	333 (1.1%)	426 (0.9%)
Cancer	7 (0.0%)	30 (0.1%)	37 (0.1%)
Autres	504 (3.1%)	661 (2.2%)	1165 (2.6%)

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive ; BP : transplantation bipulmonaire ; BO : bronchiolite oblitérante ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; MP : transplantation monopulmonaire ;

Qualité de vie et survie des patients

Plusieurs études ont démontré que la TP améliore la qualité de vie des patients. Cette amélioration a été mise en évidence sur des études comparant des patients transplantés à des patients en liste d'attente mais aussi en étudiant les patients de façon longitudinale avant et après la transplantation. D'après Santana et coll. (Santana et al., 2009), la TP permet aux patients d'être en meilleur état général, de réduire les manifestations douloureuses et de diminuer la fréquence de la dépression. Cependant, cette qualité de vie reste inférieure à

celle de la population générale du fait des complications de la transplantation et de l'immunosuppression.

Si la survie des patients n'était que de quelques jours tout au début de l'histoire de la transplantation d'organe, les avancées sur l'obtention des greffons, les techniques chirurgicales et anesthésiques ainsi que la prise en charge postopératoire des patients ont permis d'améliorer considérablement les résultats à long terme. Actuellement la survie médiane est de 5,7 ans avec un taux de survie de 89 % à 3 mois, 80 % à 1 an, 65 % à 3 ans et 54 % à 5 ans (Yusen et al., 2015). L'efficacité à plus long terme de la TP reste limitée par rapport à d'autres transplantations d'organes solides. La survie médiane à 10 ans est de 54 % pour le cœur, 60 % pour le foie et 61 % pour le rein et seulement de 31 % pour le poumon. Plusieurs facteurs influent sur la survie (Tableau 2) (Yusen et al., 2015). La mortalité dans la première année est majoritairement liée à la survenue d'une dysfonction du greffon, aux problèmes liés aux techniques chirurgicales et aux infections. Après la première année et sur le long terme, le rejet chronique constitue la principale cause de perte du greffon qui, malgré les progrès importants, reste un défi persistant limitant le succès de la TP.

Tableau 2 : Causes de décès en transplantation pulmonaire (registre de l'ISHLT, 2015)

Causes de décès	0-30 jrs (N = 3224)	31 jrs - 1 an (N = 5578)	>1 - 3 ans (N = 5256)	>3 - 5 ans (N = 3015)	>5 - 10 ans (N = 3655)	>10 ans (N = 1294)
Bronchiolite	9 (0.3%)	256 (4.6%)	1378 (26.2%)	892 (29.6%)	914 (25.0%)	274 (21.2%)
Rejet aigu	115 (3.6%)	102 (1.8%)	83 (1.6%)	18 (0.6%)	20 (0.5%)	2 (0.2%)
Lymphome	1 (0.0%)	120 (2.2%)	96 (1.8%)	46 (1.5%)	64 (1.8%)	38 (2.9%)
Tumeur hors lymphome	6 (0.2%)	159 (2.9%)	418 (8.0%)	339 (11.2%)	514 (14.1%)	174 (13.4%)
CMV	3 (0.1%)	122 (2.2%)	50 (1.0%)	7 (0.2%)	4 (0.1%)	1 (0.1%)
Infection, Non-CMV	623 (19.3%)	1964 (35.2%)	1122 (21.3%)	548 (18.2%)	655 (17.9%)	211 (16.3%)
Dysfonction du greffon	783 (24.3%)	928 (16.6%)	985 (18.7%)	532 (17.6%)	615 (16.8%)	206 (15.9%)
Cardiovasculaire	370 (11.5%)	295 (5.3%)	232 (4.4%)	152 (5.0%)	201 (5.5%)	95 (7.3%)
Techniques chirurgicales	363 (11.3%)	201 (3.6%)	48 (0.9%)	14 (0.5%)	29 (0.8%)	10 (0.8%)
Autres	951 (29.5%)	1431 (25.7%)	844 (16.1%)	467 (15.5%)	639 (17.5%)	283 (21.9%)

CMV : cytomégalovirus

II. COMPLICATIONS FREQUENTES NON IMMUNOLOGIQUES EN TRANSPLANTATION PULMONAIRE

Nous allons dans ce chapitre présenter quelques complications non immunologiques fréquemment observés en TP qu'on va retrouver plus tard dans cette étude (groupes contrôles).

II.1 DYSFONCTION PRIMAIRE DU GREFFON

Cette complication a eu plusieurs dénominations comme œdème de reperfusion ou œdème de réimplantation avant que l'appellation ait été standardisée en « dysfonction primaire du greffon (DPG) » par Christie et coll. en 2005 (Christie et al., 2005a). La DPG, est un syndrome qui survient dans les 72 heures après la TP. Elle est caractérisée par des lésions alvéolaires aiguës diffuses associée à une hypoxémie persistant plus de 48 heures après la chirurgie ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$)¹ et par un infiltrat radiologique diffus du poumon transplanté sans autres causes identifiables (Christie et al., 2005a, 2005b, 2005c). Selon la gravité du syndrome, on distingue trois grades de DPG (Tableau 3). Elle touche entre 10 à 25% des patients et constitue un facteur important de morbidité et de mortalité pendant les 30 premiers jours suivant la transplantation (Christie et al., 2005b; Yusen et al., 2013) (environ 25% de décès). Elle augmente également le risque de mortalité pendant la première année après la transplantation (Christie et al., 2005d; Diamond et al., 2013) et est associée à la survenue à plus long terme du syndrome de bronchiolite oblitérante (ou BOS, Bronchiolitis Obliterans Syndrom) (Daud et al., 2007). La pathogenèse de la DPG est complexe et n'est pas encore complètement élucidée mais les espèces réactives de l'oxygène générées pendant le processus d'ischémie-reperfusion semblent jouer un rôle important (de Perrot et al., 2003). L'activation de la cascade pro-inflammatoire, la surexpression des molécules d'adhésion et des facteurs pro-coagulants y contribuent aussi (Colombat et al., 2004; Covarrubias et al., 2007; Moreno et al., 2007).

¹ FiO_2 : Fraction d'oxygène inspiré ; PaO_2 : Pression partielle artérielle d'oxygène

Tableau 3 : Score de gravité de la DPG (Christie et al., 2005b)

Grade	PaO2/Fio2	Infiltrat pulmonaire compatible avec œdème pulmonaire
0	> 300	Non
1	>300	Oui
2	200-300	Oui
3	<200	Oui

II.2 COMPLICATIONS BRONCHIQUES

Les complications bronchiques surviennent dès la première semaine. Elles sont dues à une revascularisation précaire des bronches. L'ischémie de la muqueuse bronchique constitue la complication la plus commune (12 %). La déhiscence est observée dans 1 à 6% des cas (Hachem et al., 2008; Schmid et al., 1997). Ces complications bronchiques peuvent évoluer vers une sténose ou une malacie avec risque de retentissement sur le fonctionnement du greffon et de survenue d'infections (Dutau et al., 2014; Fadel et al., 2008; Hachem et al., 2008). Elles restent le plus souvent accessibles à la thérapeutique (dilatation au ballonnet, prothèse en silicone, prothèses grillagées expansibles).

II.3 INFECTIONS

L'infection est l'une des principales causes de décès (35,2 %) mais aussi de morbidité pendant la première année après la transplantation (Yusen et al., 2015). C'est la deuxième cause de mortalité après la première année (Yusen et al., 2015). Les patients transplantés pulmonaires ont un risque très élevé d'infections bactériennes, virales, fongiques et parasitaires. En plus de la susceptibilité induite par le traitement immunosuppresseur, commune à toutes les transplantations, le risque infectieux en TP est favorisé par l'exposition des poumons à l'air environnant, la perte postopératoire du pouvoir d'épuration muco-ciliaire de l'épithélium bronchique, la baisse voire l'abolition du réflexe de la toux et la sténose bronchique. Les infections bactériennes sont les plus fréquentes en postopératoire immédiat, favorisées par les conditions propres à la TP mais également par le séjour en réanimation et le recours à la ventilation mécanique (Tableau 4). Ultérieurement, les

patients sont en plus exposés aux infections virales notamment le cytomégalovirus (CMV), parasitaires (toxoplasmose) et fongiques (pneumocystose et aspergillose).

*Tableau 4 : Facteurs de risque d'infection
(Green and Avery, 2004)*

État net d'immunosuppression	
Immunosuppression	Dose
	Durée
	Séquence temporelle des médicaments
Cytopénies	Neutropénie
	Lymphocytopénie
Complications métaboliques	Malnutrition
	Urémie
	Hyperglycémie
Infections par virus immunomodulateur	CMV
	EBV
	HHV-6
	Hépatite B
	Hépatite C
	VIH
Exposition environnementale aux pathogènes	

CMV : cytomégalovirus ; EBV : *Epstein-Barr virus* ; HHV : *Human herpes virus* ; VIH : virus d'immunodéficience humaine

III. COMPLICATIONS IMMUNOLOGIQUES EN TRANSPLANTATION PULMONAIRE

Les progrès considérables en immunologie ont permis de mieux comprendre la physiopathologie du rejet et d'améliorer les traitements immunosuppresseurs. Toutefois, le rejet reste un obstacle majeur au succès de la greffe.

Le rejet d'allogreffe est classé selon plusieurs critères. En fonction du moment de sa survenue, le rejet peut être considéré comme hyperaigu (quelques heures), aigu (quelques jours à quelques mois) et chronique (plusieurs mois ou années post-transplantation). Selon les mécanismes immunologiques et les lésions histologiques, on distingue le rejet médié par les lymphocytes T (ou rejet cellulaire) avec des lésions vasculaires (infiltrat périvasculaire de cellules mononucléées) et le rejet médié par les anticorps (ou rejet humoral) avec des lésions inflammatoires au niveau microvasculaire.

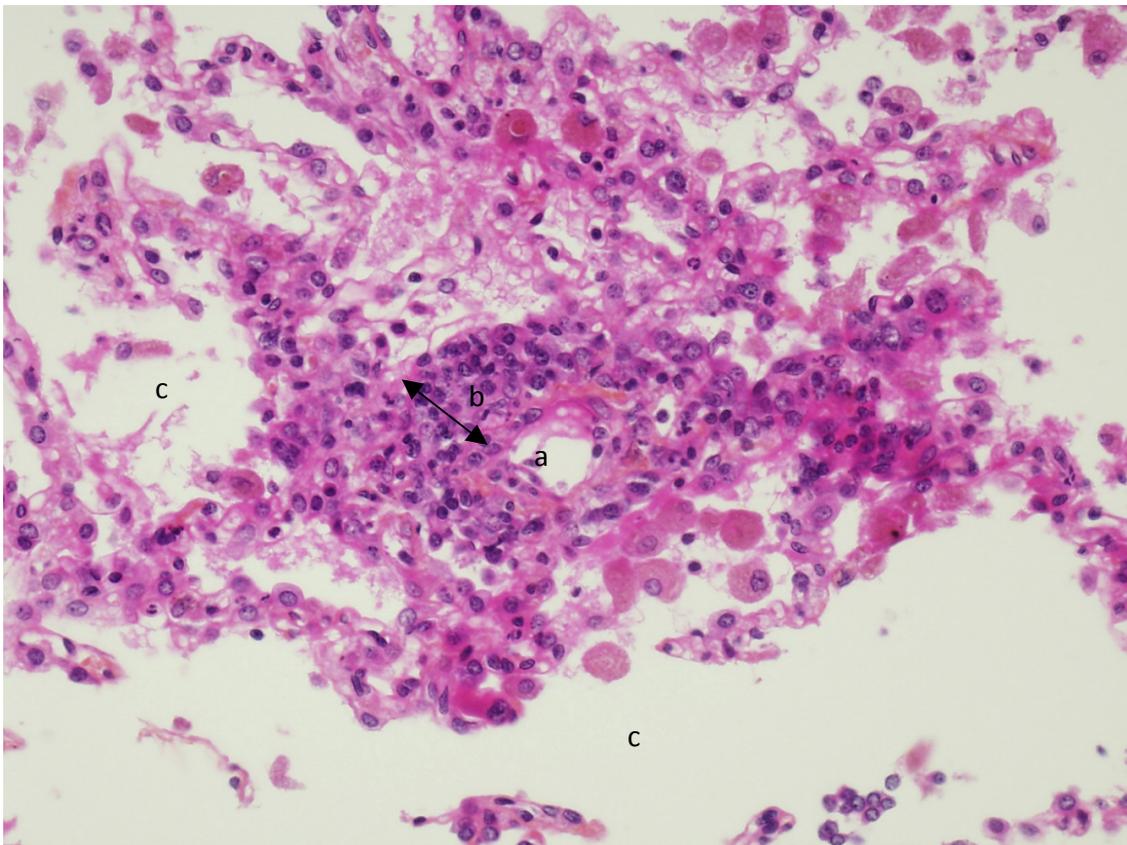
III.1 REJET AIGU CELLULAIRE

Le rejet aigu cellulaire (RAC) est caractérisé par une infiltration périvasculaire composée de cellules mononucléées, majoritairement des lymphocytes T (Figure 3). Une inflammation bronchiolaire peut s'y associer. Le RAC peut être asymptomatique (rejet infraclinique) ou provoquer des symptômes non spécifiques (dyspnée, toux) jusqu'au syndrome de détresse respiratoire aigu. Il peut provoquer des altérations de la fonction pulmonaire et/ou de l'imagerie pulmonaire. Cependant, il n'y a aucune manière fiable de différencier le diagnostic de rejet et de l'infection sur base de la clinique, de la fonction ou de l'imagerie (Martinu et al., 2011). Ainsi, le diagnostic de RAC est basé sur l'examen histopathologique de biopsies transbronchiques (BTB) pulmonaires. Selon l'intensité des lésions et leur extension à l'interstitium, on distingue différents grades de RAC : grade A0 (absence de rejet) à A4 (lésion sévères) pour l'inflammation périvasculaire et grade B0 à B2 pour l'inflammation bronchiolaire (Stewart et al., 2007a) (Figure 3, Tableau 5). Les BTB ont une très bonne sensibilité pour le diagnostic de RAC. Elle varie entre 72% à 94% selon les études et dépendent de la qualité et de la taille des biopsies (Yserbyt et al., 2014). Un prélèvement est considéré adéquat lorsqu'il a intéressé plus de 4 fragments de tissu alvéolaires.

Tableau 5 : Classification du rejet aigu cellulaire (Stewart et al., 2007a)

A : rejet aigu cellulaire		Description
A0	Aucun	Pas d'anomalie
A1	Minimal	Infiltrats mononucléés périvasculaires peu fréquents, plus particulièrement autour des veinules, 2-3 cellules d'épaisseur
A2	Léger	Infiltrats mononucléés fréquents autour des artérioles et veinules, facilement visibles à faible grossissement, pouvant contenir des éosinophiles ; une endothélite peut être présente ; pas d'infiltration des septa inter-alvéolaires ou des alvéoles
A3	Modéré	Infiltrats mononucléés denses et fréquents autour des artérioles et des veinules, s'étendant vers les septa inter-alvéolaires et les alvéoles ; une endothélite est généralement présente de même qu'une hyperplasie des pneumocytes et cellules épithéliales alvéolaires ; présence fréquente d'éosinophiles et neutrophiles
A4	Sévère	Infiltrats mononucléés diffus périvasculaires, interstitiels et alvéolaires avec lésions des pneumocytes et présence de cellules nécrotiques et de neutrophiles dans les alvéoles, de membranes hyalines, d'hémorragie intra-alvéolaire et de vasculite nécrosante
B : inflammation bronchiolaire		Description
B0	Aucune	Pas d'anomalie
B1	Bas grade	Inflammation de la sous-muqueuse des bronchioles, qui est inconstante ; pas d'infiltration de l'épithélium par les lymphocytes
B2	Haut grade	Plus importante infiltration de la sous-muqueuse des bronchioles avec plus grand nombre d'éosinophiles et plasmocytes ; atteinte épithéliale avec nécrose et métaplasie et éventuellement ulcérations et exsudat fibrinopurulent
BX	Non évaluable	Matériel insuffisant

Figure 3 : Rejet aigu cellulaire (A1) : manchon inflammatoire de lymphocytes disposés autour d'une veinule



a : lumière veinule ; b : infiltrat inflammatoire ; c : espace alvéolaire

Le RAC est l'une des causes majeures de risque de développement de BOS (Estenne et al., 2002; Sharples et al., 2002). L'incidence du rejet aigu prouvé par biopsie pendant la première année postopératoire est de l'ordre de 40 à 50% (Knoop and Estenne, 2006; McNeil et al., 2006; Yusen et al., 2013). Le choix du traitement immunosuppresseur (anti-thymoglobuline *versus* anti-CD25 ; tacrolimus *versus* ciclosporine) peut influencer sur l'incidence du rejet aigu (Burton et al., 2006; Hachem et al., 2007). Plusieurs facteurs allo-immuns et non allo-immuns (infections, reflux gastro-oesophagien (RGO) augmentent également l'incidence du rejet aigu (Girnit et al., 2004; Hartwig et al., 2005; Kumar et al., 2010; Quantz et al., 2000). En outre, les patients ayant fait un RAC ont plus de risque de développer d'autres épisodes de rejet. Ce risque est associé à l'apparition et à la gravité du RAC (Burton et al., 2008). Le RAC répond généralement au traitement par corticoïdes. En cas de persistance des symptômes clinique et histologique, il peut être traité par du sérum anti-lymphocytaire.

III.1.a Physiopathologie du rejet aigu cellulaire

La pathogenèse du RAC implique l'activation des lymphocytes T du receveur par la reconnaissance des antigènes du donneur via trois voies distinctes (Golshayan et al., 2007) :

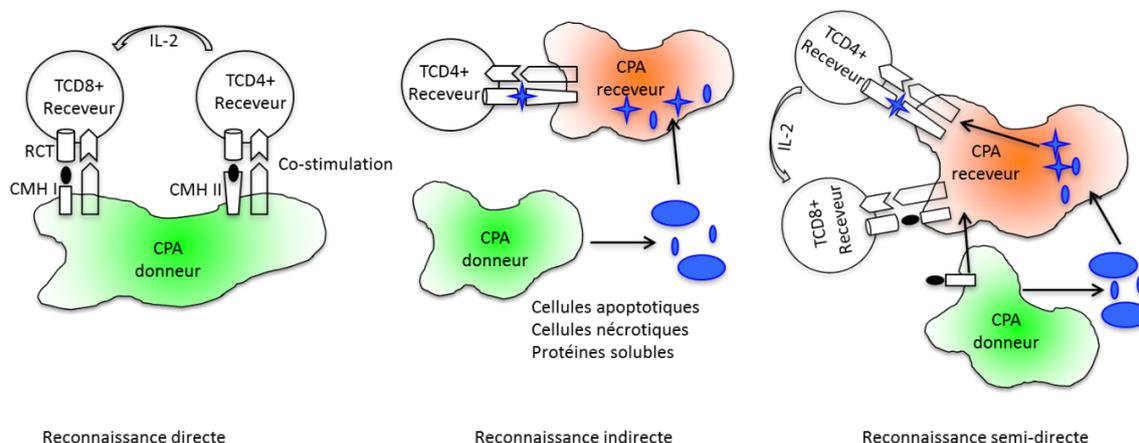
1) Reconnaissance directe par les cellules T des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) du donneur ;

2) Reconnaissance indirecte par les cellules T des antigènes du donneur internalisés par les CPA du receveur puis présentés dans le contexte du CMH du receveur ;

3) Reconnaissance semi-directe où les CPA du receveur capturent et présentent les molécules du CMH du donneur aux cellules T (Figure 4).

La reconnaissance directe serait la voie dominante impliquée dans le rejet aigu durant la période post-transplantation précoce. La voie indirecte serait le mode de reconnaissance dominant à plus long terme (Golshayan et al., 2007; Wood et al., 2013).

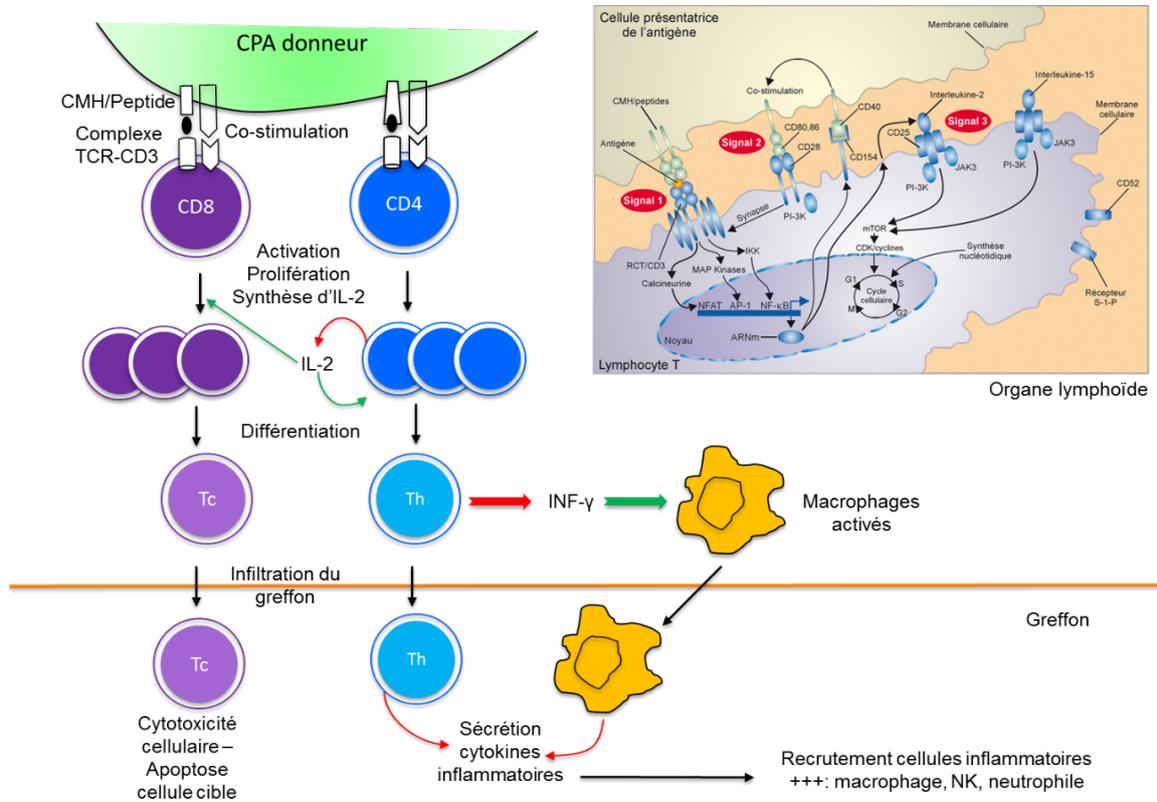
Figure 4 : Voies de reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T (Golshayan et al., 2007)



La reconnaissance des antigènes par le complexe TCR-CD3 (T cell Receptor) constitue le premier signal (signal 1) d'activation lymphocytaire. Les épitopes présentés par les molécules de classe II sont reconnus par les lymphocytes T-CD4, alors que les épitopes présentés par les molécules de classe I sont reconnus par les lymphocytes T-CD8. Un deuxième signal (signal 2) est initié suite à l'interaction des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) avec leur récepteur (CD28) sur les lymphocytes T. L'amplification du signal 1

par le signal 2 permet l'activation des facteurs de transcription qui vont favoriser l'expression de cytokines dont l'IL-2 par les lymphocytes T-CD4. L'IL-2 amplifie l'activation et la prolifération des lymphocytes T-CD4 selon un processus autocrine et des lymphocytes T-CD8 par un processus paracrine. Après activation, les cellules T seront amenées à se différencier sous l'action de différents médiateurs (IL-4, IL-6, IL-12, INF- γ). Les lymphocytes T-CD4 se différencient en lymphocytes auxiliaires ou helper (Th) et les lymphocytes T-CD8 en lymphocytes T cytotoxiques (Tc) (Golshayan et al., 2007; Halloran, 2004; Wood et al., 2013). Les cellules effectrices ainsi activées vont infiltrer le greffon et engendrer une cytotoxicité cellulaire directe via les lymphocytes Tc et une réponse inflammatoire, caractérisée par une augmentation de la perméabilité endothéliale et une production de chimiokines associées à une infiltration mononucléée interstitielle et au recrutement des cellules NK accentuant le phénomène inflammatoire et les dommages tissulaires (Wood et al., 2013) (Figure 5). Le rôle des macrophages dans le rejet aigu cellulaire sera abordé dans un chapitre spécifique (chapitre III.3).

Figure 5 : Mécanisme moléculaire du rejet aigu cellulaire
(Adapté de Golshayan et al., 2007 ; Halloran et al., 2004)



III.2 REJET AIGU HUMORAL

La responsabilité des anticorps dans la physiopathologie du rejet aigu d'allogreffe a été initialement décrite par Peter Gorer en 1936 suite à la découverte du système d'histocompatibilité de la souris, le système H2 (Gorer, 1936). Plus de 20 ans plus tard, les anticorps dirigés contre le système d'histocompatibilité humain (système HLA) ont été décrits par Jean Dausset (Dausset, 1958). Plusieurs travaux se sont ensuite intéressés au rôle des anticorps anti-HLA dans le rejet de greffe. En 1966, F. Kissmeyer-Nielsen et en 1969, Patel et Terasaki ont pu démontrer que des rejets hyperaigus de greffes rénales étaient liés à la présence, chez le receveur, d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur (Kissmeyer-Nielsen et al., 1966; Patel and Terasaki, 1969). Actuellement, il est considéré que les anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur sont associés à la survenue d'un RAH et une réduction de la survie du greffon.

Dans le poumon, la responsabilité des anticorps anti-HLA contre le donneur est surtout bien connue dans la physiopathologie du rejet hyperaigu (Bittner et al., 2001; Frost et al., 1996). Les données de la littérature sur le RAH sont limitées à de quelques études de cohorte (DeNicola et al., 2013; Witt et al., 2013) et des cas cliniques isolés. En revanche, de nombreux travaux ont démontré le lien entre la présence des anticorps anti-HLA et le développement d'un rejet chronique sous forme de BOS (Angaswamy et al., 2010; Brugière et al., 2013; Girnita et al., 2005; Morrell et al., 2014; Palmer et al., 2002; Safavi et al., 2014). En 2007, l'ISHLT a introduit le RAH dans le « working formulation for the diagnosis and classification of lung allograft » sans qu'un consensus clair soit établi pour le diagnostic du RAH (Stewart et al., 2007a). En 2013, bien qu'aucune définition exacte sur les critères du RAH n'ait été établie, le conseil de pathologie de l'ISHLT a conclu que le diagnostic du RAH pulmonaire nécessitait une approche multidisciplinaire incluant dysfonction du greffon, présence de DSA circulants, dépôts de C4d dans la microcirculation et lésions histologiques (inflammation microvasculaire, agression alvéolaire aiguë, artérite) (Berry et al., 2013b). Malgré les progrès réalisés au cours de ces dernières années dans la reconnaissance du RAH pulmonaires, les critères de diagnostic, en particulier, anatomopathologiques restent largement débattus (Cohen et al., 2012; Glanville, 2010, 2013).

III.2.a Aspects générales

i. Système HLA

Les gènes codant pour les molécules du CMH (ou HLA, Human Leukocyte Antigen), présentes à la surface de la majorité des cellules humaines (HLA de classe I) ou ayant une expression restreinte à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (HLA de classe II), sont présents sur le chromosome 6.

Les gènes du CMH sont répartis en trois classes (en fonction de la localisation des gènes sur le chromosome, la structure et la fonction des molécules de CMH) :

- Les gènes de classe I codent 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. Pratiquement toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment, en nombre variable en fonction du type cellulaire, des molécules de classe I. Ces molécules de classe I sont composées de deux chaînes polypeptidiques α et β , qui présentent toutes deux des domaines « immunoglobuline-like » et qui sont associées de manière non covalente. La chaîne α (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. Elle présente trois domaines, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. La chaîne β (ou chaîne légère) dite $\beta 2$ -microglobuline est non-polymorphique, elle est codée par un autre gène non présent dans le CMH et assure un maintien de la conformation.

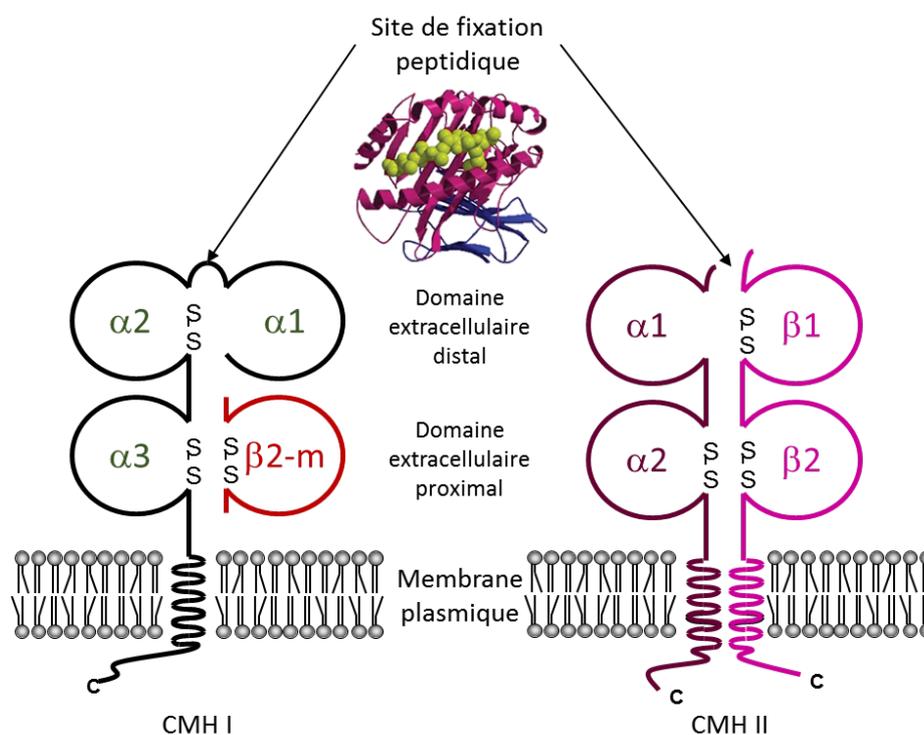
- Les gènes de classe II codent les molécules de classes II du CMH. Les plus importantes sont les gènes HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR qui codent pour les molécules du même nom. Les molécules de classe II du CMH permettent la présentation du peptide antigénique aux lymphocytes T CD4. Elles sont exprimées constitutivement par les lymphocytes B, les lymphocytes T activés, les cellules dendritiques et autres cellules présentatrices d'antigène. Leur expression peut être aussi induite sur de nombreuses cellules dont les cellules endothéliales et épithéliales en cas de réaction inflammatoire. Ces molécules de classe II sont également composées de deux chaînes polypeptidiques α et β , qui présentent toutes deux des domaines « immunoglobuline-like », associées de manière non covalente, et qui

sont toutes deux codées par le CMH. La chaîne α présente deux domaines, $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et la chaîne β présente deux domaines, $\beta 1$ et $\beta 2$.

- Il existe aussi des gènes de classe III qui codent pour des molécules très différentes n'intervenant pas dans la présentation de l'antigène. Les gènes de classe III codent diverses protéines sécrétées qui ont des fonctions immunitaires, parmi lesquelles figurent des composants du système du complément (C2, C4) et des molécules impliquées dans l'inflammation (TNF).

Les molécules du CMH sont constituées de 4 parties caractéristiques : la région de liaison au peptide antigénique, ou région PBR (*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. LA région PBR forme une cavité dans laquelle est localisé le peptide antigénique (Figure 6). 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 (CMH I) et le CD4 (CMH II). Les régions transmembranaire et intracytoplasmique sont uniques (chaîne $\alpha 3$) pour le CMH de classe I et doubles (chaîne $\alpha 2$ et chaîne $\beta 2$) pour le CMH de classe II.

Figure 6 : Représentation schématique des molécules du CMH



ii. Anticorps anti-HLA

La compatibilité HLA est présentée comme un outil nécessaire, voire indispensable, pour garantir une survie optimale du greffon. Depuis la pratique systématique du crossmatch pré-greffe, les rejets hyperaigus ont pratiquement disparu, cependant, la présence des DSA (préformés ou *de novo*) reste problématique. Les DSA sont considérés comme une des causes et facteur aggravant des rejets aigus et des rejets chroniques, entraînant l'évolution défavorable du greffon à long terme.

Méthodes de détection des anticorps anti-HLA

Des progrès majeurs ont été accomplis ces dernières années dans le domaine de détection des anticorps anti-HLA. Ces progrès ont été pour beaucoup dans la reconnaissance du rejet humoral et dans la prise de conscience de son importance pronostique. En effet, l'émergence de nouvelles techniques permet désormais de détecter les anticorps anti-HLA avec une grande sensibilité tout en identifiant précisément leur spécificité antigénique. Ainsi, parallèlement aux tests cellulaires, dont la «Lymphocytotoxicité (LCT) Dépendante du Complément (CDC)», se sont développées plus récemment des méthodes dites de phase solide utilisant des antigènes HLA fixés sur des supports variables, l'ELISA (puits) ou le luminex (billes) (Figure 7).

La LCT consiste à mettre le sérum à tester en présence de lymphocytes B et T allogéniques exprimant des haplotypes HLA connus (panel ou lymphocytes du donneur potentiel), et de complément de lapin. On évalue ensuite la mortalité cellulaire causée par les alloanticorps présents dans le sérum en ajoutant un « colorant vital ». Si la lyse cellulaire est supérieure à 20 %, le test est positif. La LCT permet de mettre en évidence des anticorps fixant le complément. En utilisant le dithiotreitol (DTT), il est possible avec la LCT de déterminer si les anticorps anti-HLA présent dans le sérum du receveur sont des IgG ou des IgM. La distinction entre anticorps de classe I et II peut être réalisée par adsorption des sérums sur pool de plaquettes. Cette technique permet également de quantifier l'immunisation en évaluant le pourcentage de cellules du panel (PRA, *Panel Reactive Antibody*) reconnues par les anticorps anti-HLA du receveur (un sujet ayant un taux >80% est dit hyperimmunisé). La technique de LCT a de nombreux avantages (test fonctionnel, identification des anticorps fixant le complément, détection des IgG et IgM), mais aussi de nombreuses limites : faible

reproductibilité (panel propre à chaque laboratoire), incapacité d'identifier avec précision l'ensemble des antigènes cibles, faible sensibilité et difficilement automatisable (Dheda et al., 2013; Tait et al., 2013).

La technique de LCT est le test de référence pour réaliser le crossmatch avant transplantation (sérum du receveur mis en présence des lymphocytes du donneur), un crossmatch positif étant une contre-indication à la greffe en raison du risque de rejet hyperaigu. Toutefois, en transplantation pulmonaire, vu les temps réduits d'ischémie des greffons (4 - 5h), le crossmatch peut être effectué rétrospectivement pour les patients non immunisés ou pour les patients dont le statut immunologique a été bien défini (définition sans ambiguïté de toutes les spécificités d'anticorps anti-HLA de classe I et de classe II et des antigènes permis) (<http://www.agence-biomedecine.fr>).

Le crossmatch par cytométrie de flux est une autre technique permettant de tester la présence d'anticorps anti-HLA. Cette technique consiste à mettre le sérum du receveur en présence de lymphocytes du donneur isolés du sang périphérique. Lorsque des anticorps anti-HLA sont présents dans le sérum, ils se fixent sur les antigènes à la surface des lymphocytes du donneur dont ils sont spécifiques. La révélation se fait ensuite avec des anticorps secondaires anti-IgG ou IgM couplés à un fluorochrome. Cette technique est plus sensible que la LCT mais plus lourde à mettre en place et plus coûteuse (Tait et al., 2013).

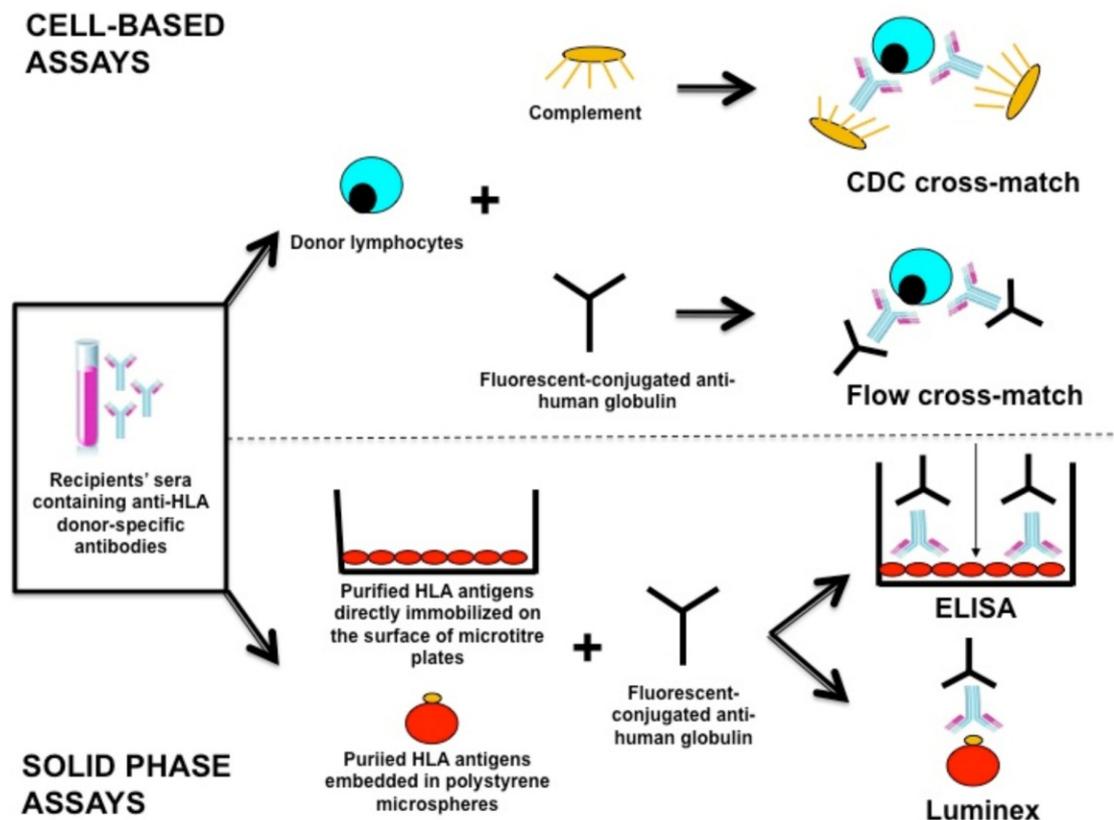
Les molécules HLA purifiées ont permis par la suite de développer des techniques dites de « phase solide », plus sensibles et plus spécifiques : l'ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) et le Luminex. Le principe de ces techniques repose sur la reconnaissance d'antigène HLA solubles purifiés, fixés sur un support solide (plaques, billes).

La technique par ELISA consiste à mettre le sérum à tester en présence des antigènes HLA purifiés préalablement fixés au fond des puits de plaques. Si des IgG anti-HLA sont présentes dans le sérum, elles se lient aux antigènes HLA fixés au fond de puits et pourront être révélées par une réaction colorée.

La détection des anticorps anti-HLA a encore été améliorée par l'introduction de la technologie Luminex Single Antigen. Le principe de cette technique est proche de celui de la technique ELISA. Elle utilise des microsphères sur lesquelles sont fixées des molécules HLA purifiées. La fixation des anticorps anti-HLA à la surface des microsphères est révélée par un

anticorps secondaire anti-IgG couplé à un fluorochrome (lecture des résultats par un cytomètre de flux spécifique). Le taux d'anticorps anti-HLA est donc exprimé en intensité moyenne de fluorescence (ou MFI, Mean Fluorescent Intensity). Cette méthode a permis d'augmenter la sensibilité de la détection des anticorps anti-HLA tout en permettant d'en déterminer précisément les spécificités. Cependant elle se heurte à un certain nombre de difficultés. En effet la technologie luminex est sujette à un effet prozone en présence d'un taux élevé d'anticorps conduisant à des résultats faussement négatifs ou faiblement positifs (Lachmann et al., 2013; Tambur et al., 2015). En cas d'excès d'anticorps, ils vont être en compétition pour occuper les sites antigéniques disponibles. La saturation des sites va empêcher l'agglutination et les agrégats vont être très peu ou pas du tout visibles. L'effet prozone peut être dû également à la présence du complément C1 en déplaçant par compétitivité les anticorps de détection (Schwaiger et al., 2014; Weinstock and Schnaidt, 2013). D'autres travaux ont démontrés que les IgM peuvent être responsables de l'effet prozone. En effet les IgM pourraient rentrer en compétition avec les IgG et bloquer les sites de liaison des IgG sur les billes (Kosmoliaptsis et al., 2009, 2010). Pour éviter ce phénomène, le sérum pourrait être dilué, traité avec du DTT ou de l'EDTA (Ethylène diamine tétraacétique) (Kosmoliaptsis et al., 2009; Schnaidt et al., 2011; Weinstock and Schnaidt, 2013; Zachary et al., 2009). A l'inverse, des résultats faussement positifs, dus à la présence d'épitopes dénaturés, peuvent être obtenus avec la technologie luminex. Ces épitopes dénaturés pourraient être générés au cours du processus d'extraction et de purification des molécules HLA (Grenzi et al., 2013).

Figure 7 : Différentes techniques de détection des anticorps anti-HLA (Dheda et al 2013)



Plusieurs paramètres sont à prendre en considération lors de la recherche des anticorps anti-HLA : la classe des molécules HLA (classe I et classe II) et le type d'immunoglobuline (IgG et IgM). En transplantation, seules les immunoglobulines G (IgG) sont considérées comme étant pathogènes (un patient est considéré immunisé s'il a un allo-anticorps d'isotype IgG dirigé contre un antigène HLA). Ainsi, les crossmatch 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 délétère. En transplantation rénale, une étude récente, chez des patients immunisés, a montré que 3/26 patients développaient un RAH sous eculizumab, un inhibiteur de la voie terminale (C5) du complément. Tous les patients avaient des DSA de type IgG et les 3 patients RAH avaient en plus des DSA de type IgM élevés suggérant qu'ils pouvaient être impliqués dans le mécanisme du RAH (Bentall et al., 2014).

En France, les recommandations de l'agence de la biomédecine pour le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes ou greffés préconisent de réaliser une détection d'anticorps anti-HLA de classe I et de classe II sur au moins deux sérums à trois mois

d'intervalle, par une technique sensible (cytométrie en flux, ELISA, Luminex, micropuces) et une fois par LCT sur lymphocytes T ou totaux, avec et sans DTT sur un panel représentatif. La recherche par LCT permet de détecter d'éventuelles IgM (Agence de la biomédecine, 2010).

Sources d'alloimmunisation

Les anticorps anti-HLA peuvent être produits suite à un événement immunisant avant la transplantation. Les principales sources d'alloimmunisation vis-à-vis des antigènes HLA restent à ce jour la grossesse, les transfusions sanguines et les transplantations antérieures d'organe solide.

- La grossesse est une cause majeure d'immunisation en raison de la présentation des antigènes foeto-paternels à l'interface materno-foétale. Les anticorps apparaissent dès la première grossesse et près de 30% des femmes sont immunisées dès leur deuxième grossesse.
- Les transfusions sanguines, l'allo-immunisation est due à la présence de leucocytes résiduels dans les concentrés globulaires et plaquettaires.
- Les transplantations antérieures d'organe solides sont responsables d'immunisations très larges.

Les anticorps anti-HLA peuvent également apparaître *de novo* après transplantation (incompatibilité HLA donneur-receveur). Les anticorps anti-HLA post-transplantation peuvent apparaître à n'importe quel moment, le risque de production de DSA augmentant avec le temps, la non observance du traitement immunosuppresseur et le nombre de mismatch HLA.

La recherche d'anticorps anti-HLA doit être effectuée au moins sur 2 sérums à 3 mois d'intervalle avant la transplantation selon les recommandations de l'agence de la biomédecine (www.agence-biomedecine.fr). Après la transplantation, une recherche d'anticorps anti-HLA à 3 mois, à 1 an puis une fois par an est recommandée pour tous les transplantations d'organes solides. Dans le suivi des patients TP à l'hôpital Foch, une recherche d'anticorps anti-HLA est réalisée selon les recommandations de l'agence de la biomédecine avant la transplantation, à J0, J7, puis tous les mois jusqu'à M6, tous les 3 mois

jusqu'à M12 et 1 fois par an après M12 post-transplantation et en cas de suspicion de rejet humoral et dans le cadre du suivi d'un traitement pour rejet humoral.

La fréquence des DSA après transplantation varie beaucoup selon les études et l'organe transplanté. Elle peut aller jusqu'à environ 60% dans certaine transplantation d'organe comme le rein, le cœur et le poumon (Hachem et al., 2010; Valenzuela and Reed, 2013). Dans le poumon, les facteurs de risque d'apparition de DSA sont l'histoire antérieure à la greffe (transfusion antérieure, transplantation antérieure), le sexe féminin, les grossesses antérieures, la positivité du crossmatch sur des sérums historiques et une augmentation des anticorps dirigés contre le panel (PRA). Leur apparition peut être aussi accentuée en cas de mismatch HLA-DRB1 (Wiebe et al., 2012) et par une immunosuppression insuffisante (non observance des traitements ou diminution de l'immunosuppression en raison de complications infectieuses ou tumorales).

La littérature illustre clairement le rôle délétère des DSA sur la survie du greffon. La présence des DSA préexistants ou de novo est associée à un résultat médiocre de la greffe. Dans le poumon, la présence de DSA en pré-transplantation est associée à une pronostic défavorable à long terme (Brugière et al., 2013) et les DSA de novo sont associés aux rejets aigus persistants et récurrents mais aussi au développement du rejet chronique (Girnit et al., 2004, 2005; Kauke et al., 2015; Morrell et al., 2014; Safavi et al., 2014).

iii. Anticorps non anti-HLA

Bien que les antigènes anti-HLA soient les principales cibles de la réponse allo-immune impliquée dans les phénomènes de rejet, les DSA anti-HLA semblent n'être présents que chez environ 60% des patients présentant un rejet humoral (Zhang et al., 2011). Cela suggère que des anticorps dirigés contre des antigènes non HLA peuvent également contribuer au développement des rejets humoraux. Dans la pratique clinique quotidienne actuelle, 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 aussi 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 (Zhang and Reed, 2009).

Si le rôle des anticorps non anti-HLA a été évoqué et leur pouvoir pathogène controversé, leur présence aurait un effet délétère et conduirait à l'apparition d'une dysfonction du greffon à long terme dans différents types de transplantations d'organes. Opelz et coll. ont démontré que les anticorps non anti-HLA étaient associés à un pronostic défavorable à long terme en transplantation rénale (Opelz and Collaborative Transplant Study, 2005; Otten et al., 2006). En TP, des études ont rapporté que les anticorps non anti-HLA étaient présents en post-transplantation et contribuaient au développement d'une BOS (Budding et al., 2014; Otten et al., 2006; Tiriveedhi et al., 2012).

Les antigènes cibles de ces anticorps non anti-HLA sont variés. Notamment, le MICA (Major histocompatibility class I related chain A) qui est une glycoprotéine apparentée au système du HLA, codée par des gènes localisés entre la région codant les molécules du CMH du chromosome 6. Il est considéré comme une cible potentielle de l'allo-immunité du fait de son polymorphisme et de son expression sur les cellules endothéliales en cas de stress due à une lésion d'ischémie-reperfusion ou à un rejet (Hankey et al., 2002). Des récentes études ont rapporté la corrélation des anticorps anti-MICA à un résultat médiocre, en particulier, en transplantation rénale et cardiaque. Zhang et coll. (Zhang et al., 2011) ont, après détermination des génotypes MICA pour les donneurs et les receveurs, démontré une corrélation significative entre le développement des anticorps anti-MICA et la survenue du rejet humoral en transplantation cardiaque. Dans certains cas, des anticorps spécifiques du donneur anti-MICA étaient identifiés en l'absence d'anticorps anti-HLA, indiquant que les anticorps anti-MICA pouvaient être à l'origine du rejet. In vitro les anticorps anti-MICA se sont avérés responsables d'une cytotoxicité dépendante du complément suggérant leur contribution à la pathogenèse du rejet humoral (Zou et al., 2002).

Le rôle d'autres antigènes dans la survenue d'un rejet humoral tels que les AECA (Anti-endothelial cell antibody) a été suggéré par plusieurs études. Les AECA représentent un groupe hétérogène d'anticorps (IgM, IgG), dirigé contre une variété de déterminants antigéniques exprimés à la membrane des cellules endothéliales (Bordron et al., 2001; Servettaz et al., 2008). La présence des AECA en pré-transplantation est associée à une augmentation de la fréquence du rejet aigu rénal et une baisse de la survie du greffon à long terme (Ismail et al., 2009). En transplantation cardiaque, Fredrich et coll. (Fredrich et al.,

1999) ont trouvé une corrélation significative entre la présence des AECA en post-transplantation et le rejet humoral (documenté et traité). Par ailleurs ils ont démontré que la survie du greffon (2 ans) était meilleur dans de le groupe sans AECA.

Enfin, les anticorps non HLA dirigés contre la vimentine, la myosine cardiaque, le collagène V (Col V), l'agrine ou encore le récepteur de type I de l'angiotensine II (AT1) semblent également avoir un effet délétère sur les transplants (Dragun et al., 2012; Giral et al., 2013; Sigdel and Sarwal, 2013; Sumitran-Holgersson, 2008).

III.2.b Physiopathologie du rejet aigu humoral

Le processus humoral est initié par la liaison des DSA aux alloantigènes (HLA ou non HLA) sur les cellules endothéliales du greffon. Cette liaison peut entraîner une activation de la voie classique du complément aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC, membrane attack complex), responsable de la lyse des cellules endothéliales et au recrutement des cellules inflammatoires. D'autres voies indépendantes du complément peuvent également être activées : la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) et l'activation endothéliale.

L'importance relative de ces différents mécanismes effecteurs du rejet est difficile à apprécier, mais tous concourent à l'apparition des lésions histologiques qu'on peut observer en cas de rejet humoral.

i. Activation du complément

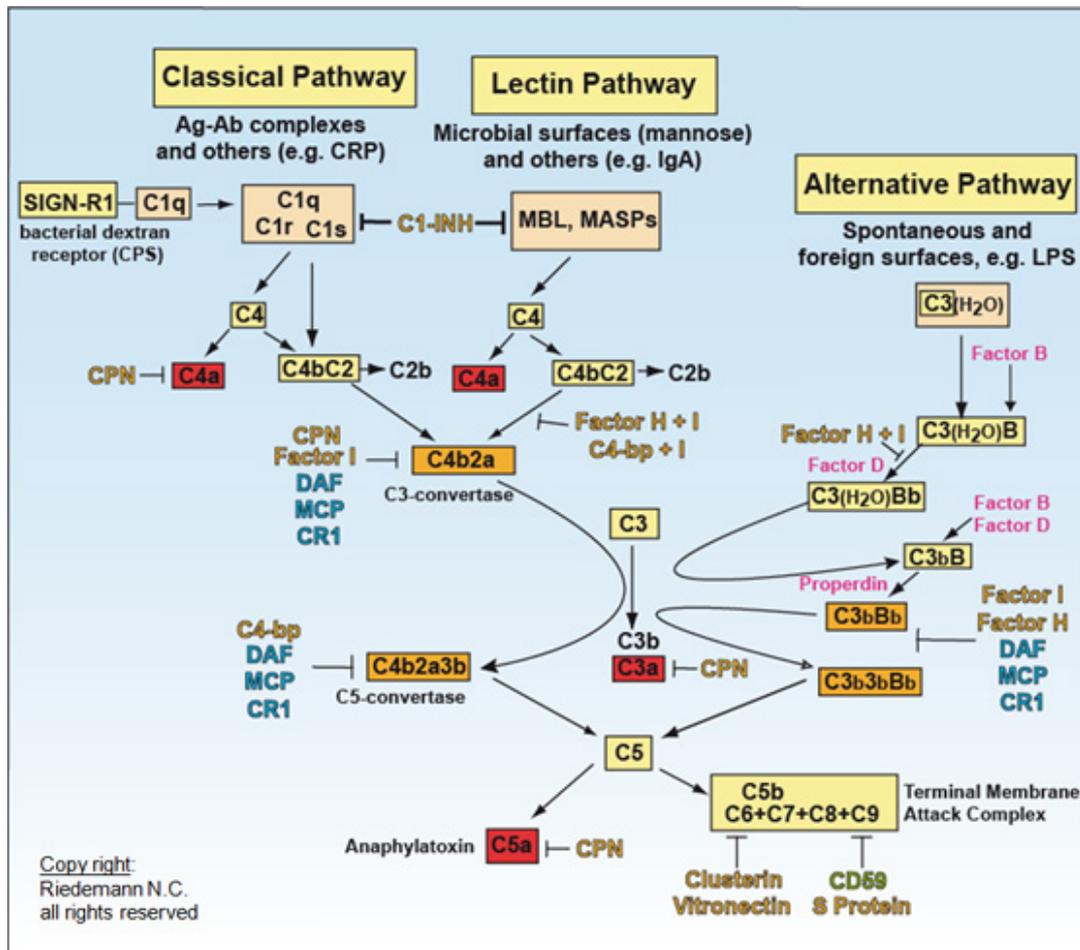
L'action des anticorps anti-HLA au cours du rejet est en grande partie liée à leur capacité à fixer le complément et à l'activer par la voie classique.

L'activation du complément entraîne des cascades d'activation par protéolyse successive de protéines plasmatiques. Elle peut se faire par trois voies différentes : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Figure 8). La voie classique nécessite une reconnaissance spécifique préalable d'un antigène par un anticorps, elle fait le lien entre les réponses immunitaires innées et adaptatives. La voie alterne et la voie des lectines sont activées directement par les membranes des pathogènes. La voie alterne lutte contre les infections

en facilitant l'opsonisation des agents infectieux, elle est activée par des substances d'origine bactérienne telles que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives, par des bactéries Gram positives, des virus ou des cellules infectées ou transformées. La voie des lectines est activée par les structures carbohydrates des micro-organismes. Ces trois voies d'activation convergent vers la protéine centrale du système du complément, appelée C3. Cette protéine est la cible des complexes enzymatiques issus des voies d'activation, ce qui entraîne son clivage et la production du fragment C3b. Ce dernier peut alors initier les différentes voies effectrices de l'activation du complément.

L'ensemble du système est régulé par un réseau de protéines régulatrices intervenant à différents niveaux (Figure 8). La voie classique est régulée par deux protéines circulantes spécifiques, le C1-Inhibiteur qui interagit avec le complexe C1 et empêche son auto-activation, et la *C4 binding protein* (C4bp), qui, se liant à C4b favorise sa dégradation en C4d par le Facteur I. La régulation, au niveau de l'initiation et de la dissociation de la C3 convertase alterne, est assurée par le Facteur H qui joue un rôle central pour discriminer les surfaces du soi et du non-soi. Il peut reconnaître les surfaces non-activatrices riches en polyanions comme l'acide sialique, l'héparane sulfate ou d'autres glycosaminoglycanes. Il contrôle l'initiation de la C3 convertase alterne en entrant en compétition avec le Facteur B pour la fixation de C3b. Le facteur H accélère également la dissociation de la C3 convertase alterne en déplaçant le fragment Bb de la C3 convertase active. Le Facteur I et ses cofacteurs pour la dégradation de C3b (facteur H, CR1 et MCP) sont également considérés comme des régulateurs de la voie alterne. Il est à noter que CR1 et MCP peuvent également servir de cofacteurs au facteur I pour la dégradation de C4b. La protéine membranaire DAF (Decay Accelerating Factor ou CD55) est un régulateur négatif des C3 et C5 convertases, classique ou alterne, qui accélère leur dissociation. Enfin, le complexe d'attaque membranaire est sous le contrôle de deux protéines, une plasmatique, la protéine S, et une membranaire, CD59, qui empêchent la formation sur les membranes, respectivement, des complexes C5b-7 et C5b-8, et la polymérisation de C9.

Figure 8 : Voies d'activation du complément (humpath.com)



Dépôt de C4d

Les immunoglobulines IgG1, IgG3 et IgM sont capables d'activer la voie classique du complément chez l'homme. Ainsi, lorsque les DSA se fixent sur les CMH des cellules endothéliales du greffon, ils entraînent le recrutement du complexe C1. Leur liaison avec le C1q entraîne l'auto-activation de C1r, qui clive et active C1s (C1r et C1s sont des sérines estérases, avec le C1q l'ensemble forme le complexe C1). Le composant C1s activé clive alors le composant C2 et C4 libérant deux fragments C2a et C4b respectivement. 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 C4d, ne présentant pas d'activité

catalytique. 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 disparaîtrait ensuite en quelques jours voire seulement 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, capillaires alvéolaires dans le poumon) 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.

L'activation de la voie terminale du complément est cruciale pour développer un RAH (Stegall et al., 2011, 2012). La C3 convertase va activer et cliver le C3 en C3a et C3b. Le C3b se lie de façon covalente à la C3 convertase, l'ensemble forme la C5 convertase qui va cliver la C5 en C5a et C5b. Le C5b peut s'associer aux composants C6, C7, C8 et C8 formant ainsi le complexe mC5b9 ou le complexe d'attaque membranaire induisant une lyse osmotique de l'endothélium. La surface endothéliale ainsi lésée devient thrombogène conduisant à une thrombose artérielle et/ou capillaire suivie d'une nécrose du greffon.

L'activation du complément participe au recrutement des cellules inflammatoires par l'activité chimioattractante des anaphylatoxines C3a et C5a (libérés suite au clivage respectif de C3 et de C5). Ces médiateurs agissent sur des récepteurs spécifiques, C3aR et C5aR, présents à la surface des neutrophiles, des macrophages et des cellules épithéliales.

Les neutrophiles et les macrophages répondent à C3a et à C5a par une augmentation de leurs mouvements (chemokinèse) et leurs déplacements directionnels (chimiotactisme). C3a et C5a augmentent également l'expression des molécules d'adhérence favorisant l'adhérence à l'endothélium et la migration des neutrophiles et les macrophages dans le tissu. Enfin en déclenchant la dégranulation des mastocytes, avec libération d'histamine et d'autres molécules vasoactives, ils augmentent indirectement la perméabilité des capillaires. Sur les cellules endothéliales, C3a et C5a induisent une augmentation de sécrétion de cytokines et chimiokines comme l'IL-1 α , IL-6, RANTES et IL-8. Les cellules endothéliales

activées expriment des molécules d'adhésion comme l'E-sélectine, le VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1) et ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) favorisant l'adhésion leucocytaire (Figure 9).

Le complément est un médiateur important du rejet humoral. Dans un modèle animal de greffe de cornée, il a été démontré que la présence des DSA pouvait induire des lésions du greffon dépendantes du complément (Hegde et al., 2002). Sur d'autres modèles animaux de greffe pulmonaire et rénale, les antagonistes du complément (DAF, CD59) retardent l'apparition du rejet humoral (Azimzadeh et al., 2003; Ménoret et al., 2004).

Chez l'homme, l'inhibition de la voie terminale du complément avec un anticorps anti-C5 (eculizumab) réduit l'incidence du RAH chez les patients transplantés rénaux immunisés (Bentall et al., 2014; Stegall et al., 2011).

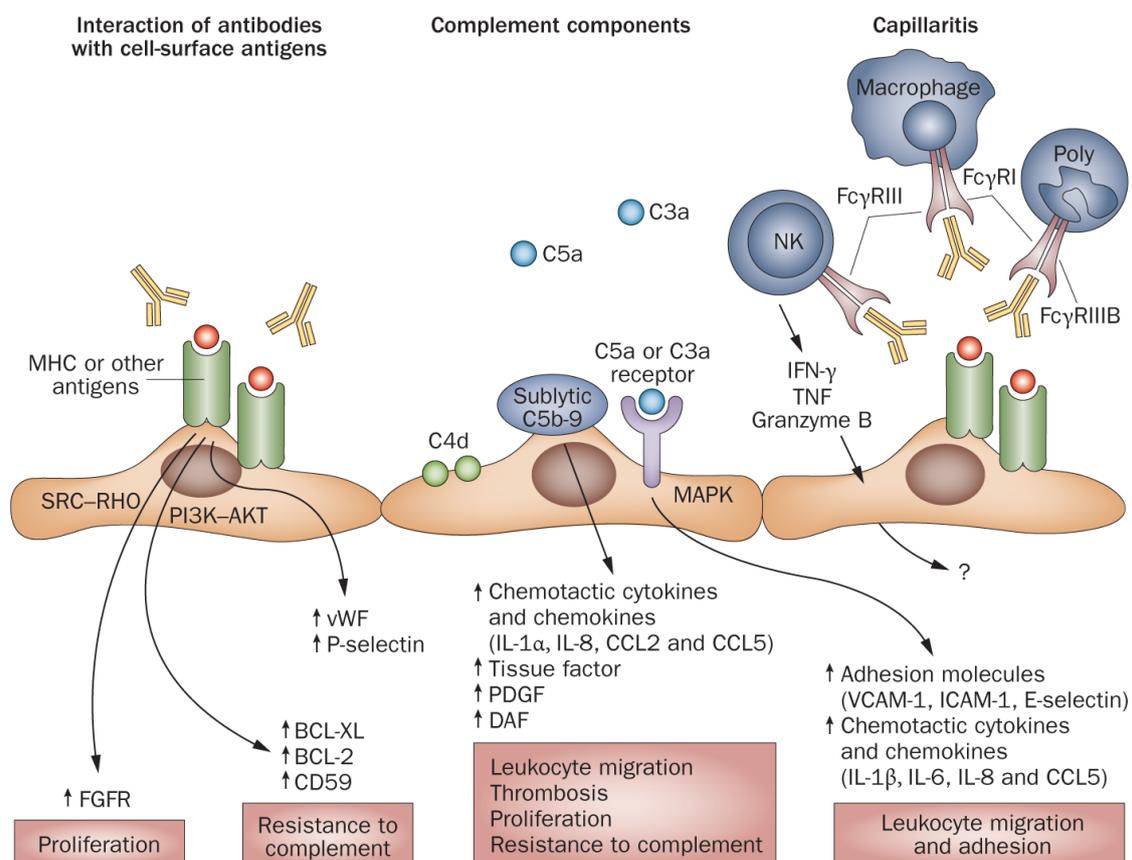
ii. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

D'autres voies, indépendantes du complément peuvent également contribuer et/ou aggraver les phénomènes de rejet. La région Fc des anticorps peut interagir avec le récepteur FcγRIII (CD16) exprimé à la surface des cellules NK qui exercent leur activité lytique sur les cellules cibles. Ce mécanisme connu sous le nom de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) est encore incomplètement compris. Néanmoins, quelques études ont montré l'implication des cellules NK dans le rejet de greffe. En 1990, Kirby et coll. ont montré que les anticorps des patients immunisés augmentent la capacité lytique des cellules CD3-CD16+ (NK) du sang périphérique contre l'épithélium rénal (Kirby et al., 1990). Les équipes de Halloran ont également démontré, en cas de RAH, une augmentation de cellules CD56+CD68+ dans les capillaires péri-tubulaires et une augmentation d'expression des transcrits de cellules NK (Hidalgo et al., 2010; Venner et al., 2015). Certaines données indiquent la participation de ce mécanisme dans le rejet humoral chronique. La fixation des DSA sur les cellules endothéliales entraîne une évolution vers la maladie vasculaire du greffon par l'intervention des cellules NK, dans un modèle murin d'allogreffe (Hirohashi et al., 2012). Cette voie pourrait expliquer aussi les formes de rejet, C4d négatives chez l'Homme.

iii. Activation endothéliale

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 et dans les lésions coronaires de la maladie vasculaire du greffon (MVG) cardiaque (Lepin et al., 2006; Masetti et al., 2013; Valenzuela and Reed, 2013).

Figure 9 : Effets des anticorps et du complément sur les cellules endothéliales humain (Farkash and Colvin, 2012)



iv. Accommodation

La présence des DSA circulants ne conduit pas toujours à un rejet du greffon. Certains patients (20% à 30% de patients immunisés) maintiennent un bon fonctionnement du greffon en dépit des anticorps anti-HLA (Valenzuela and Reed, 2013). Ce phénomène est connu sous le nom d'« accommodation » ou résistance du greffon aux lésions induites par les anticorps. L'accommodation a d'abord été observée au cours des transplantations rénales ABO incompatibles. Dans ce contexte, les anticorps antiA/B étaient éliminés par échange plasmatique ou immuno-adsorption et l'accommodation obtenue en dépit de la réapparition des anticorps et de la forte expression des antigènes A/B à la surface des cellules endothéliales.

Ce phénomène d'accommodation reste peu exploré. Il a été suggéré que les anticorps peuvent induire l'expression de protéines cytoprotectrices et/ou réguler des composants terminaux du complément conduisant à une accommodation.

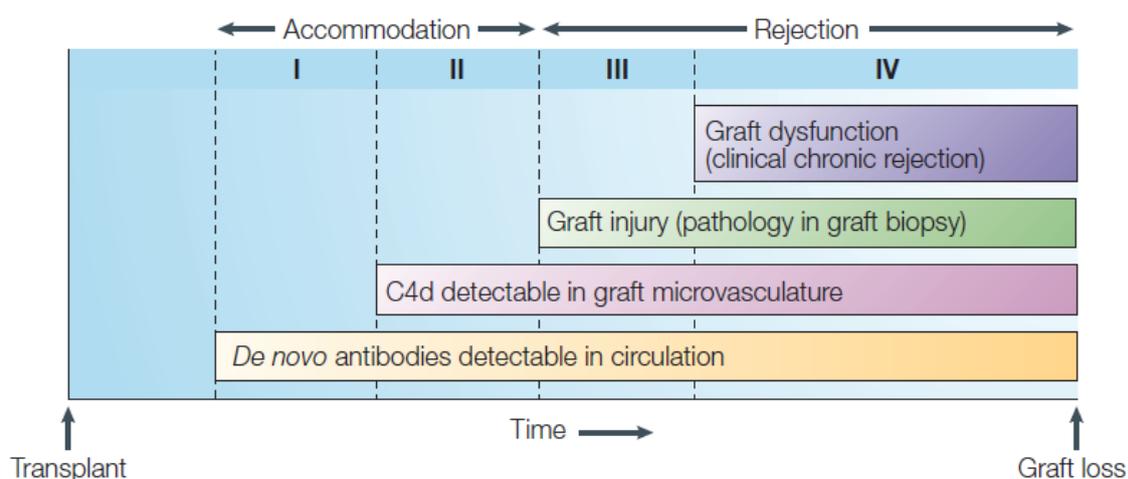
L'accommodation peut être induite par des injections répétées de faibles quantités d'anticorps anti-donneur dans un modèle de xéno greffe de cœur de rat vers la souris (Ding et al., 2008). Cette administration de faibles doses d'anticorps augmente l'expression des protéines régulatrices du complément DAF (decay accelerating factor), Crry (complement receptor-related protein) et CD59 par l'endothélium du greffon. Ces trois protéines régulent négativement l'activation du complément et inhibent le rejet hyperaigu.

Dans un modèle murin mimant la pré-sensibilisation anti-HLA, l'inhibition du complément par un anticorps anti-C5 prévient la survenue du RAH avec une augmentation de l'expression des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Wang et al., 2007). Une augmentation de l'expression de Bcl-xL a été observée dans l'endothélium de patients ayant un greffon rénal accommodé (Salama et al., 2001). Les cellules endothéliales humaines expriment CD46 ou MCP et CD55, qui inhibent le clivage de C3 et C5 par les convertases classiques et alternes. Les cellules endothéliales expriment également CD59 ("protectine") qui bloque l'insertion du complexe d'attaque membranaire dans la membrane cellulaire. L'accommodation des greffons cardiaques et rénaux pourrait être liée à l'augmentation de l'expression de CD55 et CD59 (González-Stawinski et al., 2008; Tan et al., 2009).

v. Evolution du rejet humoral au cours du temps

Compte tenu des connaissances sur la physiopathologie du rejet humoral, une classification théorique du rejet humoral a été proposée à la conférence nationale du NIH (National Institute of Health), en 2003 pour faciliter les recherches futures en transplantation d'organes solides (Figure 10) (Colvin and Smith, 2005; Takemoto et al., 2004). La première étape est la présence des DSA (préformés ou *de novo*) et correspondrait à une réponse humorale latente. La seconde étape est le dépôt de C4d dans les capillaires du greffon, on n'observe pas encore de lésions histologiques dans le greffon. L'ensemble de ces 2 premières étapes répond aux critères de l'accommodation et par conséquent ne conduit pas forcément à des lésions de rejet (rejet subclinique). Dans la troisième étape, en plus des dépôts de C4d, on observe des modifications histologiques sans pour autant présenter des signes cliniques (rejet infraclinique). Dans la dernière étape, la dysfonction du greffon s'ajoute au dépôt de C4d et aux modifications histologiques. Le délai entre chaque étape est variable de quelques jours (rejet aigu) à des mois voire des années (rejet chronique). Toutefois, le processus du RAH ne doit pas être seulement compris comme un phénomène épisodique ; il s'agit d'un processus évolutif qui ne démarre pas juste au moment du diagnostic histologique et ne s'achève pas à la fin du traitement.

Figure 10 : Représentation schématique de l'évolution du rejet humoral au cours du temps (Colvin and Smith, 2005)



III.2.c Diagnostic du rejet aigu humoral

Le rejet humoral est un processus complexe et se manifeste de différentes manières dans les différents types de transplantation d'organes solides. Son diagnostic repose sur une association de critères cliniques, immunologiques et anatomopathologiques (Takemoto et al., 2004) et est sans doute le mieux reconnu dans le rein et le cœur. Dans ce présent chapitre, nous allons discuter de l'état de l'art de diagnostic du RAH dans le rein et le cœur avant d'aborder le diagnostic du RAH dans le poumon.

i. Transplantation rénale

Le RAH en transplantation rénale est sans doute le mieux décrit et reconnu. Son incidence est estimée entre 0 et 8% selon les études. En plus d'une altération de la fonction rénale, le RAH était défini initialement par trois critères, selon la classification de Banff (Racusen et al., 2003) :

(1) des signes histologiques incluant une nécrose tubulaire aiguë, une inflammation microvasculaire (capillarite péri-tubulaire et glomérulite), une microangiopathie thrombotique et une artérite ; (2) un marquage par le C4d des capillaires péri-tubulaires ; (3) la présence des DSA circulants.

Compte tenu des progrès dans la compréhension du mécanisme du rejet humoral et grâce au développement des tests moléculaires, la définition du RAH dans le rein a été récemment modifiée (Haas et al., 2014).

La première modification concerne la place du C4d. D'après la classification de Banff citée ci-dessus, la positivité du marquage C4d est un élément important, voire indispensable, pour poser le diagnostic de RAH. Cependant la méthode de détection du C4d, que ce soit l'immunofluorescence ou l'immunohistochimie, est peu sensible. La positivité du C4d peut aussi fluctuer en fonction de l'évolution du rejet humoral. Plusieurs travaux ont ainsi démontré que parmi les patients avec un C4d négatif, environ 50 à 55 % avaient une inflammation de la microcirculation, lésion typique de rejet humoral (Loupy et al., 2009, 2011). Outre ces études clinicopathologiques, l'analyse des transcrits à partir de biopsies de rejet humoral C4d négatif ont montré une expression de gènes témoignant d'une agression endothéliale similaire à celle observée sur les biopsies de rejet humoral C4d positif (Sellarés et al., 2013; Sis et al., 2009). L'ensemble de ces observations a permis de développer le

concept de RAH C4d négatif et de préciser la place du C4d dans classification de Banff. La détection du C4d sert de critère de gravité mais n'est pas un critère indispensable pour poser le diagnostic de RAH. La définition du RAH repose ainsi actuellement sur les critères suivants : (1) des signes histologiques incluant une nécrose tubulaire aigue, une inflammation microvasculaire, une microangiopathie thrombotique ou une artérite ; (2) la preuve d'une interaction entre l'anticorps et l'endothélium : un marquage C4d des capillaires péritubulaires, une inflammation microvasculaire significative (scores g et cpt ≥ 2) ou une expression augmentée des transcrits témoignant d'une activation endothéliale ; (3) la présence de DSA circulants.

Le deuxième concept développé est celui du rejet humoral infraclinique. Cette entité a été décrite grâce à l'étude des patients avec un DSA au moment de la transplantation (Haas et al., 2007; Loupy et al., 2009). L'analyse des biopsies de surveillance a montré des lésions humorales typiques, notamment une inflammation de la microcirculation, en absence d'une défaillance du greffon.

ii. Transplantation cardiaque

Le RAH est une complication clinique reconnue et représente un risque majeur d'altération fonctionnelle du greffon à long terme en transplantation cardiaque. Le diagnostic du RAH cardiaque a beaucoup évolué depuis sa première description dans le « working formulation » de l'ISHLT en 1990. Il repose actuellement sur l'association de deux 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 (Berry et al., 2013b). En effet la reconnaissance du RAH asymptomatique et son association au développement précoce de la vasculopathie d'allogreffe et à une augmentation de la mortalité (Kfoury et al., 2009; Wu et al., 2009), a permis au conseil de pathologie de l'ISHLT en 2010 de recommander la suppression des critères cliniques et sérologiques dans la classification du RAH (Kobashigawa et al., 2011). Ainsi, la classification du RAH en transplantation cardiaque repose sur l'étude anatomopathologique. Selon la classification de l'ISHLT, on distingue quatre grades de pAMR (pathologic antibody-mediated rejection) (Berry et al., 2013b):

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

iii. Transplantation pulmonaire

Les critères diagnostiques de RAH rénale et cardiaque ont été adoptés par la communauté de transplantation pulmonaire pour appuyer le diagnostic de RAH pulmonaire. En 2013, le groupe de travail de l'ISHLT a passé en revue les résultats des travaux sur le RAH pulmonaire et bien qu'il ait constaté des contradictions entre les observations, le groupe est arrivé à la conclusion que le diagnostic du RAH pulmonaire nécessite une approche multidisciplinaire. Cette approche, qu'on appelle aussi le « triple test », inclut la présence d'une dysfonction clinique du greffon, des DSA circulants et des lésions histopathologiques dont le dépôt de C4d.

➤ *C4d et diagnostic de rejet aigu humoral pulmonaire*

Le rôle du C4d dans le diagnostic de RAH pulmonaire n'est pas encore clair. En effet très peu d'études ont investigué la signification du dépôt de C4d dans le poumon et les résultats de ces études sont contradictoires. Les travaux de Ionescu et coll. (Ionescu et al., 2005) ont montré une corrélation entre le marquage C4d et la présence de DSA. Girnita et coll. (Girnita et al., 2008) ont observé une fréquence de DSA plus élevée dans le groupe de patients C4d+ (89 % versus 35 % dans le groupe C4d-, $p < 0.05$). De plus, les auteurs ont observé une corrélation entre la présence de DSA et une baisse de la fonction respiratoire. Plus récemment Yousem et Zeevi (Yousem and Zeevi, 2012) ont observé une positivité de C4d en immunohistochimie dans 74 % des BTB de patients avec DSA contre 24 % chez les patients sans DSA. Dans cette étude, les dépôts de C4d étaient focaux (<50 % des capillaires marqués) dans la majorité des cas avec seulement 2 cas parmi 17 qui avaient un marquage diffus (>50 % des capillaires marqués). Witt et coll. (Witt et al., 2013) ont rapportés 21 cas de

RAH, la positivité de C4d était un critère diagnostique du RAH. A l'inverse, dans les travaux de Wallace et coll. (Wallace et al., 2005), des marquages non spécifiques de C4d (membranes hyalines, tissu élastique, protéines sériques, cellules endothéliales des petits et gros vaisseaux) ont été rapportés et les auteurs n'ont pas trouvé de corrélation avec les lésions histologiques. Denicola et coll. (DeNicola et al., 2013) n'ont pas trouvé également de corrélation entre les marquages C3d et C4d et les DSA. De même Roberts et coll. (Roberts et al., 2013), sur une cohorte de 92 patients, ont montré que la présence de DSA n'est pas associée à un marquage C4d réalisé par immunofluorescence.

Les causes potentielles de ces incohérences sont probablement multiples dont la variabilité des techniques d'immunomarquage (immunofluorescence versus immunohistochimie) utilisées entre les centres, la difficulté de la technique d'immunomarquage C4d dans le poumon (problème de reproductibilité) et l'absence de définition précise d'un marquage C4d positif. Par ailleurs, la qualité des BTB reste un problème majeur, les échantillons étant techniquement plus difficiles à analyser (à cause artéfact de prélèvement : biopsie écrasée (pince), hémorragie). Par conséquent très peu d'informations sont disponibles sur les conditions optimales de réalisation d'un immunomarquage avec l'anticorps anti-C4d.

Le C4d, « footprint » de l'activation du complément

Les immunoglobulines ainsi que la plupart des facteurs de la cascade d'activation du complément, dont la demi-vie est courte, sont rapidement éliminés rendant leur détection difficile voire impossible. Le C4d par sa persistance à la surface des cellules endothéliales de quelques jours voire quelques mois peut être détectable par les techniques immunohistochimiques conventionnelles et pourrait constituer un marqueur d'activation du complément. Le complément peut être activé de trois manières différentes mais seule la voie classique déclenchée par les anticorps et la voie des lectines activée par la protéine MBL impliquent une activation du C4. Un dépôt de C4d suggère donc une activation d'une de ces deux voies du complément.

L'intérêt du C4d ne se limite pas au rejet humoral dans la transplantation d'organes solides. Le marquage C4d est également utilisé comme marqueur de diagnostic ou facteur de mauvais pronostic dans des pathologies auto-immunes ou des pathologies liées à une anomalie de la voie du complément. Une augmentation d'expression de C4d dans le

placenta a été observée chez des patientes atteintes du syndrome des antiphospholipides (SAPL) ou de lupus érythémateux disséminé (LED) et ce dépôt de C4d s'est avéré associé à des anomalies du déroulement de la grossesse : fausse couche, retard de croissance, mort-né (Cohen et al., 2011; Shamonki et al., 2007). Dans des cas de pré-éclampsie, il a été aussi démontré que le dépôt de C4d est dû à une activation classique du complément au niveau du placenta et constitue un marqueur de risque (Kim et al., 2015). Dans les dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI) : pemphigoïde bulleuse (PB) et pemphigus vulgaire (PV), le C4d permet de confirmer le diagnostic (Villani et al., 2015). Enfin, le C4d a démontré son utilité dans le diagnostic de pathologies rénales liées à une anomalie de la voie du complément. Entre autres, la néphropathie à IgA dans laquelle le C4d est un facteur de mauvais pronostic (Espinosa et al., 2009, 2014). Une étude récente a aussi montré que le C4d peut être un marqueur des glomérulonéphrites médiées par les complexes immuns (néphropathie à IgA, glomérulonéphrite membranoproliférative ou GNMP, lupus, néphropathie glomérulaire membraneuse, glomérulonéphrite fibrillaire) et permet ainsi de les différencier de la glomérulonéphrite médié par la voie alterne du complément (Cook, 2015; Sethi et al., 2015).

Le C4d marque comme une « empreinte tissulaire » l'existence d'une fixation d'anticorps au niveau des cellules cibles et une activation du complément.

➤ ***Lésions histologiques de rejet aigu humoral pulmonaire***

En transplantation rénale et cardiaque, l'examen microscopique de biopsies du greffon lors d'un RAH est caractérisé par une dilatation des capillaires, une turgescence des cellules endothéliales et une augmentation des leucocytes circulants dont les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes. Des études de série rétrospective ont permis d'identifier des lésions similaires dans les biopsies transbronchiques de patients greffés pulmonaires. En 1998, Badesch et coll. (Badesch et al., 1998) ont décrit 5 cas de patients ayant développé une dysfonction du greffon associée à des lésions histologiques (différentes de celles observées en cas de rejet aigu cellulaire) appelées « capillarite pulmonaire » (« pulmonary capillaritis »). Ces lésions histologiques correspondaient à un œdème, une nécrose fibrinoïde, une infiltration de neutrophiles dans les cloisons alvéolaires et présence de globules rouges dans les espaces alvéolaires et dans l'interstitium inter-alvéolaires. Les

patients ont été traités par échange plasmatique avec une réponse transitoire. Une hypothèse de rejet aigu humoral a été ainsi avancée par les auteurs mais aucune recherche de DSA et aucun marquage C4d n'avait été réalisé. En 2005, Astor et coll. (Astor et al., 2005) ont rapporté une autre série de 40 cas de « capillarite pulmonaire ». Les auteurs ont conclu que la « capillarite pulmonaire » est probablement une forme de rejet aigu cliniquement et histologiquement différents et moins sensible à la corticothérapie que le rejet aigu cellulaire. En 2007, lors de la révision internationale de la classification du rejet, le terme « dommage capillaire » (« capillary injury ») au lieu de « capillarite » a été proposé pour décrire le spectre de lésions pouvant être liées au RAH.

De nombreuses études ont rapporté une corrélation entre la présence de DSA et la capillarite ou le dommage capillaire (Astor et al., 2009; DeNicola et al., 2013; Morrell et al., 2009; Yousem and Zeevi, 2012). Cependant, le terme « capillarite » ne décrivait pas les mêmes lésions dans chaque étude mettant en doute cette observation.

Le conseil de pathologie de l'ISHLT a publié, en 2013, un résumé récapitulatif des caractéristiques histopathologiques pouvant être observés dans le RAH pulmonaire (Berry et al., 2013a). Ces lésions, rapportées chez des patients présentant une dysfonction du greffon et des DSA, incluent : une capillarite à neutrophile, une margination de neutrophiles dans les cloisons alvéolaires, un rejet aigu cellulaire de haut grade ($\geq A3$), une inflammation bronchiolaire de haut grade (B2), des lésions d'agression alvéolaire aiguë avec ou sans dommage alvéolaire diffus (DAD), une artérite en l'absence d'infection ou de rejet aigu cellulaire et une bronchiolite oblitérante. Il est admis que ce pattern histologique ne sont pas spécifiques de RAH et que les lésions capillaires et les lésions d'agression alvéolaire aiguë peuvent se voir lors d'une infection, une toxicité médicamenteuse ou d'un syndrome d'ischémie-reperfusion. Toutefois, l'infiltration des capillaires alvéolaires par les neutrophiles apparaîtrait comme la lésion la plus fréquemment observée en cas de RAH.

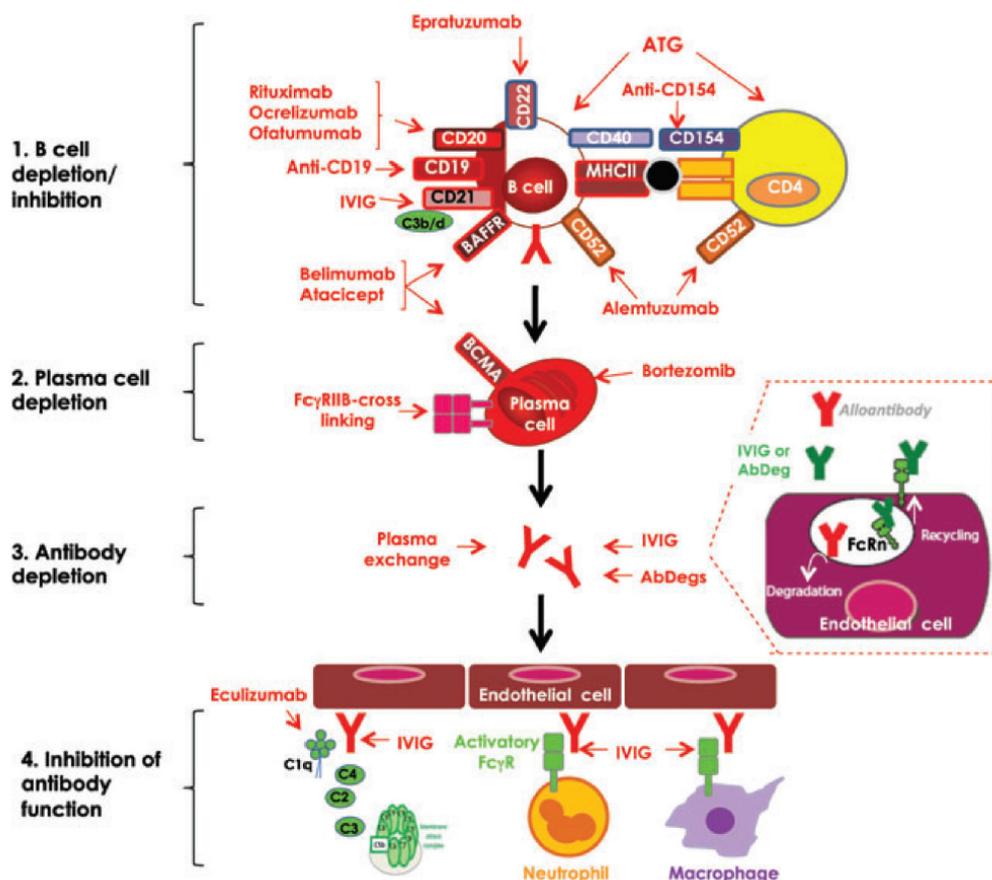
III.2.d Prise en charge thérapeutique du rejet aigu humoral

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 RAH est un évènement majeur dans l'évolution des greffons. Il est reconnu comme étant peu répondeur au traitement conventionnel comme les corticoïdes ou le sérum anti lymphocytaire. Seulement la moitié des cas RAH répond à ces traitements avec un taux de survie du greffon entre 15 à 65% (Kim et al., 2014). Ainsi les stratégies thérapeutiques du RAH sont de plus en plus spécifiquement orientées contre les anticorps anti-HLA, visant à les éliminer ou les bloquer (immunoglobulines intraveineuses, plasmaphérèse) (Figure 11). La meilleure compréhension du rôle des lymphocytes B et du complément a permis d'explorer d'autres traitements visant à inhiber la production des anticorps (rituximab, bortézomib, alemtuzumab) et le complément (eculizumab). Ces thérapies ont améliorées significativement la survie des greffons à court terme (Astor et al., 2005; Chen et al., 2012; Morrell et al., 2009; Neumann et al., 2010; Witt et al., 2013).

Figure 11 : Stratégies thérapeutiques du RAH (Clatworthy 2011)



III.3 MACROPHAGES DANS LE REJET AIGU

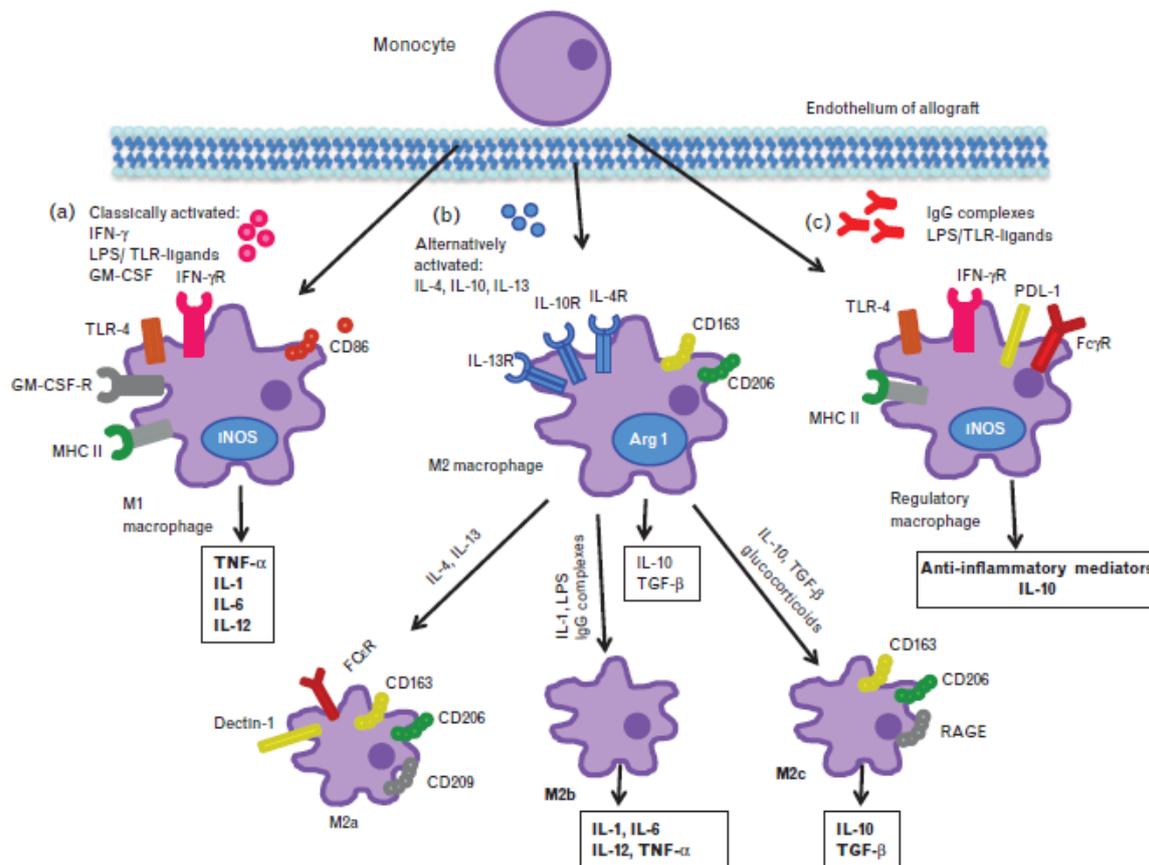
L'implication des macrophages dans le rejet aigu cellulaire et humoral sont de plus en plus connus. L'infiltration du greffon par les macrophages au cours d'un phénomène de rejet exacerbe les dommages tissulaires. Et à plus long terme, les macrophages contribuent à l'inflammation chronique du greffon et à la fibrose (Wyburn et al., 2005).

Des études ont montré chez les patients transplantés rénaux, une infiltration par les macrophages associée à une dysfonction du greffon au cours d'un rejet aigu (RA) (Girlanda et al., 2008) et à un dépôt de C4d dans les capillaires péri-tubulaires (Magil, 2005; Magil and Tinckam, 2003). En accord avec ces observations, une étude dans un modèle murin de greffe rénale a montré, d'une part, que les macrophages représentent 40 à 60% de l'infiltrat cellulaire et que leur déplétion avec du clodronate atténue les dommages tissulaires de RA (Jose et al., 2003). Lors d'un RAH, il a été récemment observé une accumulation des macrophages dans le greffon cardiaque prédictive de la présence de DSA et du dépôt de C4d (Fedrigo et al., 2013; Fishbein and Fishbein, 2012; Xu et al., 2014). Ainsi, l'infiltration des capillaires par les macrophages est un des critères diagnostiques de RAH recommandé par l'ISHLT dans la transplantation cardiaque (Berry et al., 2013b). Dans la greffe pulmonaire, le RA est caractérisé par une infiltration de cellules mononuclées qui contribuent à la perte de l'architecture alvéolaire et de la fonction pulmonaire.

L'infiltration du greffon peut résulter d'un recrutement des monocytes circulants mais aussi de la prolifération des macrophages résidents. L'attraction des cellules mononuclées aux sites de l'inflammation nécessite une étroite interaction des signaux inflammatoires et des chimiokines. Plusieurs études ont montré l'implication de divers chimiokines et de leurs récepteurs dans l'accumulation des macrophages dans le greffon. Le CX3CR1, le CCR5 et le CXCR3 peuvent être impliqués dans le recrutement des macrophages dans le greffon et leur blocage baisse l'infiltrat cellulaire et prolonge la survie du greffon (Akashi et al., 2005; Belperio et al., 2003; Hancock et al., 2003; Hoffmann et al., 2010; Kakuta et al., 2012). L'implication des chimiokines comme le MCP-1, le M-CSF et le MIF a été également démontrée (Grandaliano et al., 1997; Lan, 2008; Le Meur et al., 2002).

Les macrophages peuvent contribuer aux dommages tissulaires via la production de ROS (reactive oxygen species) et RNS (reactive nitrogen species) et la production de médiateurs inflammatoires (cytokines, dérivés de l'acide arachidonique, ...). Dans le poumon, le monoxyde d'azote (NO) exhalé est un marqueur biologique de l'inflammation des voies aériennes. Une concentration élevée de NO a été décrite chez les patients transplantés avec un RA (Gashouta et al., 2014). L'inhibition de iNOS (et par conséquent de la production de NO) réduit les lésions histologiques du RA, améliore la fonction et prolonge la survie du greffon (Roza et al., 2000; Worrall et al., 1996, 1997). Dans un modèle de greffe rénale, Jose et coll. ont montré qu'en inhibant spécifiquement les macrophages avec du clodronate, les dommages tissulaires sont atténués. Ce phénomène est lié à une baisse de l'infiltration du greffon par les macrophages et de production de iNOS (Jose et al., 2003). Des résultats similaires ont été obtenus par Qi et coll. chez des souris transgéniques CD11c-DTR (Diphtheria toxin receptor). Une injection de toxine diphtérique chez ces souris permet de dépléter les monocytes circulants et donc les macrophages infiltrant le greffon rénal. Ce dernier est accompagné d'une baisse d'expression de iNOS et une préservation des capillaires péri-tubulaires lors d'un RA (Qi et al., 2008).

Figure 12 : Plasticité et fonction des macrophages dans un contexte de rejet de greffe (Salehi and Reed, 2015)



III.3.a Etat d'activation des macrophages : concept de polarisation

i. Origine, population et fonction de macrophages pulmonaires

Les macrophages pulmonaires sont les seuls macrophages tissulaires à être en contact direct avec le milieu extérieur. De par cette localisation stratégique, les macrophages pulmonaires jouent un rôle clé dans la défense contre les agressions extérieures. Il existe 3 sous populations de macrophages au sein des poumons en fonction de leur localisation et de leur fonction: 1) Les macrophages alvéolaires sont présents à la surface des alvéoles pulmonaires et sont ainsi directement exposés aux particules inhalées, 2) Les macrophages tissulaires résident dans le parenchyme pulmonaire, espace formé entre l'épithélium alvéolaire et l'endothélium vasculaire, 3) Les macrophages intravasculaires sont quant à eux présent au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins.

Deux théories ont été mises en évidence sur l'origine des macrophages pulmonaires. La première étant une origine médullaire par chimioattraction des monocytes sanguins vers le tissu pulmonaire (Hunninghake et al., 1979; Landsman and Jung, 2007; Ungar and Wilson, 1935). L'interstitium pulmonaire produit un environnement favorable à la maturation des monocytes sanguins en macrophages interstitiels qui servent de stade intermédiaire avant leur différenciation en macrophages alvéolaires. Les macrophages alvéolaires sont ainsi considérés comme le stade terminal de différenciation des monocytes sanguins au niveau pulmonaire (Landsman and Jung, 2007).

La deuxième théorie étant une prolifération des macrophages résidant au sein du tissu *via* l'exposition au Colony Stimulating Factors (CSF) (Bitterman et al., 1984; Golde et al., 1974; Lohmann-Matthes et al., 1994). Une répllication *in situ* des macrophages pulmonaires est observée dans un modèle d'inflammation au carbone chez des souris présentant une leucopénie (Evans et al., 1986).

Les travaux de Adamson et coll. 1980, ont mis en évidence que les macrophages pulmonaires sont dans un premier temps issus d'un afflux des monocytes sanguins, suivi par une prolifération/répllication des macrophages pulmonaires (Adamson and Bowden, 1980; Lohmann-Matthes et al., 1994).

Les macrophages pulmonaires interagissent avec leur environnement *via* l'expression de nombreux récepteurs membranaires. Parmi ces récepteurs, les macrophages pulmonaires expriment les PPR (pattern recognition receptors), les récepteurs aux cytokines, les récepteurs au fragment constant des immunoglobulines (Ig) et au complément pour les particules opsonisées (Lohmann-Matthes et al., 1994).

Les macrophages jouent des rôles divers dans les réponses immunitaires innées et adaptatives dans le poumon. Ils y jouent particulièrement un rôle protecteur et de défense contre les différents pathogènes par leur activité de phagocytose mais également leur production de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance, les métabolites lipidiques et les espèces réactives de l'oxygène (Lohmann-Matthes et al., 1994) . Une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle existe entre les macrophages alvéolaires et interstitiels. Les macrophages alvéolaires ont une activité principalement microbicide, enzymatique, phagocytaire et métabolique qui apparait

plus intense que les macrophages interstitiels présents en seconde ligne de défense et plus impliqués dans la présentation des antigènes (Lohmann-Matthes et al., 1994).

ii. Concept de polarisation des macrophages

Au-delà de leur fonction classique de phagocytose leur permettant de participer à la clairance et à l'élimination d'agents pathogènes, les fonctions des macrophages dans la réponse immune s'avèrent beaucoup plus complexes. Notamment, leur production de médiateurs (cytokines, dérivés lipidiques, facteurs de croissance...) participant aux interactions avec le tissu avoisinant mais aussi au recrutement et à l'activation d'autres cellules immunitaires leur permet d'être des acteurs majeurs des processus de réparation tissulaire et de régulation de l'inflammation (Murray and Wynn, 2011).

La capacité des macrophages à subir une différenciation phénotypique a été largement documentée (Benoit et al., 2008; Gordon and Taylor, 2005; Mantovani et al., 2004). Les macrophages M1 produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β ou l'IL-12 à la suite d'une stimulation par l'IFN- γ ou le lipopolysaccharide (LPS) (Benoit et al., 2008; Gordon and Taylor, 2005; Mantovani et al., 2004). Ils exercent d'importantes fonctions effectrices dans l'élimination des agents infectieux grâce à leur production d'espèces réactives de l'oxygène et de monoxyde d'azote. A l'inverse, la différenciation des macrophages M2 est initiée par l'IL-4 ou l'IL-13. Ces macrophages M2 produisent notamment des cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- β (Mantovani et al., 2004). Selon le mode d'activation et leurs propriétés fonctionnelles, les macrophages M2 sont aujourd'hui divisés en trois sous-groupes (Martinez et al., 2008). Les macrophages M2a qualifiés de macrophages « réparateurs » et les macrophages M2b et M2c de « régulateurs et anti-inflammatoires » (Mosser and Edwards, 2008).

En réalité, la notion de polarisation M1/M2 recouvre un continuum d'états fonctionnels. Les macrophages peuvent ainsi être inflammatoires dans un premier temps avant de participer à la résolution de l'inflammation, ce qui suggère que leurs changements fonctionnels résultent de modifications de leur microenvironnement (Benoit et al., 2008; Gordon and Taylor, 2005). En réponse aux agents inducteurs de la polarisation, les macrophages modifient de manière spécifique leur profil de production des médiateurs de l'inflammation (cytokines, chimiokines, agents microbicides, métabolites lipidiques) ainsi que leurs activités

enzymatiques et phagocytaires (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2006, 2013). Ces profils différents, outre leur intérêt dans la compréhension des rôles des macrophages dans les réactions inflammatoires notamment pulmonaires, peuvent aussi servir à identifier les macrophages M1 et M2 au cours de ces processus.

iii. Polarisation et médiateurs de l'inflammation : chimiokines, cytokines et facteurs de croissance

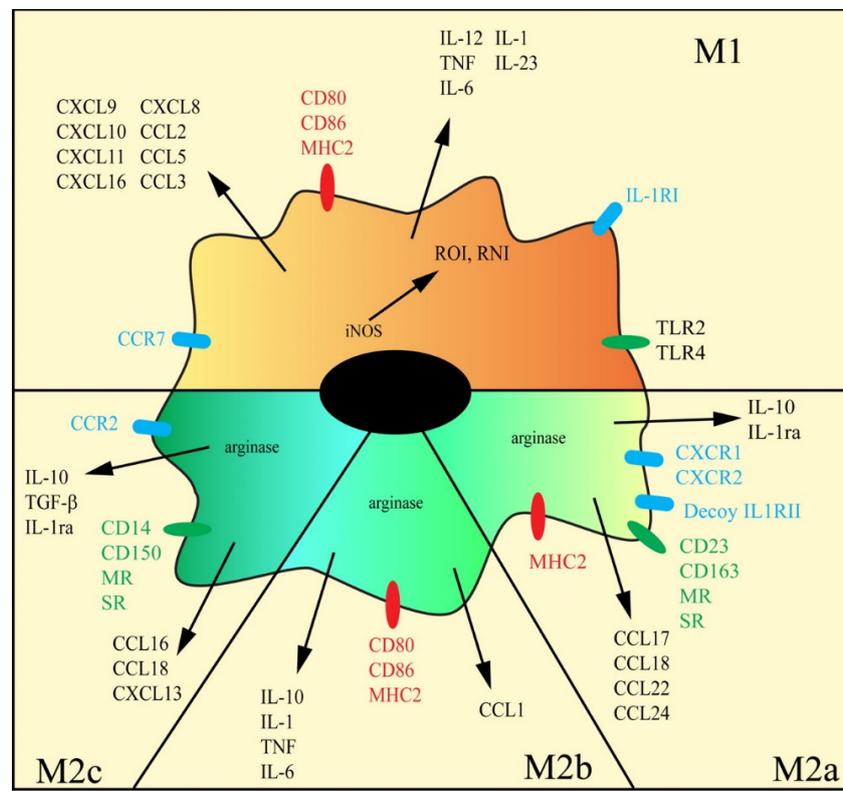
La polarisation des macrophages en phénotype M1 ou M2 modifie le profil de production des chimiokines. La polarisation M1 des macrophages dérivés de monocytes humains par le LPS et/ou l'IFN- γ est caractérisée par une augmentation de l'expression des chimiokines de type CC que sont CCL2, 3, 4, 5, 8, 15, 19, 20 et de type CXC que sont CXCL1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 16 (Benoit et al., 2008; Jaguin et al., 2013; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2006, 2009). Ces chimiokines sont impliquées dans l'activation et l'entretien de la réponse pro-inflammatoire de type cellulaire par le recrutement des lymphocytes Th1, lymphocytes cytotoxiques, Natural Killer, neutrophiles et monocytes. La polarisation M2a des macrophages dérivés de monocytes humains par l'IL-4 et l'IL-13 montre un profil de sécrétion de chimiokines spécifique de type CC que sont CCL13, 17, 18, 22, 23, 24 et 26 (Benoit et al., 2008; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2006, 2009). Ces chimiokines sont impliquées dans le recrutement des lymphocytes Th2, lymphocytes T régulateurs (Treg), éosinophiles et basophiles.

Concernant le phénotype M2b et M2c, leur profil de chimiokines a été évalué dans des modèles de monocytes mais pas de macrophages. Ainsi, il a été montré que les monocytes M2b stimulés par le LPS et IgG secrètent CCL1 qui participe au recrutement des lymphocytes Treg, des cellules dendritiques immatures et des monocytes (Benoit et al., 2008; Sironi et al., 2006). La stimulation des monocytes par l'IL-10, le TGF- β et les glucocorticoïdes induit un phénotype M2c qui conduit à l'expression des chimiokines CCL16, CCL18 et CXCL13 (Benoit et al., 2008; Hedrick et al., 1998; Mantovani et al., 2004; Pannellini et al., 2004). Ces chimiokines participent au recrutement des lymphocytes T naïfs, lymphocytes B, cellules dendritiques, monocytes, éosinophiles et contribuent : à l'immunorégulation, la réponse immunitaire adaptative et le retour à l'homéostasie (Mantovani et al., 2004).

Les cytokines et les facteurs de croissance sont également régulés au cours de la polarisation des macrophages. L'activation dite classique des macrophages M1 est caractérisée par une production de cytokines de type Th1 telle que l'IL-12 associée à une faible production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Martinez et al., 2008). La production d'IL-12 par les macrophages participe à l'entretien de la polarisation M1 *via* la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 (Mosser and Edwards, 2008; Schroder et al., 2006). Les macrophages M1 participent à la promotion et à l'entretien de la réponse inflammatoire *via* la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires que sont le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-23 qui participent à l'activation de la réponse Th1 et à l'activité microbicide des macrophages (Benoit et al., 2008; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). Une augmentation de l'expression de ces cytokines est retrouvée dans les macrophages M1 dérivés de monocytes humains stimulés par le LPS et l'IFN- γ (Jaguin et al., 2013; Martinez et al., 2006).

A l'inverse, les macrophages M2 possèdent une faible activité microbicide. L'IL-4 et l'IL-13 modulent l'activité pro-inflammatoire de l'IL-1 β *via* la production d'IL-1ra, un antagoniste endogène des récepteurs à l'IL-1 et l'augmentation de l'expression du récepteur leurre à l'IL-1 appelé IL-1RII (Mantovani et al., 2001; Martinez et al., 2008). Dans les monocytes, une diminution de la production d'IL-1 β est associée à une augmentation de l'IL-1ra (Fenton et al., 1992). Une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 et IFN- γ est également observée dans les macrophages M2a (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008) qui ont un faible pouvoir microbicide (Gordon, 2003; Novak and Koh, 2013). L'expression du TGF- β est augmentée dans les macrophages M2a dérivés de monocytes humains (Jaguin et al., 2013; Martinez et al., 2006). Le TGF- β contribue à la réparation et à la régénération tissulaire en induisant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la production de collagène par ces derniers (Gordon, 2003; Novak and Koh, 2013; Song et al., 2000).

Figure 13 : Chimiokines et cytokines spécifique de chaque phénotype de polarisation des macrophages (Benoit et al., 2008)



iv. Polarisation et médiateurs lipidiques : les eicosanoïdes

Au cours de la polarisation des macrophages, le métabolisme des lipides et la production des eicosanoïdes sont modifiés. L'une des voies les plus modulées au cours de la polarisation in vitro des macrophages pulmonaires humains est celle de l'acide arachidonique, dans laquelle l'expression des isoformes de la 15-lipoxygénase (15-LOX) et les cyclooxygénases sont différenciellement régulées au cours de la polarisation M1/M2.

Il existe 2 isoformes de la 15-LOX, la 15-lipoxygénase de type 1 (15-LOX-1) et de type 2 (15-LOX-2), codées respectivement par les gènes ALOX15 et ALOX15B. L'étude de Wuest et coll. (Wuest et al., 2012) a montré qu'il existe une régulation distincte de l'expression de ces deux isoenzymes dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés. En effet, dans les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés M1 par le LPS, l'expression de la 15-LOX-2 est augmentée alors que dans les macrophages polarisés M2a par l'IL-4 et l'IL-13, l'expression de la 15-LOX-1 et de la 15-LOX-2 est induite (Wuest et al., 2012). Des résultats

similaires ont été obtenus dans le laboratoire UPRES EA220 sur des macrophages pulmonaires stimulés par le LPS et l'IL4/IL13 ; ces derniers résultats montrent en outre le rôle amplificateur de ces 15-LOXs sur la production des chimiokines M1 et M2 (Abrial et al., 2015).

Il existe également 2 isoformes de la cyclooxygénase, codées par deux gènes différents. La cyclooxygénase de type 1 (COX-1) codée par le gène PTGS1 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1) et la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) codée par le gène PTGS2. L'action des COX-1 et COX-2 aboutit à la formation de prostaglandine (PG) dont la PGE₂, majoritairement produite par les macrophages et joue un rôle important dans les processus inflammatoires. Des études ont mis en évidence que l'expression des transcrits et l'activité de la COX-2 étaient augmentées dans les macrophages alvéolaires humains de phénotype M1 stimulés par le LPS, induisant une augmentation de la production de PGE₂ (Buenestado et al., 2012; Endo et al., 1998). A l'inverse, il a été montré que la polarisation M2a des macrophages alvéolaires par l'IL-4 diminue l'expression de la COX-2 et la production de PGE₂ (Endo et al., 1998).

v. Polarisation et protéines membranaires

La différenciation M1/M2 implique également des variations dans l'expression de protéines membranaires dont certaines ont été décrites comme plutôt spécifiques des phénotypes M1 (HLA-DR) ou M2 (CD206).

Les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T, ils présentent ainsi à leur membrane des molécules de CMH de types I et II. Les macrophages M1 sont caractérisés par une expression élevée de HLA-DR. Le HLA-DR est un marqueur qui a été utilisé pour identifier les macrophages M1 sur des coupes de tissu pulmonaire dans le cadre d'une étude sur le cancer du poumon non à petites cellules (Junliang Ma et al., 2010; Ohri et al., 2009, 2011). Les macrophages polarisés de type M1 par le LPS et/ou l'IFN- γ expriment aussi majoritairement les récepteurs TLRs comme le TLR4 et son co-récepteur le CD14 ainsi que les récepteurs Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIII (CD16) favorisant la clairance des pathogènes opsonisés par les IgG (Ambarus et al., 2012; Mantovani et al., 2004). L'expression du récepteur scavenger de type A, MARCO (Macrophage Receptor with

Collagenous Structure), impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des bactéries, est également un marqueur M1 (Peiser et al., 2002).

Dans les macrophages dérivés de monocytes humains et les macrophages murins, l'expression du récepteur MRC1 (ou CD206) est fortement induite en présence des cytokines Th2 que sont l'IL-4 et l'IL-13 mais également l'IL-10 (Martinez et al., 2006; Martinez-Pomares et al., 2003; Stein et al., 1992). Le CD206 a été décrit comme marqueur M2 dans des pathologies pulmonaires en particulier la BPCO et la fibrose (Chana et al., 2014; Kaku et al., 2014; Pechkovsky et al., 2010; Shaykhiev et al., 2009). Une étude transcriptomique montre également que les macrophages M2a dérivés de monocytes humains stimulés par l'IL-4 expriment le récepteur scavenger des macrophages de type 1 (MRS1) et des récepteurs de type lectine comme Dectin-1 (CLEC7A), DC-SIGN (CD209) et DCL-1 (CD302) impliqués dans la reconnaissance de pathogènes (Martinez et al., 2006). D'autres marqueurs membranaires comme FcεRII (CD23) et CD200R sont également exprimés par les macrophages dérivés de monocytes humains polarisés en phénotype M2a par l'IL-4 (Ambarus et al., 2012; Beyer et al., 2012; Koning et al., 2010).

Concernant la polarisation de type M2b et M2c des macrophages, il existe peu d'études sur la caractérisation des récepteurs pour ces deux profils de polarisation. Mais une étude récente montre que les macrophages M2c expriment le CD206 ainsi que les récepteurs FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) et le récepteur scavenger de type B CD163, impliqués d'une part dans la reconnaissance des particules opsonisées par l'IgG et d'autre part dans la clairance des complexes hémoglobine/haptoglobuline qui prévient de l'inflammation (Ambarus et al., 2012).

Tableau 6 : Marqueurs de la polarisation des macrophages

	M1	M2a	M2b	M2c
Stimulation-activation	INF- γ , LPS, GM-CSF	IL-4, IL-13	IL-1, LPS, complexes IgG	IL-10, TGF β , glucocorticoïdes
Cytokines	TNF α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23	IL-10, TGF β , IL-1ra	TNF α , IL-1, IL-6, IL-10	IL-10, TGF β , IL-1ra
Chimiokines	CCL2, 3, 4, 5, 8, 10, 11	CCL17, 22, 24, 26	CCL1	CCL18, CCL19, CXCL13
Expression membranaire	TLR2, TLR4, CCR7, CD80, CD86, CMH I, CMH II	CD23, CD163, CD206, CD209, Dectin-1, FC ϵ R	CD86, CMH II	CD16, CD32, CD206, SLAM
Enzymes	PTGS2, IDO, ALOX15B	ALOX15, TGM, MMP-12		
Fonction	Réponse de type Th1, inflammation de type I, activité cytotoxique, résistance tumorale	Réponse de type Th2, inflammation de type II, réparation, remodelage tissulaire	Activation Th2, immunorégulation	Immunorégulation, remodelage tissulaire, anti-inflammatoire

À l'heure actuelle, en transplantation pulmonaire, il n'existe aucun panel d'immunophénotypage pour caractériser la polarisation des macrophages dans le LBA ou sur du tissu pulmonaire. Dans notre étude, en se basant sur la littérature décrite ci-dessus et la disponibilité d'anticorps utilisable en cytométrie de flux, nous avons choisi le HLA-DR pour le marqueur M1 et le CD206 pour le marqueur M2.

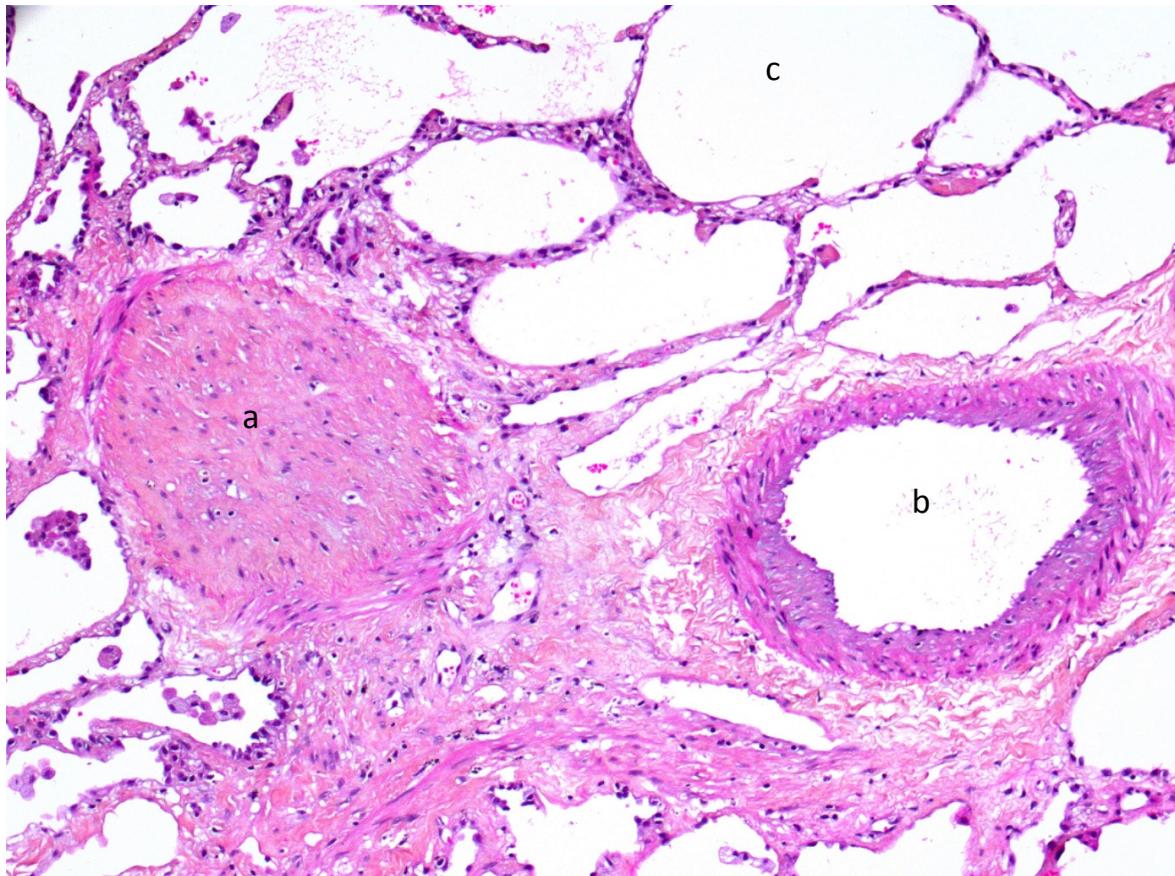
III.4 REJET CHRONIQUE

Le succès à long terme de la TP est limité par la dysfonction chronique du greffon (ou CLAD, *chronic lung allograft dysfunction*) se manifestant le plus souvent par la BO ou moins fréquemment par le syndrome restrictif d'allogreffe (ou RAS, *restrictive allograft syndrom*). Le rejet chronique est défini comme une dysfonction du greffon avec un déclin >20 % du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) durant plus de 3 semaines en absence de causes spécifiques (infection, rejet aigu persistant, sténose anastomotique, maladie pleurale, dysfonction du diaphragme etc.).

III.4.a Syndrome de bronchiolite oblitérante

La BO est caractérisée par une obstruction partielle ou complète de la lumière des bronchioles terminales (Stewart et al., 2007a) (Figure 14) et une baisse persistante du VEMS à moins de 80 % des valeurs post-opératoires du patient (Estenne et al., 2002). La lésion de BO peut être excentrique ou concentrique, associée à une fragmentation et une destruction du muscle lisse de la paroi des bronchioles. Elle est constituée de tissu fibreux et/ou d'infiltrats inflammatoires composés essentiellement de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages (Colombat et al., 2014; Stewart et al., 2007a). En raison de la distribution hétérogène des lésions de BO et de la petite taille des biopsies transbronchiques, celles-ci ne sont pas assez sensibles pour en assurer la détection (Chamberlain et al., 1994; Stewart et al., 2007a). Par conséquent, l'ISHLT a introduit le terme de « syndrome de bronchiolite oblitérante » (BOS), caractérisé par une dégradation irréversible du VEMS et/ou du débit expiratoire maximal médian (DEM_{25-75}) pour identifier les patients développant une BO (Cooper et al., 1993). Cependant la sensibilité et la spécificité du BOS pour le diagnostic de la BO sont inconnues. La définition et la classification de la BOS sont résumées dans le Tableau 7 (Estenne et al., 2002).

Figure 14 : Aspect histologique typique d'une BO



a : occlusion fibreuse de la lumière de la bronchiole ; b : lumière artériole ; c : espace alvéolaire

Tableau 7 : Définition et classification de la BOS (adapté de Meyer et al., 2014)

BOS 0	VEMS > 90% et $DEM_{25-75} > 75\%$ de la ligne de base*
BOS 0p	VEMS 81-90% et/ou $DEM_{25-75} \leq 75\%$ de la ligne de base
BOS 1	VEMS 66-80% de la ligne de base
BOS 2	VEMS 51-65% de la ligne de base
BOS 3	VEMS < 50% de la ligne de base

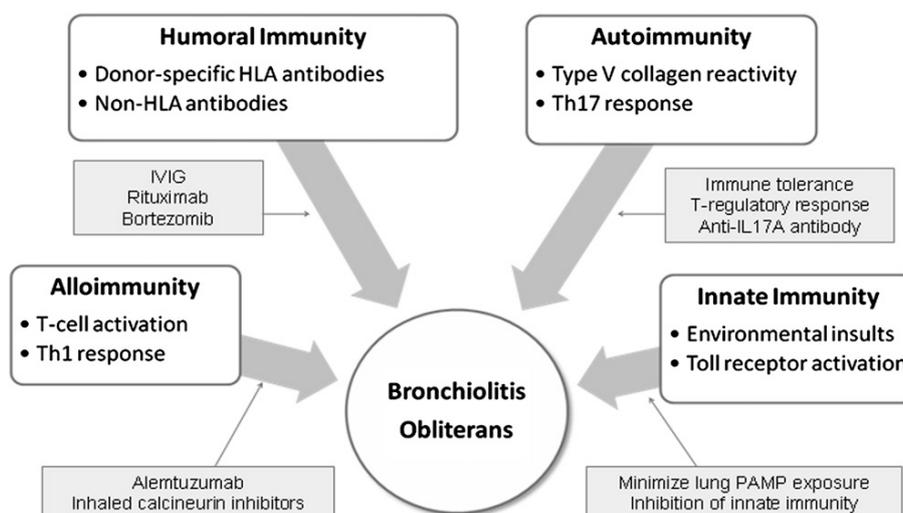
* : la ligne de base est la moyenne des deux meilleures valeurs postopératoires

Selon le registre de l'ISHLT, 49% des patients développent une BOS dans les 5 ans post-transplantation et 76% dans les 10 ans (Yusen et al., 2013). Une multitude de facteurs de risque de BOS ont été identifiés incluant le rejet aigu même de bas grade A1 et B1 (Glanville

et al., 2008; Sharples et al., 2002) (principal facteur de risque de la BOS), la mauvaise observance du traitement, la pneumopathie à CMV (Paraskeva et al., 2011), les infections bactériennes et fongiques, l'âge élevé du donneur, l'ischémie-reperfusion (Fiser et al., 2002), la présence de DSA, le mismatch HLA, le RGO (King et al., 2009), le RAH (Witt et al., 2013) et beaucoup d'autres facteurs. Les mécanismes cellulaires à l'origine du rejet chronique restent mal élucidés. Néanmoins, les études sur les facteurs de risque suggèrent une implication des agressions alloimmunes-dépendants (RAC, rejet humoral, autoimmunité, mismatch HLA) et indépendants (infection, ischémie, DPG) de l'épithélium respiratoire (Figure 15). Ce phénomène conduit à un afflux de cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, macrophages etc.) et à un remodelage tissulaire aberrant entraînant une obstruction des petites voies respiratoires par une fibrose typique de la BO (Sato and Keshavjee, 2008; Todd and Palmer, 2011). En outre, des observations récentes suggèrent que les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-1, le tumor necrosis factor (TNF)- α (Borthwick et al., 2013) et l'IL-17 (Burlingham et al., 2007; Vanaudenaerde et al., 2008) peuvent être des médiateurs clés de la lésion de la BO via l'induction d'une production d'IL-8 chémoattractante des polynucléaires neutrophiles et des monocytes.

La prise en charge d'une BOS consiste en général à augmenter l'immunosuppression mais aucun traitement n'a permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

Figure 15 : Différents mécanismes contribuant au développement de la BO (Todd and Palmer, 2011)



III.4.b Syndrome restrictif d'allogreffe

Le RAS est une autre forme récemment décrite de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire (Pakhale et al., 2005; Sato et al., 2011) (Toronto group 2010). Il est caractérisé par un déclin de la capacité vitale forcée (CVF) et de la capacité pulmonaire totale (CPT) avec une baisse de plus de 20 % du VEMS mais contrairement à la BOS, le rapport VEMS/CVF reste dans les valeurs normales (Sato et al., 2011; Verleden et al., 2014). Le mécanisme du RAS reste en grande partie inconnu. Sato et coll. (Sato et al., 2011) ont décrit que le RAS est associé à un infiltrat pulmonaire en tomodensitométrie haute résolution (TDM-HR) et à une fibrose prédominante dans la partie apicale du poumon. Sur le plan histologique, Ofek et coll. (Ofek et al., 2013) ont démontré que le RAS est corrélé à une fibroélastose pleuroparenchymale.

*Tableau 8 : Différents phénotypes de CLAD
(adapté de Verleden et al., 2014)*

Entité	BOS	RAS
Fonction pulmonaire	Obstructive (VEMS \leq 80% de la ligne de base)	Restrictive (CPT \leq 90% de la ligne de base et/ou VEMS/CVF normal ou augmenté, VEMS et/ou CVF \leq 80% de la ligne de base)
Imagerie thoracique (HRCT)	Généralement présence air trapping Absence ou infiltrat minime Avec ou sans bronchiectasie	Généralement présence d'infiltrat Avec ou sans bronchiectasie Avec ou sans air trapping
Histopathologie	BO (diagnostic difficile sur BTB)	Fibrose parenchymateuse/pleurale avec ou sans BO
Évolution clinique	Progressive mais peut être stabilisé. Les patients peuvent avoir une co-infection bactérienne chronique Peut évoluer vers le RAS	Tend à être progressive Peut commencer ou coïncider avec la BOS
Autres	Généralement répond mal aux traitements pharmacologiques	Corrélation avec la présence d'un DAD post-transplantation précoce

III.4.c Macrophages dans le rejet chronique

Une activation chronique des macrophages peut avoir un rôle profibrotique (Wynn, 2008). Dans les modèles murins de rejet chronique de greffe rénale, une infiltration macrophagique dans l'interstitium est caractéristique d'une sclérose progressive des glomérules. Et l'infiltration des glomérules et des vaisseaux est associée à une sclérose glomérulaire, une atrophie tubulaire, une fibrose interstitielle et une prolifération intimale vasculaire (Heemann et al., 1994). Dans un modèle murin d'allogreffe trachéale hétérotopique, la déplétion des macrophages prévient le développement d'une BO (Oyaizu et al., 2003).

Chez l'homme, une étude récente a montré une élévation des cytokines inflammatoires dont le TNF- α , l'IL1- β et l'IL-8 dans les lavages bronchiolo-alvéolaires des greffés pulmonaires prélevés autour de la date du diagnostic de la BOS. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que ces cytokines sont produites par les macrophages de phénotype M1 et favorisent la transition épithélio-mesenchymateuse des cellules épithéliales bronchiques ainsi le processus fibrotique (Borthwick et al., 2013).

TRAVAUX DE RECHERCHE

Le rejet en transplantation pulmonaire en particulier le rejet aigu humoral reste une entité mal diagnostiquée. Les outils diagnostiques disponibles actuellement sont encore controversés. Par conséquent le travail entrepris dans cette thèse s'inscrit dans un projet de recherche visant à identifier les marqueurs de rejet aigu.

Etude n°1 : Intérêt de l'immunomarquage C4d et des lésions histologiques (inflammation microvasculaire et agression alvéolaire aigu) dans le diagnostic de rejet aigu humoral

Etude n°2 : Etat de polarisation des macrophages alvéolaires au cours du rejet

MATERIELS ET METHODES

**PARTIE 1 : INTERET DES LESIONS
HISTOLOGIQUES ET DU MARQUAGE C4D
DANS LE DIAGNOSTIC DU REJET AIGU
HUMORAL**

I. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE

L'intérêt des lésions histologiques et de l'immunomarquage C4d dans le diagnostic de RAH a été évalué lors d'une étude rétrospective menée sur des patients transplantés à l'hôpital Foch à Suresnes et à l'hôpital Nord à Marseille. Sur la période de Janvier 2007 à Décembre 2014, 30 patients répondant aux critères de rejet aigu humoral, selon la définition du conseil de pathologie de l'ISHLT (Berry et al., 2013a) ont été identifiés (dysfonction du greffon, présence de DSA, dépôts de C4d et/ou lésions histologiques compatibles avec un RAH). Sur la même période, nous avons identifiés également 36 patients répondant aux critères de rejet infra/sub-clinique selon la classification de rejet humoral proposée par le NIH (Takemoto et al., 2004).

Afin d'évaluer la signification des lésions histologiques et du marquage C4d dans les RAH, nous avons constitué des groupes contrôles chez des patients transplantés pulmonaires et non transplantés. Au total, 263 biopsies transbronchiques ont ainsi été étudiés (Tableau 9).

Tableau 9 : Groupes contrôles

Patients non transplantés	n
Patients opérés pour un cancer du poumon	50
Patients avec une pneumopathie infectieuse	12
Patients transplantés pulmonaires	n
Patients stables à M3 n'ayant jamais eu de DSA	59
Patients avec une DPG sans infection ni DSA	12
Patients avec un RAC prouvé histologiquement	130

Nous avons recueilli les données permettant de caractériser les patients avant le diagnostic de RAH, au moment du diagnostic de RAH et au cours du suivi après traitement (Tableau 10).

Tableau 10 : Données cliniques recueillies pour chaque patient

Avant le diagnostic de RAH

Caractéristiques démographiques des patients : âge, sexe

Etiologie de la transplantation

Événements sensibilisants : grossesse, fausse couche, transfusion, transplantation antérieure

Caractéristiques du donneur : âge, sexe, cause de décès, tabagisme

Statut sérologique CMV donneur/receveur

Type de transplantation

Date de transplantation

Durée d'ischémie froide

Présence ou non d'une DPG de grade 3

Présence d'un RGO : clinique, pHmétrie, impédancemétrie

Nombre total de rejets aigus cellulaires prouvés histologiquement

Nombre d'épisodes infectieux respiratoires avec atteinte parenchymateuse et germes en cause

Meilleur VEMS post-transplantation

Protocole d'immunosuppression d'induction et d'entretien

A la date du diagnostic du RAH

Dysfonction du greffon

- Majoration de la dyspnée par rapport à l'état de base
- SDRA défini par des images bilatérales et un rapport PaO₂/FiO₂<300 (critères de Berlin)
- Recours à l'oxygénothérapie ou augmentation du débit d'O₂
- Recours à la ventilation mécanique
- EFR (VEMS)
- Données radiologiques : type d'opacités, uni ou bilatérales, diffuses ou non

Pathologies associées : infection, RAC, autres

Prise en charge thérapeutique du RAH

Suivi du RAH jusqu'à la date des dernières nouvelles du patient ou jusqu'à son décès

Amélioration clinique et radiologique

Survenue d'un nouvel épisode de RAH

Survenue d'un rejet chronique BOS et/ou RAS

Survie globale

Cause de décès

II. PARAMETRES SEROLOGIQUES ET HISTOLOGIQUES

L'ensemble des données suivantes a été recueilli : typage HLA A, B, DR, DQ du donneur et du receveur, nombre de mismatches et résultats des cross-matches pré-greffe sur lymphocytes T et B par microlymphocytotoxicité. Les anticorps anti-HLA ont été détectés à l'aide de la technique du Luminex Single Antigen (Luminex LABScreen® Single Antigen, One-Lambda Inc, CA, USA). Cette technique permet de préciser la nature du DSA mais également sa quantification exprimée en intensité moyenne de fluorescence (MFI). Dans notre étude, le seuil de positivité retenu pour la MFI était supérieur ou égal à 500. Un suivi sérologique a été réalisé pour observer l'évolution du titre des DSA après traitement du RAH.

L'étude histologique a été réalisée sur des BTB fixées en AFA (alcool, formol, acide acétique) ou en formol puis incluses en paraffine et colorées par l'Hématéine-Eosine-Safran (HES). Les lésions histologiques portant sur les modifications des cloisons (inflammation microvasculaire) et des espaces alvéolaires (lésion d'agression alvéolaire aigue) (Tableau 11) ont été évaluées de façon semi-quantitative (score : 0 à 3) (Tableau 12). Ont également été notées, la présence ou l'absence de thromboses vasculaires, de nécrose tissulaire et d'endothélite. Le RAC a été gradé selon les recommandations de l'ISHLT 2007, score A et B (Stewart et al., 2007b). L'analyse histologique a été faite en aveugle des données clinico-biologiques et un suivi histologique a été réalisé pour observer l'évolution des lésions après traitement du RAH.

Tableau 11 : Lésions histologiques analysées

Inflammation microvasculaire
- Polynucléaires neutrophiles dans les capillaires alvéolaires
- Cellules mononucléées dans les capillaires alvéolaires
Agression alvéolaire aigue du poumon
- Œdème des parois alvéolaires
- Hyperplasie des pneumocytes
- Polynucléaires neutrophiles dans les espaces alvéolaires
- Macrophages dans les espaces alvéolaires
- Fibrine dans les espaces alvéolaires
- Bourgeons conjonctifs dans les espaces alvéolaires
Thrombose vasculaire
Nécrose tissulaire
Artérite/endothélite
Score A et B pour grader le rejet aigu cellulaire

Tableau 12 : Score de l'inflammation microvasculaire

0	Normal (absence ou très rare neutrophiles/monocytes intracapillaires)
1	Neutrophiles/monocytes intracapillaires isolés et dispersés
2	Quelques neutrophiles/monocytes intracapillaires groupés
3	Infiltration diffuse (facilement identifiable)

III. IMMUNOMARQUAGE DE C4D : MISE AU POINT ET DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

L'immunomarquage avec l'anticorps anti-C4d fait partie intégrante du diagnostic de rejet aigu humoral en transplantation rénale, cardiaque et pancréatique. Cependant son rôle dans le diagnostic de RAH pulmonaire n'est pas encore clair. En effet les résultats des études sur la signification du dépôt de C4d dans le poumon sont souvent contradictoires. Cette contradiction est en partie due à une variabilité entre les études dans la technique et

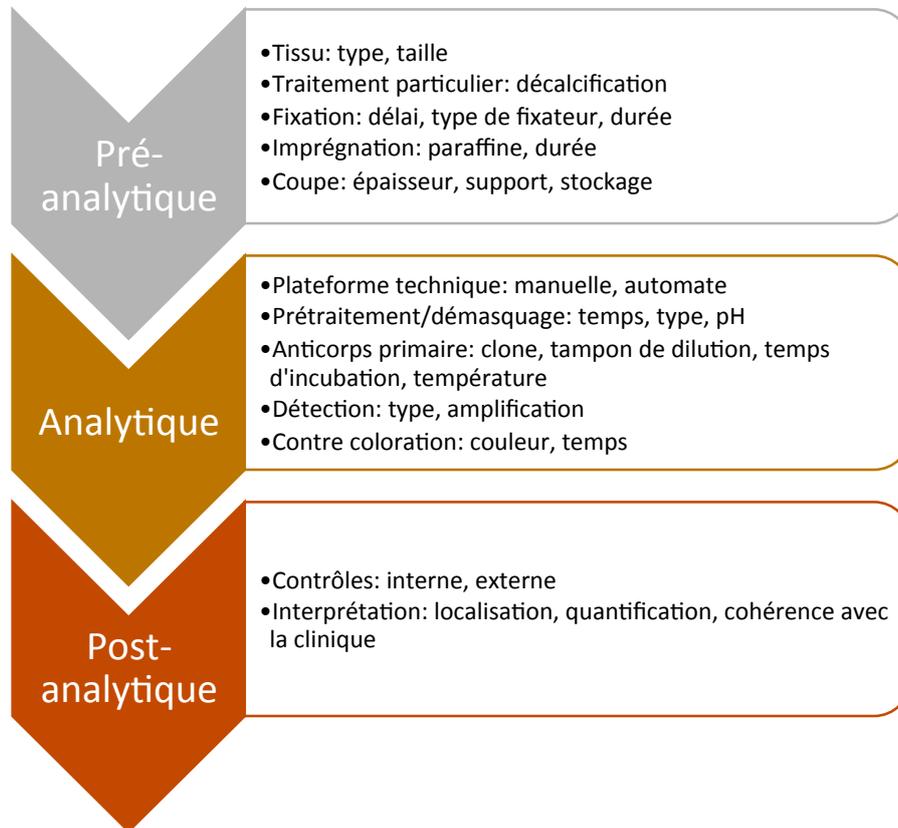
l'interprétation du marquage C4d avec peu d'études proposant un grading du marquage C4d basant sur la distribution et/ou l'intensité du marquage.

III.1 PRINCIPE DE L'IMMUNOMARQUAGE

L'immunomarquage est une méthode qui permet de localiser des antigènes ou protéines de nature et d'origines variées grâce à des anticorps dirigés spécifiquement contre ces antigènes. Les anticorps peuvent être révélés par une réaction colorimétrique enzymatique (immunochimie, IC) ou par une molécule fluorescente (immunofluorescence, IF). Il existe 2 méthodes de détection des anticorps : la méthode directe où les anticorps primaires sont directement couplés à un traceur ; et la méthode indirecte où l'anticorps primaire est révélé par un anticorps secondaire qui est couplé à un traceur. La réaction antigène-anticorps est spécifique ; cependant un antigène peut comporter des épitopes en commun avec un autre antigène, pouvant être à l'origine de ce qu'on appelle une réaction croisée. L'immunomarquage peut être réalisé sur des coupes de matériel congelé ou de matériel fixé et inclus en paraffine (immunohistologie) ou en cytologie (immunocytologie).

En immunohistochimie sur coupes en paraffine, les conditions techniques ne sont pas les mêmes et plus difficile que pour les coupes en congélation. En effet, les antigènes peuvent être masqués ou altérés par les fixateurs comme le formol d'où la nécessité d'une mise au point des techniques de démasquage des épitopes (ou restauration antigéniques). Toutefois, la difficulté n'est pas limitée à la fixation du prélèvement. Les paramètres qui influencent les résultats de l'immunomarquage sont nombreux et présents à toutes les phases de la prise en charge du prélèvement (Figure 16).

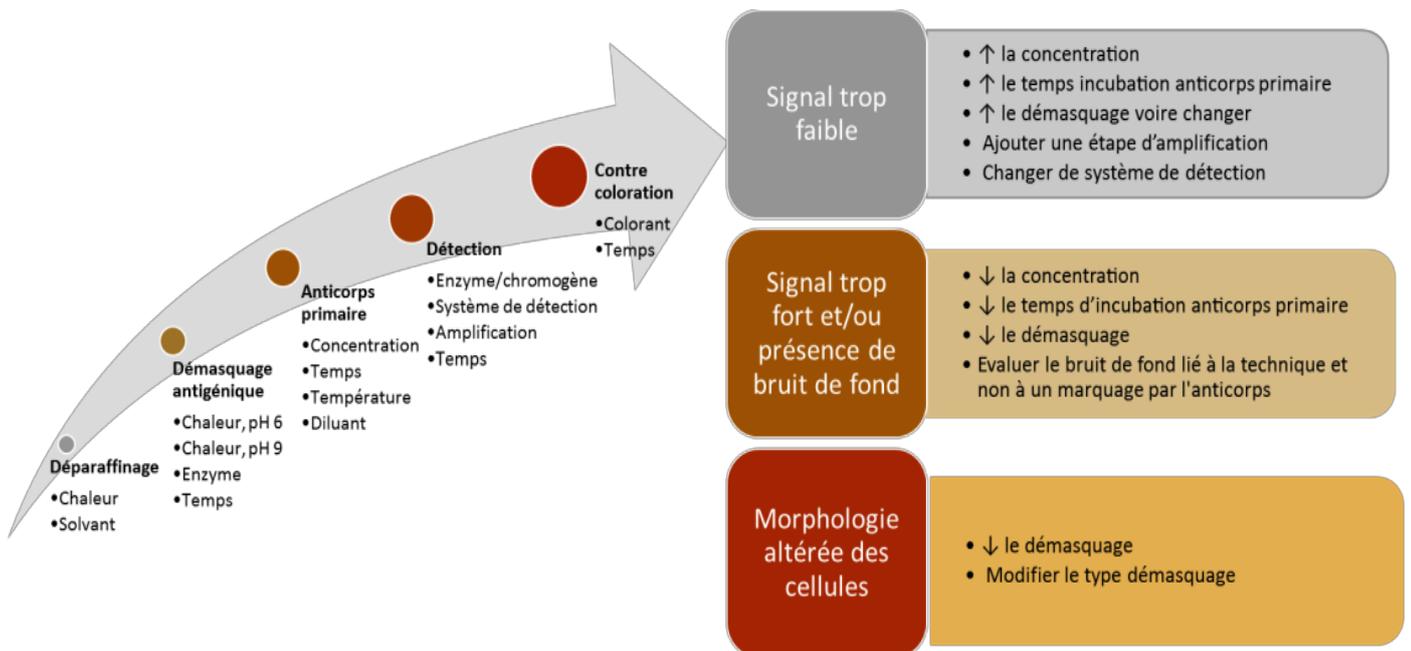
Figure 16 : Facteurs susceptibles d'influencer les résultats de l'immunomarquage



Les différentes étapes d'immunomarquage ainsi que les principaux paramètres à ajuster en fonction du signal obtenu sont résumés dans la Figure 17.

Depuis quelques années, les protocoles d'immunomarquage ont été largement simplifiés et standardisés, en particulier grâce à l'utilisation d'automates et à la commercialisation d'anticorps prêts à l'emploi. Cependant, le caractère relativement fermé de ces automates constitue parfois un frein. En effet les automates fermés offrent très peu de flexibilité sur les options de protocole de marquage et sur les réactifs utilisés.

Figure 17 : Paramètres techniques à modifier en fonction signal obtenu



III.2 MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'IMMUNOMARQUAGE C4D

Pour notre étude, nous avons utilisé différents témoins pour la mise au point. Dans un premier temps, nous avons eu recours à des biopsies rénales provenant de patients pour lesquels un diagnostic de RAH avait été porté. Avec le protocole établi pour ces biopsies, nous avons testé de manière prospective des biopsies pulmonaires pour lesquelles il existait une très forte suspicion de RAH et des prélèvements pulmonaires de contrôles présumés négatifs.

Initialement, nous avons travaillé avec l'anticorps anti-C4d polyclonal de Biomedica Groupe, avec une technique manuelle. Puis, avec l'arrivée de nouveaux anticorps sur le marché, nous avons basculé vers une technique totalement automatisée à l'aide d'un automate Ventana Benchmark XT. Les anticorps testés sont reportés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Les différents anticorps anti-C4d testés

1	Polyclonal, Biomedica Gruppe, distribué par Diasorin (BI-RC4D)
2	Monoclonal (A24-T), BD Biotech, distribué par Cliniscience (DB107)
3	Monoclonal (SP91), Cell Marque, distribué par MM France (404R)
4	Polyclonal, Cell Marque, distribué par MM France (404A)
5	Polyclonal, Zytomed, distribué par Diagomics (RBK039)

Le meilleur protocole de marquage retenu pour chaque anticorps est résumé dans le Tableau 14. Pour l'anticorps monoclonal SP91, nous n'avons pas pu obtenir un marquage correct (trop faible), il a été donc exclu de l'étude.

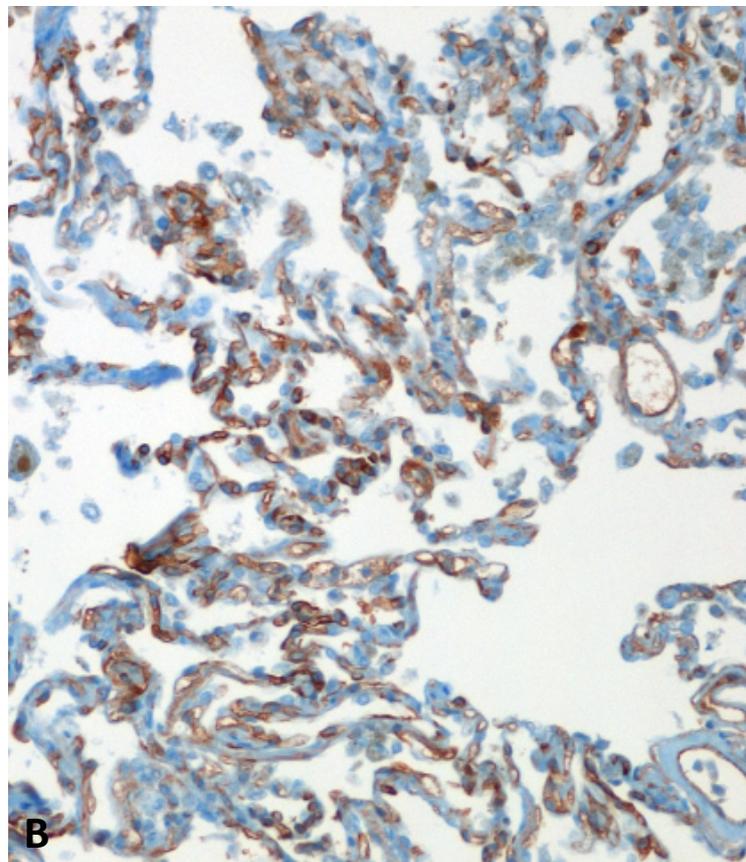
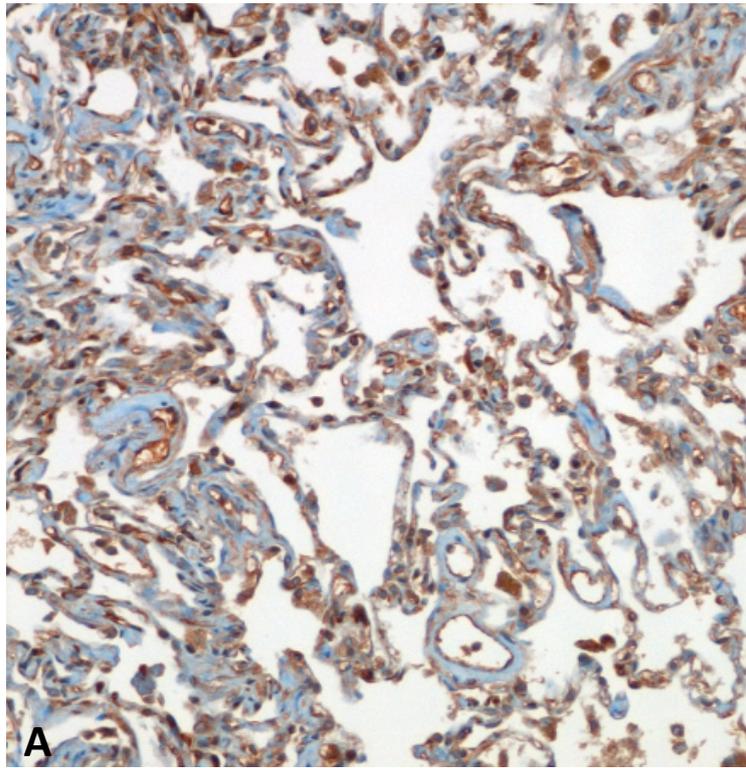
Tableau 14 : Protocole de marquage optimal pour chaque anticorps anti-C4d

	Anticorps anti-C4d	Dilution	Démasquage*	Incubation
1	Polyclonal, Biomedica Gruppe	1/10	30 minutes	1 nuit, 4°C
2	Monoclonal (A24-T), BD Biotech	1/100	30 minutes	1 h, 37°C
3	Polyclonal, Cell Marque	1/10	30 minutes	2 h, 37°C
4	Polyclonal, Zytomed	1/50	60 minutes	2 h, 37°C

* : démasquage antigénique avec le tampon CC1 (Ventana medical Systems, Inc, Tucson, Arizona) sauf pour l'anticorps anti-C4d polyclonal de Biomedica Gruppe : tampon citrate pH6 (Dako, Danemark). Le système de détection utilisé est celui utilisant le système

Les meilleurs marquages en termes de rapport signal/bruit de fond/morphologie tissulaire ont été obtenus avec l'anticorps de chez Cell Marque et Biomedica Gruppe (Figure 18). Nous avons testé de manière prospective l'expression du C4d sur une série de 43 BTB avec ces 2 derniers anticorps anti-C4d. Nous avons comparé l'extension du marquage (diffus, focal, minime ou absence de marquage) et l'intensité du bruit de fond (0 : absence de bruit de fond ; 1 : faible ; 2 : modéré ; 3 : bruit de fond trop importante, marquage ininterprétable).

Figure 18 : Exemple de marquage C4d avec l'anti-C4d de biomedica (A) et cell marque (B)

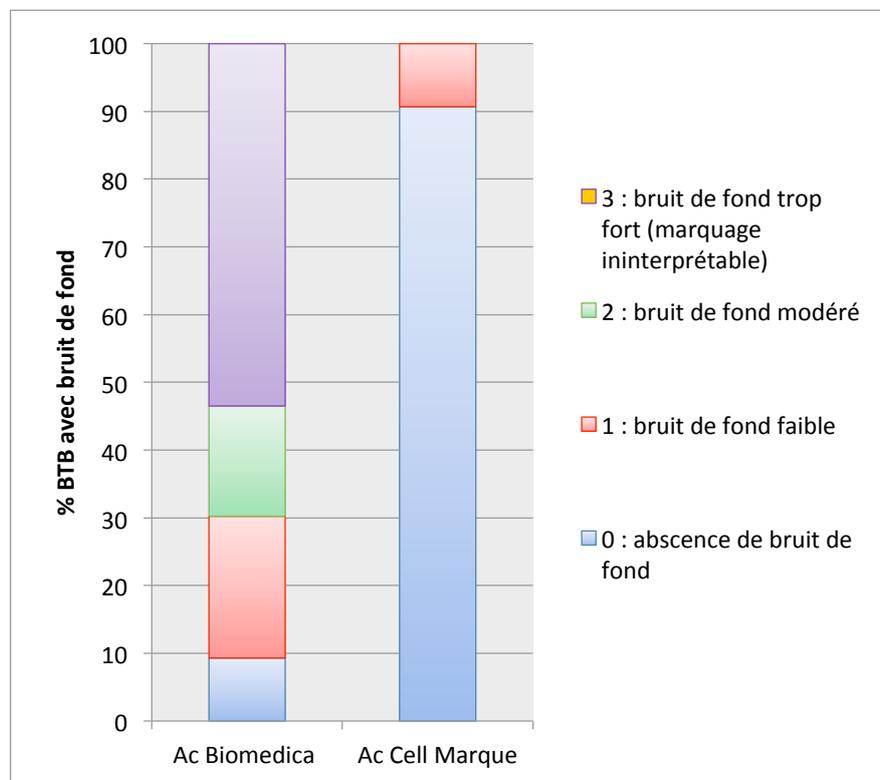


Quatre-vingt-onze pourcent (n=39) des prélèvements présentaient un bruit de fond avec l'anticorps anti-C4d de Biomedica Groupe. Parmi ces prélèvements, 59% (n=23) avait une intensité trop forte rendant le marquage ininterprétable. Avec l'anticorps anti-C4d de Cell Marque, nous n'avons observé 9% de prélèvements avec un bruit de fond d'intensité faible (Figure 19).

L'extension du marquage était cohérente entre les deux anticorps.

Pour la suite de notre étude, nous avons opté pour l'anticorps anti-C4d de Cell Marque.

Figure 19 : Intensité du bruit de fond, Anti-C4d de Biomedica Groupe versus Cell Marque



III.3 SCORING DE L'EXPRESSION DU C4D

Par analogie aux recommandations faites dans le domaine de la transplantation rénale et cardiaque, nous avons considéré qu'un marquage C4d était positif s'il existait un marquage linéaire et circonférentiel des capillaires alvéolaires (Racusen et al., 2003; Stewart et al., 2005). Pour valider cette définition, des prélèvements pulmonaires de contrôles présumés

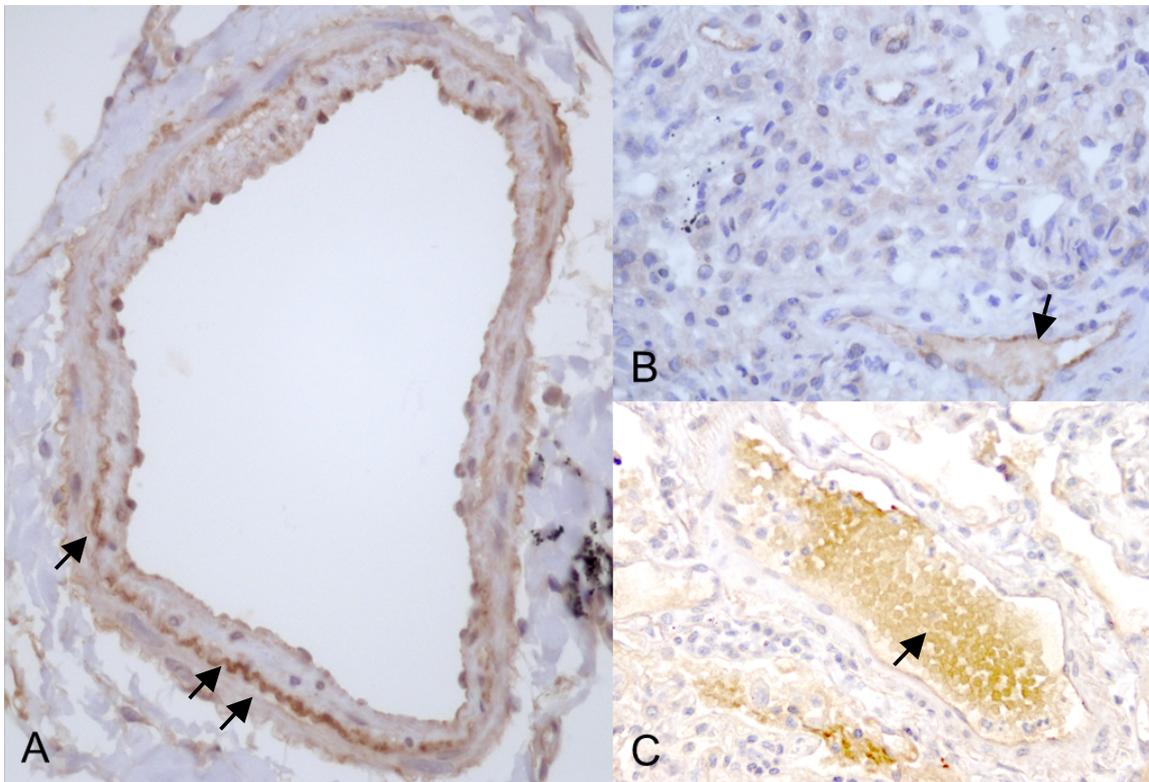
négatifs pour le marquage C4d ont été évalués (Tableau 15). L'expression du C4d a été observé dans plusieurs structures pulmonaires incluant l'endothélium vasculaire (artère, artériole, veine et veinule) et les fibres élastiques (artère, bronche, paroi alvéolaire) et le plasma des différents prélèvements contrôles (Tableau 15). Le marquage des capillaires alvéolaires a été observé dans 2 cas dans le groupe des patients transplantés stables à M3 n'ayant jamais eu de DSA et sans infection.

Tableau 15 : Marquage C4d des groupes contrôles

Structures marquées par le C4d	Patients TP stables à M3 n'ayant jamais eu de DSA (n=59)	Patients TP avec une DPG sans infection ni DSA (n=12)	Patients opérés pour un cancer du poumon (n=50)	Patients avec une pneumopathie infectieuse (n=12)
Capillaires alvéolaires, n (%)	2 (3,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Endothélium vasculaire, n (%)	41 (73,2)	11 (91,6)	43 (86,7)	6 (50)
Fibres élastiques, n (%)	27 (48,2)	6 (50)	32 (63,3)	11 (91,6)
Plasma, n (%)	8 (14,3)	1 (8,3)	37 (73,3)	4 (33,3)

Compte tenu de ces observations et des connaissances acquises pour d'autres organes transplantés, en particulier le rein et le cœur, nous avons validé la définition qu'un marquage C4d est positif s'il existait un marquage linéaire et circonférentiel des capillaires alvéolaires uniquement. Le marquage des autres structures (artériole, veinule, tissu élastique et plasma) est considéré comme un marquage non spécifique mais peut servir de témoin interne pour évaluer la qualité de la technique d'immunomarquage (Figure 20).

Figure 20 : Exemple de marquage C4d sur les fibres élastiques (A), l'endothélium vasculaire (B) et le plasma (C)



Le marquage a été classé selon son étendue en quatre sous-groupes :

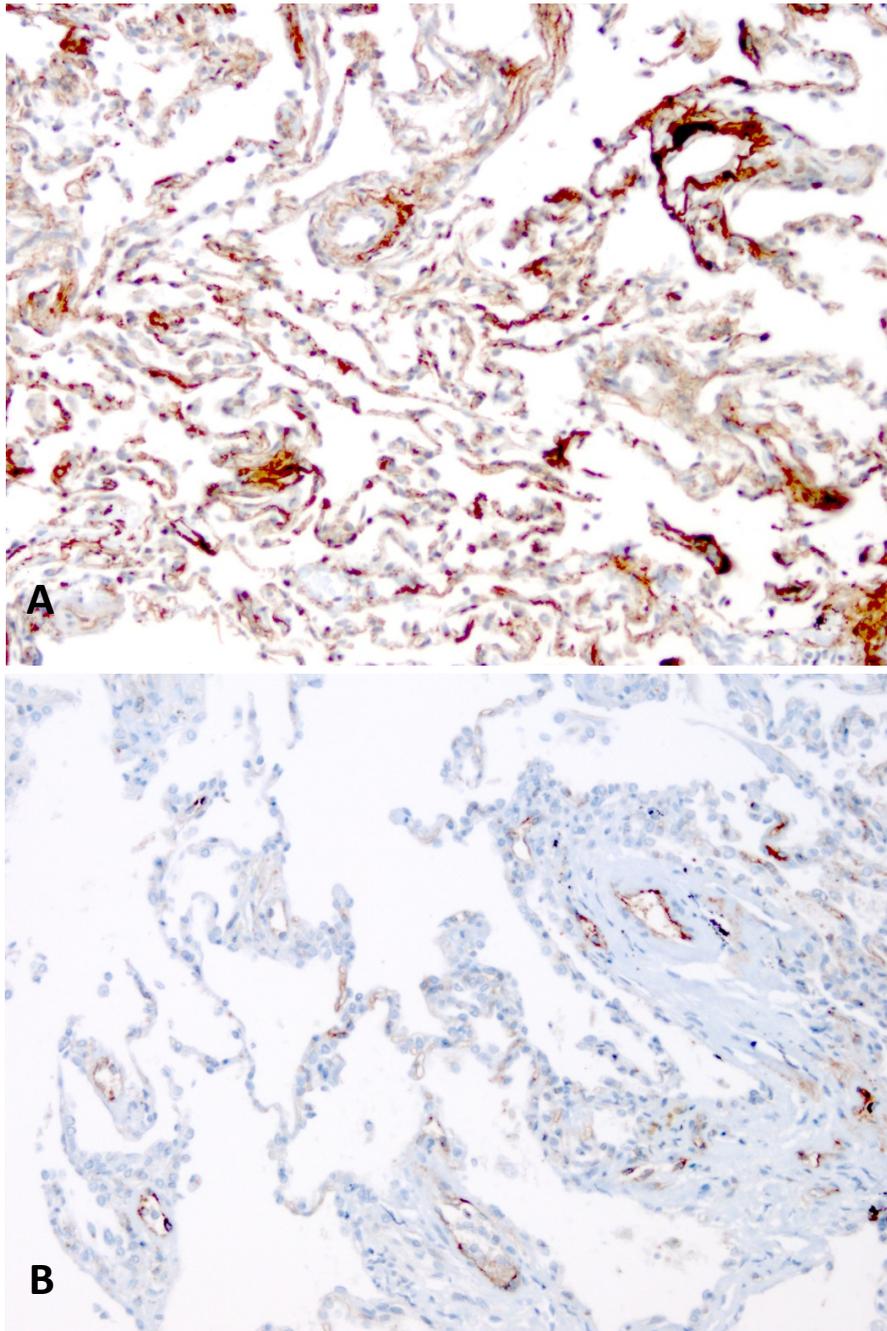
- 1) diffus : >50 % des capillaires alvéolaires marqués,
- 2) focal : 10-50 % des capillaires alvéolaires marqués,
- 3) minime : < 10 % des capillaires alvéolaires marqués,
- 4) négatif : absence de marquage des capillaires alvéolaires.

III.4 FIXATION DES BIOPSIES TRANSBRONCHIQUES

La fixation des prélèvements est une des paramètres importants qui peut influencer le résultat de l'immunomarquage. Dans la pratique quotidienne de nombreux centres de transplantation pulmonaire, la fixation des biopsies transbronchiques est réalisée en général dans le formol. Nous avons ainsi comparé le marquage avec l'anticorps anti-C4d (Cell marque) sur des tissus pulmonaires issus d'une lobectomie (prélevés à distance de la tumeur) fixés au formol et à l'AFA (alcool-formol-acide acétique) (n=3).

Le bruit de fond était accentué pour les prélèvements fixés en formol (Figure 21). Nous avons constaté la même observation sur une série 24 BTB fixés au formol adressées pour immunomarquage de C4d. Pour 3 de ces cas (12,5 %), le bruit de fond était trop important rendant le marquage ininterprétable.

Figure 21 : Exemple de marquage C4d, BTB fixée en formol (A) et en AFA (B)



PARTIE 2 : REJET AIGU ET POLARISATION DES MACROPHAGES

I. LAVAGES BRONCHIOLO-ALVEOLAIRES

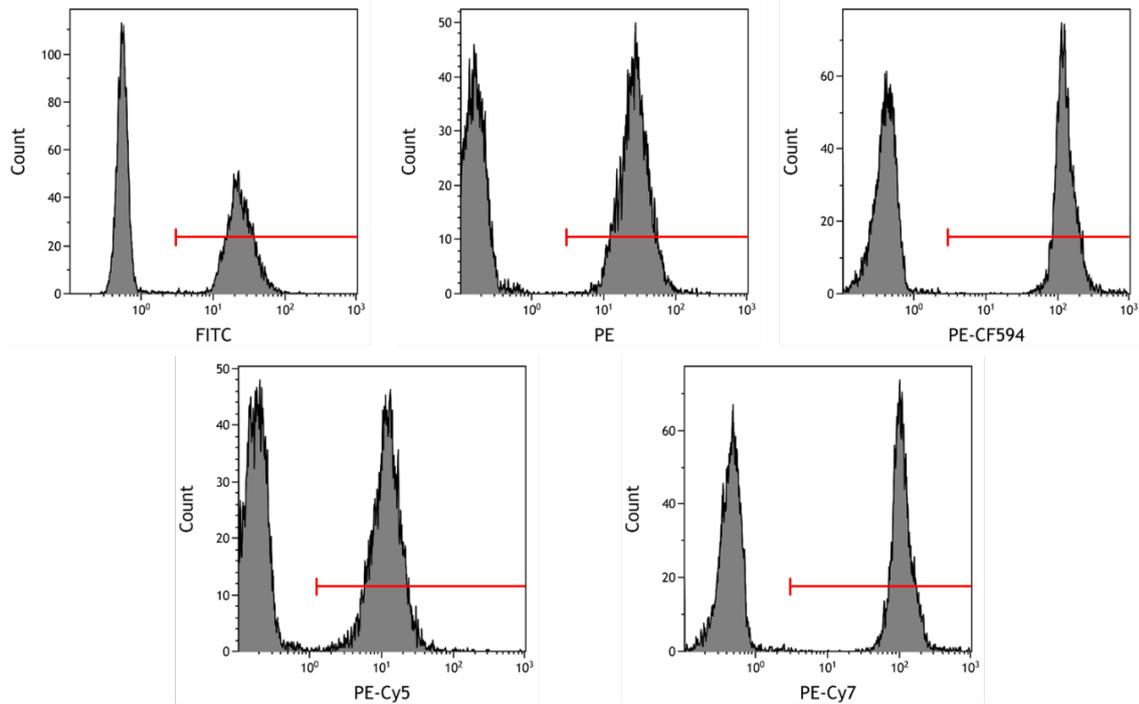
Les lavages bronchiolo-alvéolaires (LBA) ont été obtenus au cours d'une fibroscopie bronchique dans le cadre d'un suivi habituel des patients transplantés pulmonaire. Brièvement, sous anesthésie local à la lidocaïne, 50 à 100ml de liquide physiologique stérile sont instillés le plus souvent dans le lobe moyen ou le lobe inférieur droit puis recueillis par aspiration dans un tube stérile. Le lavage obtenu est reparti en priorité entre les laboratoires de microbiologie et d'anatomopathologie. Cinq mL de LBA est adressé au laboratoire UPRES. Un total de 94 LBA issus de 59 patients transplantés pulmonaires, entre octobre 2011 à décembre 2013 à l'hôpital Foch, a été analysé dans cette étude.

II. CYTOMETRIE EN FLUX : ASPECTS TECHNIQUES

La cytométrie en flux a été réalisée sur un Cytomics FC500 (Beckman Coulter) équipé de 2 lasers capables de détecter 5 fluorescences simultanément.

Le réglage des photomultiplicateurs (PMT) est nécessaire de façon à visualiser la population cellulaire négative dans la première décade de l'échelle logarithmique du fluorochrome concerné (Figure 22). Le réglage du voltage ou gain des PMT du cytomètre (réglage intensité de fluorescence) a été réalisé à l'aide d'un kit BD™ CompBead Plus Anti-Mouse Ig,κ beads (BD biosciences). Le kit est constitué de billes positives et négatives. La population positive fixe les anticorps conjugués et la population négative procure une fluorescence proche de l'auto-fluorescence de cellules non marquées. Cela permet au final de déterminer la limite entre les événements positifs (population positive) et négatifs (population négative) (Figure 22).

Figure 22 : Détermination de la limite entre les populations positive et négative



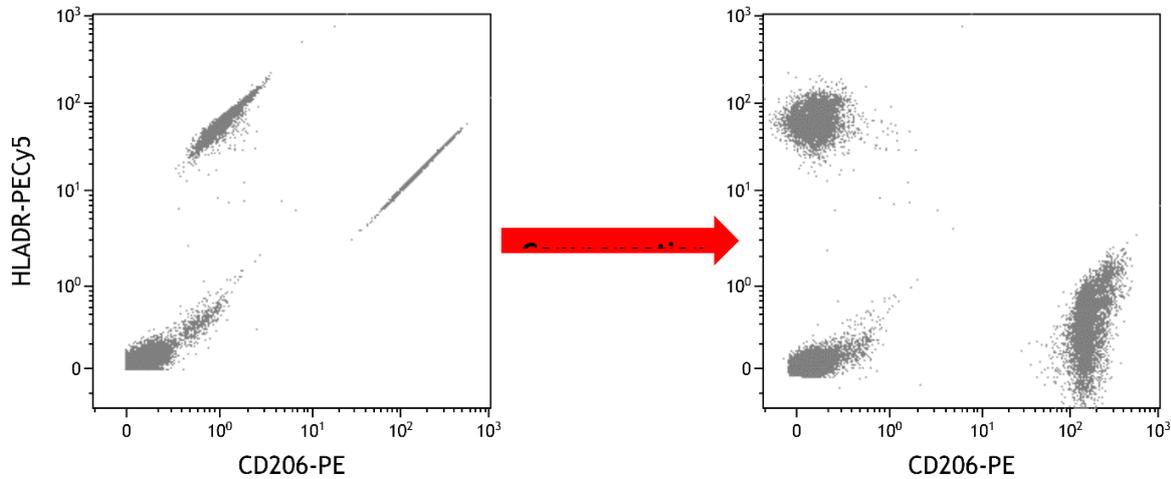
La compensation de fluorescence a été effectuée manuellement à l'aide du kit BD™ CompBead Plus Anti-Mouse Ig,κ beads (BD biosciences). Ce réglage est indispensable pour pouvoir faire plusieurs marquages dans un seul échantillon. Les spectres d'émission des différents fluorochromes se chevauchent, la compensation permet de soustraire le débordement spectral de fluorescence provenant d'un fluorochrome autre que celui spécifié pour un détecteur. La matrice de compensation correspondant aux fluorochromes que nous avons utilisés est indiquée dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Matrice de compensation

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
FL1		1.4	0.2	0.3	0.2
FL2	6.5		4.7	1.3	0.8
FL3	5.1	83.2		1.2	0.7
FL4	0.5	12	31		1.3
FL5	0	1.6	6.2	18.9	

FL1 : FITC ; FL2 : PE ; FL3 : PE-CF594 ; FL4 : PE-Cy5 ; FL5 : PE-Cy7

Figure 23 : Avant et après compensation.

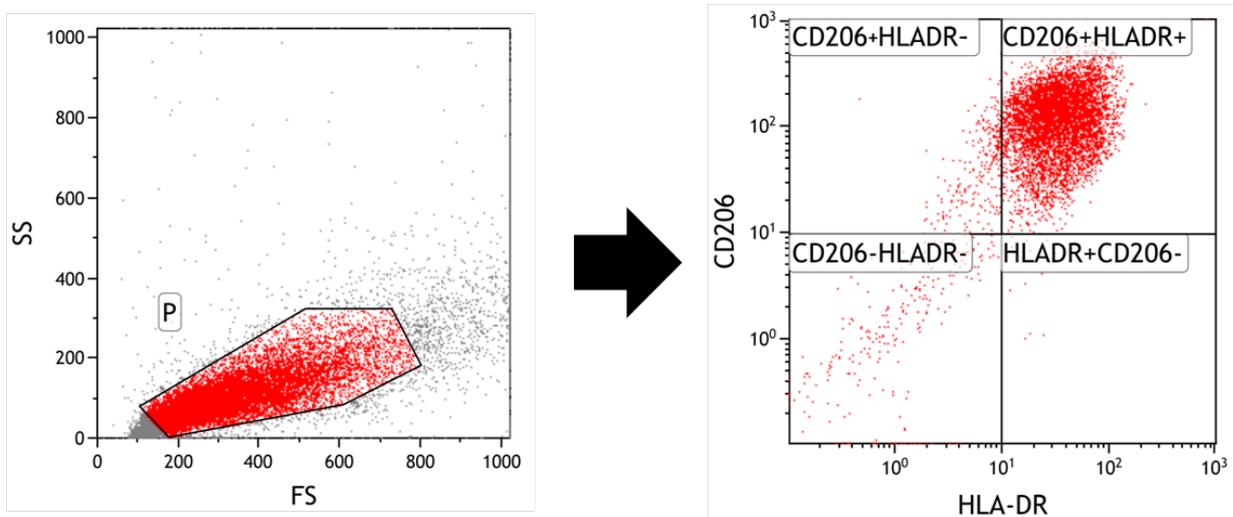


Différents anticorps couplés à un fluorochrome ont été utilisés pour le marquage : anti-CCR7-PE-CF594, anti-CD23-PE-Cy7, anti-CD38-PE-CF594, anti-CD68-FITC, anti-CD206-PE et anti-HLA-DR-PE-Cy5 (BD biosciences, San Diego, USA). Des contrôles isotopiques spécifiques à chaque anticorps ont été utilisés.

Le phénotypage des macrophages alvéolaires a été réalisé par cytométrie de flux en utilisant la technique d'immunofluorescence directe. Les macrophages ont été récupérés par centrifugation (1500 rpm, 5 minutes, 20°C), lavés, comptés et resuspendus à 10⁶ cellules/mL dans du tampon de marquage (PBS 1X avec 2% de SVF). Ils ont été ensuite incubés dans du tampon de blocage (PBS 1X avec 10% de sérum humain) pendant 30 minutes à 4°C pour saturer les sites de fixation aspécifique des anticorps. Pour le marquage membranaire (CCR7, CD23, CD38, CD206 et HLA-DR), les macrophages ont été incubés avec les anticorps correspondants pendant 30 min à 4°C et à l'obscurité. Pour le marquage intra-cytoplasmique (CD68), les macrophages ont été perméabilisés à l'aide d'un tampon de perméabilisation (tampon Perm/Wash, BD biosciences, San Diego, USA) avant d'être incubés avec l'anticorps correspondant pendant 30 min à 4°C et à l'obscurité. Un contrôle isotypique a été réalisé, en parallèle, pour chaque anticorps. Toutes les acquisitions ont été effectuées sur 10000 cellules. Les data ont été analysés avec le logiciel Flowjo v8.7. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de cellules positives.

Les cellules du LBA ont été examinées tout d'abord avec les paramètres FCS (Forward Scatter, taille) et SSC (Side Scatter, granularité) pour définir la population macrophagique et éliminer les débris cellulaires et les cellules agrégées. La population sélectionnée a été ensuite analysée en fonction de l'expression de HLADR et CD206 (Figure 24) pour définir la proportion des macrophages M1 (HLADR+CD206-), M2 (CD206+HLADR-), M1/M2 (CD206+HLADR+) et les macrophages non polarisés M0 (CD206-HLADR-).

Figure 24 : Identification de la population de macrophages dans le LBA



III. POLARISATION DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES

Afin de compléter l'analyse par cytométrie de flux des LBA, nous avons conduit une étude *in vitro* sur les macrophages isolés à partir de quelques LBA. Les macrophages alvéolaires récupérés par centrifugation (1500 rpm, 5 minutes, 20°C) à partir des LBA ont été suspendus dans du milieu RPMI complet supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF) pour une concentration de 10^6 cellules/mL. Pour faire adhérer les macrophages, 1 mL de la suspension cellulaire a été déposé dans chaque puit d'une plaque de culture 12 puits et incubé pendant 2h à 37°C en atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Les cellules non adhérentes ont été éliminées par trois lavages avec du RPMI et 1 mL de milieu RPMI complet supplémenté de 1% de SVF a été ajouté dans chaque puits. La différenciation des macrophages vers un phénotype M1 ou M2 a été induite par incubation avec le LPS (1µg /mL) ou l'IL-4 (10ng /mL)

pendant 24h. Les surnageants ont été récupérés, centrifugés, aliquotés et conservés à -20°C pour dosage par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sandwich des cytokines M1/M2. Pour l'immunophénotypage par cytométrie de flux, les macrophages adhérents au fond du puits ont été récupérés dans 1 mL de tampon de marquage (PBS 1X avec 2% de SVF) par grattage. Pour l'extraction des ARN, les macrophages ont été lysés et récupérés dans 1 mL de TRIzol.

Les cytokines mesurées par ELISA (kits Duoset, R&D Systems Europe, Lille, France) sont : le TNF- α , MIP1- α , IL-8, CCL13, CCL17 et CCL22. Les anticorps de capture ont été incubés dans une plaque ELISA 96 puits pendant une nuit à température ambiante puis les puits ont été saturés par une solution de BSA 1% dans du PBS 1X. Les échantillons à doser (purs ou dilués dans du PBS-BSA 1% à des concentrations préalablement définies) ou les standards ont été déposés dans les puits. Après 2h d'incubation à température ambiante, l'anticorps de détection biotinylé a été ajouté pendant 2h puis mis en présence de streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort (ou HRP, Horseradish peroxidase) pendant 20 minutes. La révélation des complexes formés a été réalisée avec le substrat H₂O₂/tetrabenzylbenzidine (formation de produits colorés) et arrêtée par ajout d'acide sulfurique. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 450nm à l'aide d'un lecteur de plaque 96 puits (MRX II, Dynex Technologies, Saint Cloud, France). Les calculs de conversion de la densité optique en concentration ont été effectués avec le logiciel GraphPad Prism® en construisant une courbe de régression à partir des concentrations connues pour le standard.

Pour l'analyse des transcrits induits par le LPS et l'IL-4, les macrophages ont été lysés avec 1 mL de TRIzol. L'isolation des ARNs a été ensuite réalisée en ajoutant 200 μL de chloroforme permettant après centrifugation à 15000 rpm pendant 15 minutes d'obtenir deux phases : une phase aqueuse (ou phase supérieur) contenant les ARNs et une phase organique (ou phase inférieur) contenant les ADN et les protéines. Les ARNs ont été précipités par l'isopropanol (500 μL) à partir de la phase aqueuse. Après centrifugation, le culot d'ARNs a été lavé avec 1 mL d'éthanol puis séché, resuspendu dans 20 μL d'eau et conservé à -80°C jusqu'à analyse. La quantité d'ARNs extraite a été estimée par spectrophotométrie à 260 nm (Spectrophotomètre Biowave DNA ; Biochrom, Cambridge, Angleterre).

La qualité des ARNs a été évaluée par micro-électrophorèse capillaire (Experion, BIORAD). Cette technique permet d'obtenir un électrophorégramme sur lequel on peut visualiser 2 pics correspondants aux ARNs ribosomaux 18S et 28S. La qualité des ARN a été appréciée selon le coefficient RQI (RNA Quality Indicator), basé sur l'aspect des pics des ARN ribosomaux 18S et 28S (échelle de 1 à 10), et la valeur du rapport des intensités des pics 28S/18S. Tous les ARN préparés au cours de ce projet avaient un RQI supérieur à 9.

Les ADNc complémentaires (ADNc) ont été synthétisés par transcription inverse (ou RT, Reverse transcriptase) des ARNs extraits. La transcription inverse a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN à l'aide du kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Life Technologies, Saint Aubin, France). 10µL de tampon réactionnel et 2 µL d'enzymes ont été ajoutés au 1µL d'ARN puis le volume total a été ajusté à 20 µL avec de l'eau. Le mélange réactionnel a été successivement incubé pendant 10 minutes à 25°C (étape d'hybridation), 30 minutes à 50° C (étape d'élongation) et 5 minutes à 85°C (étape de dénaturation). Les ARNs restants ont été dégradés avec 10 µL de RNase H. Les ADNc obtenus sont stockés à -80°C.

L'expression des gènes d'intérêts a été quantifiée par PCR quantitative en temps réel à haut débit, grâce à l'utilisation de technologie TaqMan. La méthode TaqMan est basée sur le principe des sondes TaqMan qui sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome et portent un quencher à leur extrémité 3'. A la fin de chaque cycle d'élongation, la Taq polymérase hydrolyse la sonde provoquant la séparation du fluorochrome et du quencher ainsi une émission d'un signal fluorescent qu'on peut quantifier. La réaction en chaîne de la polymérase (ou PCR, Polymerase Chain Reaction) a été réalisée dans un volume de 20 µl, contenant 4 µL d'ADNc à 5 ng/µL, 1 µL d'amorce avec sonde TaqMan, 10 µL de TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) et 5 µL d'eau, à l'aide un thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems). La réaction d'amplification a été précédée d'une étape d'incubation durant 2 minutes à 50°C (étape de décontamination) puis poursuivie par une étape de 10 minutes à 95°C (dénaturation et activation de la Taq polymérase) et 40 cycles à deux temps : 15 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C (dénaturation et hybridation-élongation). Le gène de référence HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransférase) a été utilisé pour normaliser les données quantitatives. Les résultats d'expression ont été mesurés de façon relative par rapport au gène de référence. Ainsi, les données quantitatives ont été

exprimées en ΔCt , la différence entre le Ct (Cycle threshold) du gène cible et le Ct du gène de référence (Ct_{gène cible} - Ct_{HPRT}).

IV. ANALYSE STATISTIQUE

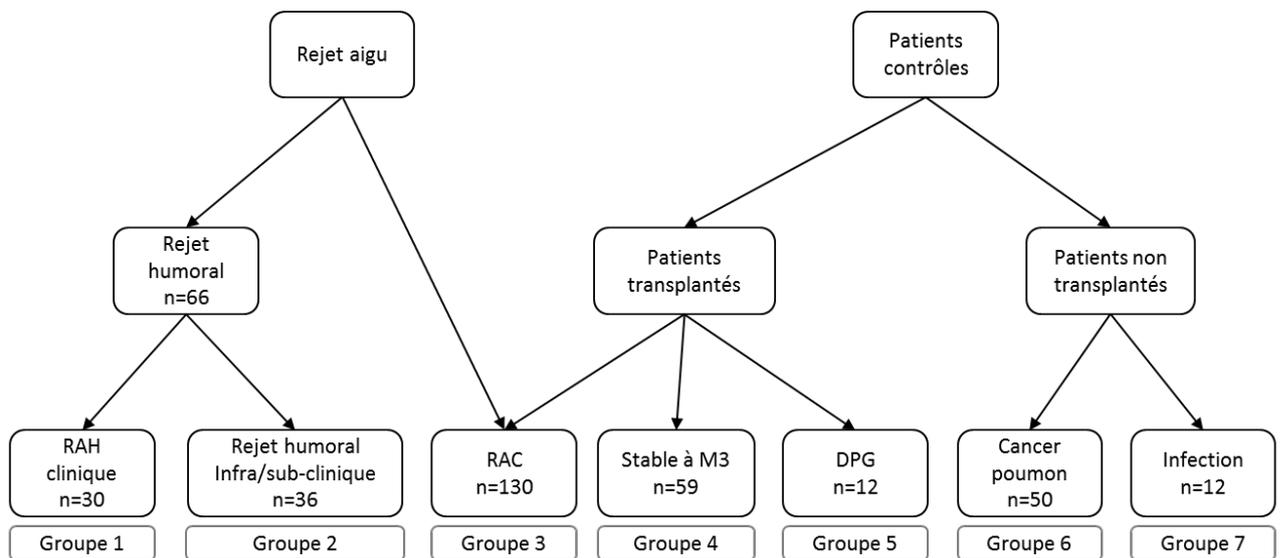
L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism® en utilisant une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un post-test de Bonferroni pour les comparaisons des différents groupes deux à deux pour les variables quantitatives. Pour les variables qualitatives, les groupes étaient comparés à l'aide d'un Chi-2 ou d'un test de Fisher exact. Une différence a été considérée comme statistiquement significative quand la probabilité p était inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) avec prise en compte de l'inflation du risque alpha lié aux comparaisons multiples. Les courbes de survie ont été réalisées selon le modèle de Kaplan-Meier.

RESULTATS

**PARTIE 1 : INTERET DES LESIONS
HISTOLOGIQUES ET DU MARQUAGE C4D
DANS LE DIAGNOSTIC DU REJET AIGU
HUMORAL**

Pour évaluer l'intérêt des lésions histologiques et du marquage C4d dans le diagnostic du rejet aigu humoral, des groupes de patients transplantés et non transplantés ont été étudiés (Figure 25).

Figure 25 : Organigramme des groupes de patients étudiés



Groupe 1 : Patients avec un rejet aigu humoral clinique.

Groupe 2 : Patients avec un rejet humoral infra/sub-clinique (Patients avec un marquage C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH).

Groupe 3 : Patients avec un rejet aigu cellulaire diagnostiqué histologiquement (rejet de grade A1 à A3).

Groupe 4 : Patients transplantés stables n'ayant jamais eu de DSA, sans infection et sans rejet (Biopsies à M3).

Groupe 5 : Patients transplantés avec une dysfonction primaire du greffon de grade 3, sans infection, sans signe histologique de rejet aigu cellulaire et sans DSA (Biopsies à J7).

Groupe 6 : Patients opérés pour un cancer du poumon, prélèvements à distance de la tumeur.

Groupe 7 : Patients avec une pneumopathie infectieuse. Infection à pneumocystis (n=8); infection à CMV (n=3); infection à aspergillus (n=1).

I. REJET HUMORAL

I.1 REJET AIGU HUMORAL

I.1.a Description de la population

Caractéristiques de la greffe

Les caractéristiques de la greffe des 30 patients transplantés pulmonaires avec diagnostic de RAH sont consignées dans le Tableau 17 (page 87). L'âge moyen des patients au moment de la transplantation était de 39 ± 14 ans. Soixante pourcent étaient des femmes et 40 % des hommes. La transplantation était bi pulmonaire pour 86 % des patients. Les trois principales indications de TP étaient la mucoviscidose (40 %), la fibrose pulmonaire (26,7 %) et l'emphysème (16,7 %). Huit patients avaient un ou plusieurs évènements immunisants dans leur passé : grossesse (n=7), TP (n=1) ou encore d'un antécédent transfusionnel (n=1). Deux patients étaient transplantés en super-urgence et 3 patients recevaient un greffon reconditionné ex-vivo. Le temps d'ischémie froide était en moyenne de 389 minutes. Le crossmatch à J0 n'avait pas été réalisé chez 6 patients et était négatif pour les autres patients. Treize patients avaient des anticorps anti-HLA avant la transplantation dirigés contre le donneur. Parmi eux, 7 ont bénéficié d'une « désensibilisation » par échange plasmatique avant la TP. Dix patients avaient une DPG de grade 3.

Le protocole d'immunosuppression est résumé dans le Tableau 18 (page 88). Cinquante pourcent des patients recevaient un traitement d'induction déplétant par sérum anti-lymphocytaire ou non déplétant par anti-IL2. L'immunosuppression de maintenance consistait ensuite en une trithérapie associant un corticoïde, un inhibiteur de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) et un antimétabolite (mycophénolate mofétil, MMF ou azathioprine).

Tableau 17 : Caractéristiques des patients

	Patients RAH (n=30)	Patients C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH (n=36)	p
Femme, n (%)	18 (60)	22 (61,1)	1
Age à la transplantation (ans), moyenne ± SEM	38,5 ± 14,2	36,2 ± 13	0,6708
Maladies initiales			
Mucoviscidose, n (%)	12,0 (40)	21 (58,3)	0,2162
Fibrose, n (%)	8,0 (26,7)	3 (8,3)	0,0941
BPCO, n (%)	5,0 (16,7)	7 (19,4)	1
Autres, n (%)	5,0 (16,7)	5 (13,9)	1
Type de transplantation			
Bipulmonaire, n (%)	26 (86,7)	33 (91,7)	0,6929
Monopulmonaire, n (%)	4 (13,3)	2 (2,6)	0,3989
Cœur-poumon, n (%)	0 (0)	1 (2,8)	1
TP en super urgence, n (%)	2,0 (6,7)	7 (19,4)	0,1659
Temps d'ischémie froide (min), médiane [IQ 25-75]	357 [313 - 461]	463 [304 - 435]	0,9692
Procédure ex vivo, n (%)	3,0 (10)	5 (13,9)	0,7189
ECMO pré-OP, n (%)	0 (0)	5 (13,9)	0,0581
ECMO per-OP, n (%)	14,0 (46,7)	17 (47,2)	1
ECMO post-OP, n (%)	7,0 (23,3)	7 (19,4)	0,7679
Statut CMV			
D+R+, n (%)	12,0 (40)	10 (27,8)	0,31
D+R-, n (%)	4,0 (13,3)	10 (27,8)	0,2278
D-R+, n (%)	3,0 (10)	6 (16,7)	0,4941
D-R-, n (%)	11,0 (36,7)	10 (27,8)	0,5963
Evénements sensibilisants, n (%)	8,0 (26,7)	11 (30,6)	0,7898
DSA pré-greffe, n (%)	13,0 (43,3)	14 (38,9)	0,8035
Désensibilisation préopératoire par EP, n (%)	7,0 (23,3)	10 (27,8)	0,7810
Crossmatch à J0			
Négatif, n (%)	24,0 (80)	26 (72,2)	0,5689
Positif, n (%)	0,0 (0)	0 (0)	
Non évalué, n (%)	6,0 (20)	10 (27,8)	
DPG grade 3, n (%)	10,0 (33,3)	15 (41,7)	0,6118
Nombre de RAC pendant le suivi, moyenne ± SEM	1,5 ± 1,5	1,5 ± 1,4	0,8266
Nombre d'épisode de pneumopathie infectieuse pendant le suivi, moyenne ± SEM	1,2 ± 1,4	1,1 ± 1,2	0,9193
RGO, n (%)	16,0 (53,3)	26 (72,2)	0,1305

Tableau 18 : Protocole d'immunosuppression

	Patients RAH (n = 30)	Patients C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH (n = 36)	p
Traitement immunosuppresseur d'induction			
Sérum anti-lymphocytaire, n (%)	12 (40)	10 (27,8)	0,31
Anti-récepteurs à l'IL-2, n (%)	3 (10)	6 (16,7)	0,4941
Pas de traitement d'induction, n (%)	15 (50)	20 (55,6)	0,8048
Traitement immunosuppresseur d'entretien			
Corticoïde, Tacrolimus, MFF ; n (%)	19 (63,3)	25 (69,4)	0,6121
Corticoïde, Ciclosporine, Azathioprine ; n (%)	6 (20)	7 (19,4)	1
Corticoïde, Ciclosporine puis Tacrolimus, MFF* ; n (%)	2 (6,7)	0 (0)	0,2028
Corticoïde, Ciclosporine, MFF ; n (%)	3 (10)	3 (8,3)	1
Corticoïde, MFF ; n (%)	0 (0)	1 (2,8)	1
Observance des traitements			
Mauvaise observance, n (%)	2 (6,6)	2 (5,6)	1

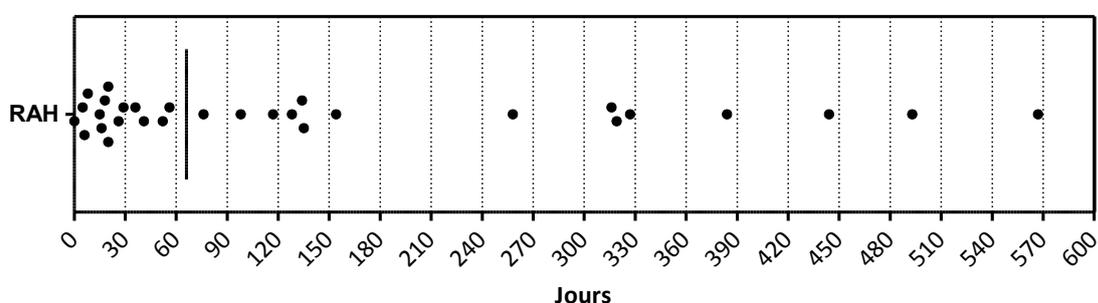
MMF : mycophénolate mofetil

* : ciclosporine en intraveineuse puis relais par le tacrolimus

Caractéristiques cliniques du rejet aigu humoral

Le délai médian de survenue du RAH était de 66 jours [20 - 232 jours] après la TP (Figure 26). Soixante-treize pourcent des RAH survenaient dans les 6 premiers mois après la TP. L'ensemble des patients avait une dysfonction clinique du greffon allant d'une baisse du VEMS avec ou sans dyspnée à un SDRA (23,3%). Quarante-vingt-dix-sept pourcent présentaient des images radiologiques anormales (Tableau 19, page 90). Quarante-trois pourcent avaient une pathologie concomitante au RAH : pneumopathie infectieuse, RAC ou les deux à la fois.

Figure 26 : Délai de survenue du RAH



Les caractéristiques des DSA détectés chez la totalité des patients avec RAH sont résumées dans le Tableau 20 (page 91). Cinq patients (16.7 %) avaient un ou plusieurs DSA de classe 1, 8 (26.7 %) de classe 2 et 17 (56.7 %) de classes 1 et 2. Les DSA étaient soit préformés, de novo ou les deux, les DSA de novo étant plus fréquents (63.3 %). La médiane du titre du DSA immunodominant (MFI) était de 7241 [2395 - 9492]. Les DSA de classe 2 étaient plus fréquents et détectés avec un titre plus élevé.

Pour le traitement du RAH, la majorité des patients recevaient une trithérapie ou quadrithérapie associant corticoïdes, échanges plasmatiques (EP), immunoglobulines intraveineuses (IgIV) et rituximab (Tableau 21, page 92). Les patients étaient traités en moyenne $11 \pm 19,4$ jours après la date du diagnostic du RAH pour une durée moyenne de $21 \pm 34,5$ jours.

Tableau 19 : Caractéristiques cliniques des patients au moment du diagnostic de RAH

Variables	N (%) ou Moyenne ± SEM
Délai de survenu du RAH (mois)	4,8 ± 5,5
Symptômes cliniques	
- SDRA	7 (23,3)
- Dyspnée	23 (76,7)
Apparition/majoration dyspnée	22 (73,3)
Dyspnée déjà présente	1 (3,3)
Assistance respiratoire	
- Recours à l'oxygénothérapie ou augmentation débit	4 (13,3)
- Ventilation mécanique*	10 (33,3)
Ventilation invasive	6 (60)
Ventilation non invasive	3 (30)
Ventilation non invasive puis invasive	1 (10)
Exploration fonctionnelle respiratoire	
- Meilleur VEMS post TP pré- RAH (% théorique)	72,3 ± 17,1
-Baisse du VEMS**	18 (60)
- VEMS (% théorique)	53 ± 17,3
Pathologies associée	13 (43,3)
- Pneumopathie infectieuse	3 (23,1)
- Pneumopathie infectieuse et RAC	1 (7,7)
- RAC	9 (69,2)
Imagerie	
- Techniques d'imagerie	
Radiographie	8 (26,7)
TDM	2 (6,7)
Radiographie et TDM	20 (66,7)
- Imagerie thoracique anormale	28 (93,3)
Image alvéolaire	16 (57,1)
Image alvéolo-interstitielle	7 (25)
Image interstitielle	5 (17,9)
- Etendue de l'image	
Bilatérale	14 (50)
Diffuse	8 (28,6)
Unilatérale	6 (21,4)
- Epanchement pleural	7 (23,3)

* 2 patients déjà sous ventilation mécanique avant le diagnostic de RAH

**Pas d'EFR pour les 12 autres patients avant le RAH

Tableau 20 : Caractéristiques des DSA

Caractéristiques des DSA	Patients RAH (n =30)	Patients C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH, DSA+ (n = 18)	p
DSA préformé, n (%)	2 (6,7)	5 (27,8)	0,0926
DSA de novo, n (%)	19 (63,3)	9 (50)	0,5554
DSA préformé et de novo, n (%)	9 (30)	4 (22,2)	0,7408
Classe des DSA			
Classe I, n (%)	5 (16,7)	4 (22,2)	0,7199
Classe I et II, n (%)	17 (56,7)	7 (38,9)	0,2436
Classe II, n (%)	8 (26,7)	7 (38,9)	0,3515
MFI du DSA immunodominant, médiane [IQ 25-75]	7241 [2395 - 9492]	1835 [705 - 4073]	0,0007

Tableau 21 : Prise en charge thérapeutique des patients avec un rejet aigu humoral

Thérapeutiques utilisées	N (%) ou Moyenne ± SEM
Corticoïdes	22 (73,3)
Immunoglobuline intraveineuse (IgIV)	30 (100)
Rituximab	26 (86,7)
Eculizumab	2 (6,7)
Echange plasmatique (EP)	22 (73,3)
Combinaisons thérapeutiques	
- Corticoïde, EP, IgIV, Rituximab	16 (53,3)
- IgIV, Rituximab	4 (13,3)
- Corticoïde, EP, IgIV	2 (6,7)
- Corticoïde, EP, IgIV, Rituximab, Eculizumab	2 (6,7)
- Corticoïde, IgIV, Rituximab	2 (6,7)
- EP, IgIV, Rituximab	2 (6,7)
- IgIV	2 (6,7)
Délai entre le diagnostic du RAH et traitement (jours)	11,4 ± 19,4
Durée du traitement (jours)	21,1 ± 34,5

Evolution des patients après l'épisode du rejet aigu humoral

Nous avons suivi l'évolution de l'ensemble des patients exceptés deux : décès précoce pour un patient et suivi <3mois pour l'autre. Le délai moyen de suivi était de $34 \pm 25,7$ mois. Une amélioration nette du VEMS était observée chez 18 patients (62,1 %) après le traitement et un retour à la normale des examens radiologiques était observé dans 66,7 % des cas. Les DSA disparaissaient chez 14 patients (50 %).

Sur le long terme, 61 % des patients RAH (n=17) développaient une dysfonction chronique du greffon en moyenne 489 ± 64 jours (16 mois) après la TP : 9 (53 %) sous forme d'une BOS, 2 (12 %) d'un RAS et 6 (35 %) d'un phénotype mixte associant BOS et RAS. Deux patients (6,7 %) étaient retransplantés pour BOS à moins d'un an de la date de diagnostic du RAH (187 et 763 jours de la date de TP). Onze patients (39 %) décédaient pendant la période d'étude dont 9 durant la première année après le diagnostic de RAH, le délai moyen de survenue du décès moyen étant de 387 jours après le RAH et 530 jours après la transplantation. Un patient est décédé de RAH associé à une infection, 1 de RAH réfractaire, 1 de sepsis sévère, et 8 de CLAD. La survenue d'un RAH est clairement associée au développement d'un CLAD et à une évolution défavorable en termes de survie.

I.1.b Description histologique et immunomarquage C4d des patients avec rejet aigu humoral

Une moyenne de 4,3 fragments de biopsies par patients était examinée. L'analyse histologique était impossible dans 2 cas à cause d'artéfacts lié au mode de prélèvement. Le nombre de fragments alvéolaires était inférieur à 4 dans 4 cas. La lésion la plus fréquemment observée était l'infiltration des capillaires alvéolaires par des cellules inflammatoires (inflammation microvasculaire) (85.7 %), notamment des polynucléaires neutrophiles. Elle était bien visible dans seulement 35 % des cas. La distribution de l'inflammation microvasculaire était hétérogène ou diffuse et dans 50 % des cas elle était associée à des lésions d'agression alvéolaire aiguë du poumon incluant au moins l'accumulation de fibrine et de polynucléaires neutrophiles dans les espaces alvéolaires. Un patient avait une nécrose tissulaire et 3 avaient une endothélite/artérite. Dix (32 %) patients

présentaient un infiltrat périvasculaire composé de cellules mononuclées répondant au diagnostic du RAC (8 de grade A1 et 2 de grade A2). Quatre patients ne présentaient pas de lésions visibles en microscopie optique.

Les lésions histologiques observées étaient donc peu spécifiques allant d'un poumon quasi normal à un poumon avec intenses lésions de dommage alvéolaire.

Le marquage C4d était minime dans 13 % des cas, focal dans 47 % des cas et diffus dans 40 % des cas. La distribution du C4d n'était pas corrélée à l'importance de l'inflammation microvasculaire ou à la lésion d'agression alvéolaire aiguë ($r=0,0143$; $p=0,942$ et $r=-0,0419$; $p=0,8323$ respectivement).

Au cours du suivi évolutif, l'inflammation microvasculaire disparaissait dans 65 % des cas et le C4d disparaissait pour 21 patients (72,4). Huit patients avaient un marquage C4d positif persistant et parmi eux 6 (75%) avaient des DSA persistants.

I.2 REJET HUMORAL INFRA/SUB-CLINIQUE

I.2.a Description de la population

Sur la période d'étude de Janvier 2007 à Décembre 2014, nous avons identifiés 36 patients avec un marquage C4d+ ne satisfaisant pas l'ensemble des critères de RAH (c'est-à-dire pas de dysfonction du greffon et/ou pas de DSA détectés) que nous avons catégorisé comme patients avec un rejet humoral infra/sub-clinique.

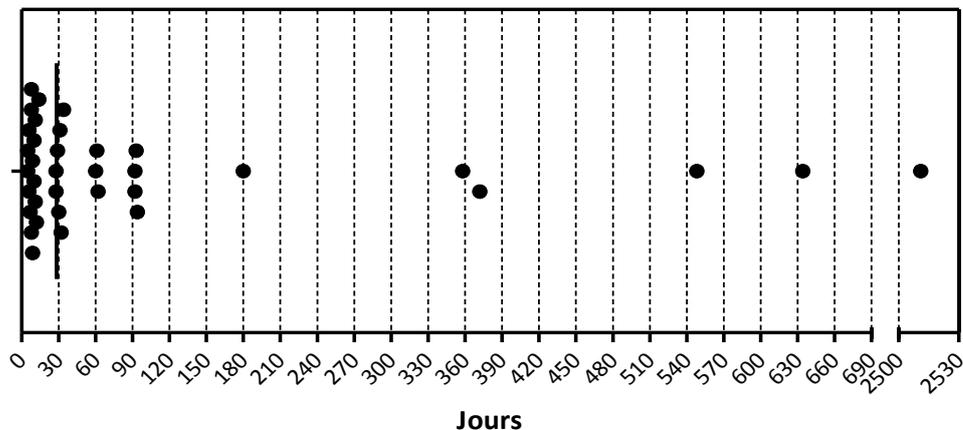
Les caractéristiques de la greffe de ces patients C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH sont résumés dans le Tableau 17 (page 87). L'âge moyen de cette population au moment de la greffe était de 36 ± 13 ans. Elle se composait à 61 % des femmes. La première indication à la greffe était la mucoviscidose (58,3 %) suivi de la BPCO (19,4 %). La transplantation était bi pulmonaire dans la majorité des cas (91,7 %). Trente et un pourcent des patients ont eu un ou plusieurs évènements immunisants dans son passé, qu'il s'agisse d'une grossesse (45 % des femmes) ou d'un antécédent transfusionnel (8 %). Le crossmatch était négatif dans 72 %

des cas, et il n'a pas été réalisé dans les 28 % restant. Quatorze patients avaient des anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur avant la transplantation. Parmi eux, 9 ont bénéficié d'une « désensibilisation » par échange plasmatique avant la transplantation pulmonaire. Quinze patients avaient une DPG de grade 3.

Seize patients recevaient un traitement d'induction par sérum anti-lymphocytaires (n=10) ou par anti-IL2 (n=6). L'immunosuppression de maintenance s'agissait d'une trithérapie associant un corticoïde, un inhibiteur de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) et un antimétabolite (mycophénolate mofétil, MMF ou azathioprine) (Tableau 18, page 88).

Dans 92 % des cas, le marquage C4d a été détecté sur des biopsies de surveillance des patients et 64 % des cas étaient des biopsies précoces (< 1 mois) (Figure 27). Ces patients n'ont pas développé de RAH au cours du suivi malgré l'immunomarquage C4d positif.

Figure 27 : Délai post-transplantation de la détection du C4d+



Au moment du marquage C4d positif, la recherche de DSA s'est révélée positive dans 50 % des cas. Les DSA étaient de novo dans 50 % des cas, préformés dans 27,8 % des cas et à la fois préformés et de novo dans les 22,2 % restant. Quatre patients (21 %) avaient des DSA de classe 1, 7 (42 %) de classe 2 et 7 (37 %) avaient des DSA de classe 1 et 2 (Tableau 20, page 91).

A plus long terme, 24 % des patients C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH développaient une dysfonction chronique du greffon en moyenne 799 ± 265 jours (27 mois)

après la TP. Six patients (17 %) décédaient pendant la période d'étude dont 3 décès précoces. Deux patients sont décédés d'une dysfonction chronique du greffon, 1 d'une hémoptysie brutale, 2 d'un SDRA d'origine infectieuse, et 1 d'une défaillance multiviscérale.

I.2.b Description histologique et immunomarquage C4d

Une moyenne de $5,3 \pm 1,3$ fragments de biopsies ont été analysés. L'inflammation microvasculaire (infiltration des capillaires par les neutrophiles et/ou monocytes) a été observée dans 75 % des cas et l'agression alvéolaire aigüe dans 42 % des cas. Le signe histologique de rejet aigüe cellulaire a été observé dans 22 % des biopsies.

La distribution du marquage C4d était minime dans 39 %, focal dans 50 % et diffus dans 11 % des cas. Il n'y a pas de corrélation entre la distribution du marquage C4d et l'inflammation microvasculaire ($r=-0,093$; $p=0,588$) et la lésion d'agression alvéolaire aigüe ($r=-0,023$; $p=0,894$).

I.3 COMPARAISON DES PATIENTS AVEC REJET AIGUE HUMORAL CLINIQUE VERSUS PATIENTS AVEC REJET HUMORAL INFRA/SUB-CLINIQUE

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les deux groupes au moment de la greffe. Les deux groupes étaient comparables pour l'âge, la pathologie pulmonaire initiale et le type de transplantation. La répartition du sexe était homogène entre les deux groupes. De même, les évènements sensibilisants avant la transplantation et le protocole d'immunosuppression étaient comparables entre les deux groupes (Tableau 17, page 87).

Les caractéristiques des DSA n'étaient pas significativement différentes entre les deux groupes. En revanche, le MFI du DSA immunodominant était significativement supérieur dans le groupe des patients avec RAH (7241 [2395-9492] versus 1835 [705-4073] ; $p=0,0007$) (Tableau 20, page 91).

I.3.a Lésions histologiques

Nous n'avons observé aucune différence significative entre le groupe RAH et le groupe de patients avec un C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH concernant la fréquence des lésions histologiques. Cependant en termes de gravité de lésions, on observe une fréquence plus élevée de lésions modérées (score 2) d'inflammation microvasculaire et d'agression alvéolaire aigue dans le groupe RAH (Tableau 22).

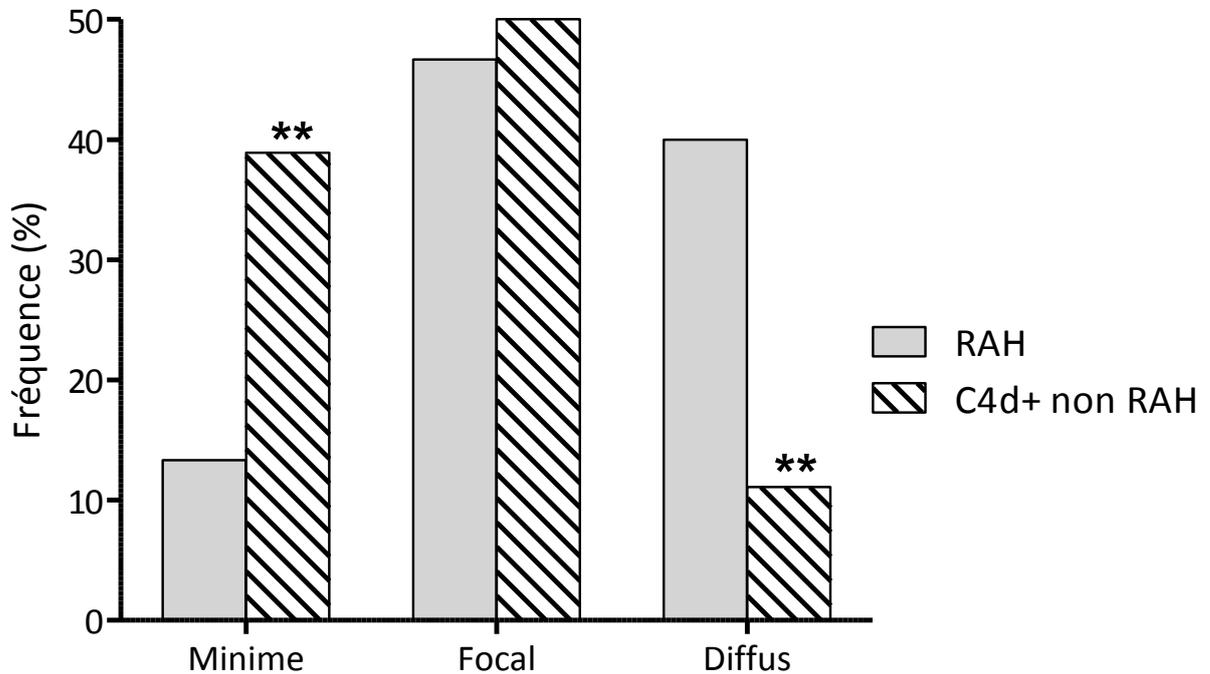
Tableau 22 : Fréquence des lésions histologiques

	Patients RAH (n=28)	Patients C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH (n=36)	p
Nombre de biopsies, moyenne ± SD	4,2 ± 1,7	5,3 ± 1,3	0,0056
Inflammation microvasculaire, n (%)	24 (85,7)	27 (75)	0,3587
Score 1	14 (58,3)	22 (81,5)	
Score 2	9 (37,5)	5 (18,5)	
Score 3	1 (4,2)	0 (0)	
Agression alvéolaire aigue, n (%)	12 (42,9)	15 (41,7)	1
Score 1	3 (25)	12 (80)	
Score 2	9 (75)	3 (20)	
Rejet aigu cellulaire, n (%)	10 (35,7)	8 (22,2)	0,2789
Grade A1	8 (80)	6 (75)	
Grade A2	2 (20)	2 (25)	

I.3.b Immunomarquage C4d

L'étendu du marquage C4d était majoritairement focal (50 %) comme observé dans le groupe RAH (Figure 28). Cependant, contrairement au groupe RAH, une grande partie du marquage était minime (39 %) et très peu de marquage diffus a été observé (11%) dans le groupe des patients C4d+ (Figure 28).

Figure 28 : Répartition du marquage C4d dans le groupe RAH et C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH



* indique une différence significative avec le groupe RAH (** $p < 0,01$)

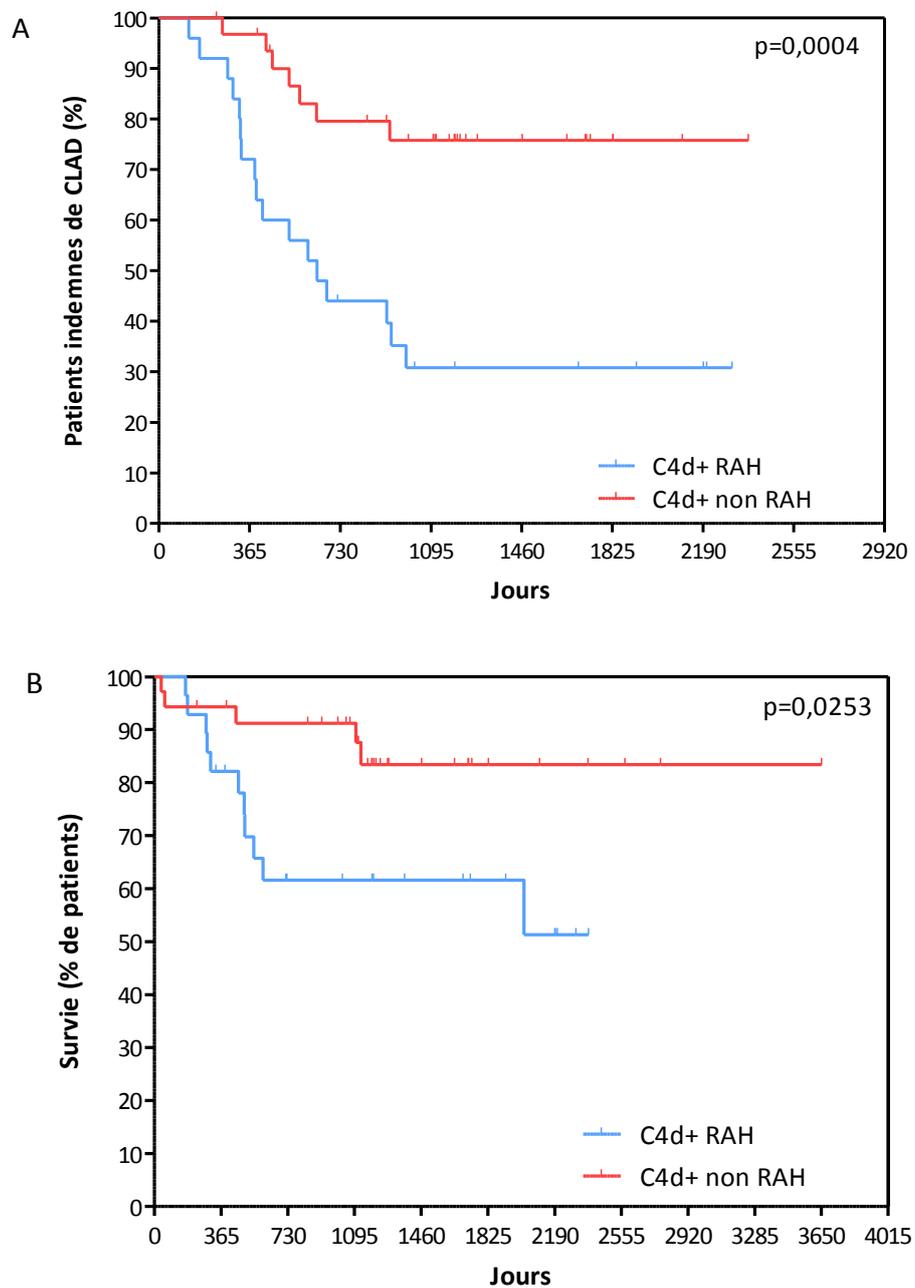
RAH : Patients RAH. C4d+ non RAH : Patients C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH

I.3.c Impact du marquage C4d dans le devenir du greffon

Après exclusion des patients décédés avant 6 mois ou ceux qui ont un délai de suivi < 2 ans pour les patients sans dysfonction chronique du greffon (CLAD), 58 patients avec un marquage C4d+ (patients RAH cliniques, $n=25$ et patients non RAH cliniques, $n=33$) ont été inclus dans l'analyse de survenue de dysfonction du greffon. L'incidence de la dysfonction chronique du greffon était significativement plus élevée chez les patients avec un C4d+ ayant développé un RAH (C4d+ RAH) comparée aux patients avec un C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH (C4d+ non RAH) (logrank, $p = 0,0004$) (Figure 29A).

Par ailleurs, une diminution significative de la survie à long terme a été observée chez les patients C4d+ ayant subi un épisode de rejet aigu humoral (logrank, $p = 0,0253$) (Figure 29B).

Figure 29 : Survenue de CLAD (A) et analyse de survie (B) des patients avec un marquage C4d+



C4d+ RAH : Patients RAH clinique ; C4d+ non RAH : Patients C4d+ ne satisfaisant pas les critères de RAH (rejet humoral infra/sub-clinique)

II. GROUPES CONTROLES

Les groupes contrôles (n = 263) sont composés de patients transplantés (patients avec un rejet aigu cellulaire (groupe 3, n=130), patients stables à M3 n'ayant jamais eu de DSA (groupe 4, n=59), patients avec une dysfonction primaire du greffon sans infection ni DSA (groupe 5, n=12) et de patients non transplantés pulmonaires (patients opérés pour un cancer du poumon (groupe 6, n=50), patients avec une pneumopathie infectieuse (groupe 7, n=12) (voir Tableau 9 et Figure 25).

II.1 PATIENTS CONTROLES TRANSPLANTES

Pour les patients avec un RAC, un immunomarquage C4d a été réalisé sur 130 biopsies. Le RAC était de grade A1 dans 84,6 % des cas, de grade A2 dans 14,6 % des cas et de grade A3 dans 0,8 % des cas. La fréquence du marquage C4d+ était relativement faible (6,2 %). Sur les 130 biopsies, 111 avaient une recherche de DSA au moment de la biopsie dont 40 (36 %) s'est révélée positive. La fréquence de marquage C4d+ n'était pas significativement différente chez les patients RAC+ avec et sans DSA (5 % versus 8,4 % ; p = 0,7087). Dans 19 cas, les données sur les DSA n'étaient pas disponibles (pas d'accès au dossier patient ou pas de recherche de DSA circulants au moment de la biopsie) et aucun marquage C4d+ n'a été observé.

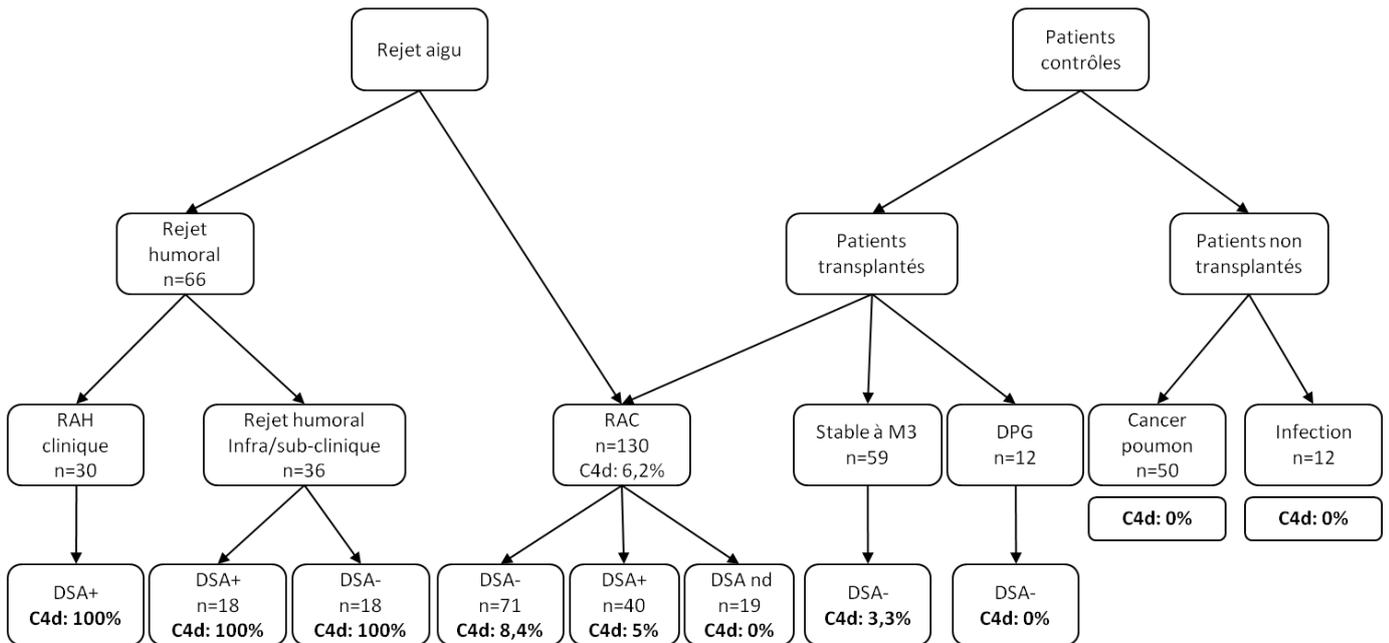
Chez les patients contrôles à M3 n'ayant jamais eu de DSA, 20 % avaient une inflammation microvasculaire et 8 % avaient une agression alvéolaire aiguë. Chez ces patients un immunomarquage C4d+ était retrouvé dans 3,3 % des cas indépendamment de l'existence d'une inflammation microvasculaire.

Chez les patients avec une dysfonction primaire du greffon sans infection ni DSA, des lésions compatibles avec un RAH (c'est-à-dire une inflammation microvasculaire et une agression alvéolaire aiguë) étaient retrouvées dans tous les cas sans signe histologique de rejet aigu cellulaire. Aucun de ces patients n'avait de l'immunomarquage C4d+.

II.2 PATIENTS CONTROLES NON TRANSPLANTES

Dans les groupes contrôles de patients non transplantés, l'analyse des lésions histologiques a été réalisée uniquement chez les patients avec une pneumopathie infectieuse. Une inflammation microvasculaire était observée dans tous les cas. Il est important de noter qu'aucun marquage C4d n'a été observé dans les deux groupes de patients contrôles non greffés (patients opérés pour un cancer de poumon et patients avec une pneumopathie infectieuse).

Figure 30 : Organigramme des groupes de patients étudiés avec les résultats du marquage C4d



III. DISCUSSION

Le principal objectif de cette étude était de préciser les lésions histologiques et l'intérêt du marquage C4d du RAH clinique (dégradation de la fonction du greffon, immunisation anti-HLA et lésions anatomopathologiques) en transplantation pulmonaire. Nous avons ainsi rapporté dans ce travail la description d'une série de 30 patients présentant les critères de RAH défini ci-dessus. Notre étude montre que les lésions histologiques associées au RAH ne sont pas spécifiques et couvrent un large spectre de lésions allant d'un parenchyme pulmonaire quasi-normal à poumon avec intenses lésions de dommage alvéolaire. Bien qu'inconstante, l'inflammation microvasculaire est la principale lésion histologique évocatrice d'un RAH. Notre étude montre que le marquage C4d apparaît comme un marqueur utile au diagnostic de RAH et son suivi évolutif.

Les lésions histologiques du rejet aigu humoral pulmonaire

Quelques études ont rapporté que la capillarite est la lésion la plus caractéristique du RAH pulmonaire (Astor et al., 2005; Badesch et al., 1998; DeNicola et al., 2013; Yousem and Zeevi, 2012). Cependant la définition du mot capillarite varie d'une étude à une autre, cette lésion reste donc très controversée. L'infiltration des capillaires par les neutrophiles et la lésion d'agression alvéolaire aiguë du poumon ont été récemment rapportées par Wallace et coll. (Wallace et al., 2014) comme susceptibles d'être associées à un RAH. L'inflammation microvasculaire a été la lésion fréquemment observée chez nos patients (85,7 %). Sa présence peut suggérer un possible afflux de cellules inflammatoires dans la microcirculation en réponse à la fixation des DSA à l'endothélium. Elle était associée à des lésions d'agression alvéolaire aiguë du poumon dans 50 % des cas. Par ailleurs la forme clinique la plus grave (SDRA) était associée à la présence de ces deux lésions. Dans notre série, aucun patient n'avait une inflammation microvasculaire avec nécrose fibrinoïde. En revanche, deux patients ont présenté une endothélite/artérite.

L'inflammation microvasculaire et la lésion d'agression alvéolaire aiguë du poumon ont été observées également dans nos groupes contrôles démontrant le caractère peu spécifiques de ces lésions. En effet, ces aspects histologiques peuvent être retrouvés dans d'autres

pathologies pulmonaires comme l'ischémie reperfusion, la pneumopathie infectieuse ou d'aspiration et une toxicité aux médicaments.

En accord avec des précédentes études (DeNicola et al., 2013; Wallace et al., 2014) nous notons dans notre travail des lésions histologiques du RAH variant d'un parenchyme pulmonaire normal à une lésion d'agression alvéolaire aiguë du poumon avec ou sans histologie de type RAC. Des lésions histologiques de type rejet aigu cellulaire sont retrouvées dans 32 % des cas de RAH suggérant une possible intrication de ces deux formes de rejet. Le caractère non spécifique de ces résultats indique que les lésions histologiques doivent être interprétées avec précaution et l'importance de bien définir et reconnaître les lésions histologiques notamment l'atteinte microvasculaire.

Par analogie à la définition de l'inflammation microvasculaire en transplantation rénale et cardiaque, nous avons défini l'inflammation microvasculaire dans le poumon comme une infiltration des capillaires alvéolaires par les cellules inflammatoires incluant les neutrophiles et/ou les monocytes. L'infiltration par les neutrophiles a été observée dans la majorité des biopsies (92 % des biopsies avec l'inflammation microvasculaire dont 50 % était associé à une infiltration monocyttaire). Cependant, nous avons constaté que les monocytes dans les capillaires alvéolaires n'étaient pas facilement identifiables et leur présence pourrait ainsi être sous-estimée. Par ailleurs, l'identification des leucocytes dans les capillaires alvéolaires peut être faussement interprétée comme une inflammation interstitielle.

Au cours de ce travail, nous avons été confrontés à la difficulté de distinguer un capillaire normal d'une légère inflammation microvasculaire. Pour notre étude, nous avons ainsi établi une classification de l'inflammation microvasculaire sur une échelle de 0 à 3 selon la concentration de neutrophiles/monocytes intracapillaires sur la biopsie (voir Tableau 12). Actuellement, il n'existe aucune recommandation ou de description précise sur la classification de l'inflammation microvasculaire dans le poumon et en absence de définition exacte, son appréciation dépend de chaque observateur. Une classification claire des lésions histologiques en transplantation pulmonaire est donc nécessaire notamment quant à la signification des lésions de bas grade.

Interprétation et place du marquage C4d

Si l'application du marquage C4d est largement acceptée en transplantations rénale et cardiaque, la signification et l'interprétation du marquage C4d en transplantation pulmonaire ne sont pas encore claires comme l'attestent les données controversées publiées dans la littérature. Le marquage C4d dans le poumon est décrit comme non spécifique et concernant de nombreuses structures différentes (Astor et al., 2005; Batal et al., 2008; Magro, 2003; Wallace et al., 2005; Westall et al., 2008). Depuis quelques années, la technique d'immunohistochimie a beaucoup évolué (automatisation et standardisation des protocoles, meilleure reproductibilité) et de nouveaux anticorps anti-C4d sont disponibles. L'immunomarquage avec l'anticorps anti-C4d rapporté dans la littérature est réalisé, dans la majorité des études, en immunofluorescence (IF) du fait de sa plus forte sensibilité par rapport à l'immunohistochimie (IHC). Cependant l'IF nécessite des fragments congelés ce qui est rarement le cas dans notre centre de transplantation. Nous avons réévalué la spécificité du marquage C4d sur tissu fixé et inclus en paraffine en utilisant différents groupes témoins. Le marquage C4d dans le poumon a été étudié sur des tissus pulmonaires normaux prélevés à distance de la tumeur sur des pièces de lobectomie. De plus le C4d peut être généré localement par une activation du complément lors d'une infection, nous avons ainsi étudié des biopsies pulmonaires de patients avec une pneumopathie infectieuse. Nous avons également étudié des biopsies pulmonaires de patients transplantés sans rejet et avec une histologie typique de rejet aigu cellulaire. Nos résultats confirment que de nombreuses structures pulmonaires dont l'endothélium vasculaire et les fibres élastiques sont marquées par l'anticorps anti-C4d. En revanche le marquage C4d des capillaires alvéolaires (marquage linéaire et circonférentiel) a été observé uniquement dans les tissus pulmonaires de patients transplantés et dans la très grande majorité des cas lors d'un rejet humoral. Seul le marquage C4d des capillaires alvéolaires est donc considéré positif. Le marquage des autres structures sert de contrôle interne de la technique d'immunomarquage.

Selon l'ISHLT, le marquage C4d ne doit être considéré comme positif que s'il est diffus (> 50 % de capillaires alvéolaires marquées). Cette recommandation est basée sur les données de la littérature indiquant que le marquage C4d non spécifique le plus fréquemment observé est focal (< 50 % de capillaires alvéolaires marqués). Dans notre étude, hormis les rares

marquages en bordure (considéré comme un artefact), nous avons considéré qu'un marquage C4d est positif en présence de capillaires alvéolaires marqués et distingué 4 groupes : négatif (absence de marquage), minime (< 10 %), focal (10 – 50 %) et diffus (> 50 % de capillaires alvéolaires marqués). D'après notre expérience, il est difficile d'utiliser l'intensité du marquage dans notre classification du fait de sa variabilité. En effet, elle peut être influencée par la technique d'immunomarquage (lot d'anticorps, réactif de révélation...) et ne reflète pas forcément l'intensité du dépôt de C4d. Par ailleurs nous avons constaté que l'étendue et l'intensité du marquage C4d ne sont pas corrélées à la sévérité des lésions histologiques (inflammation microvasculaire et lésion d'agression alvéolaire aiguë du poumon) et des symptômes cliniques.

Il est clairement établi que le dépôt de C4d dans les capillaires reflète une activation classique du complément via les alloanticorps. Cependant dans cette étude, nous avons observé des marquages capillaires en absence de DSA.

Malgré l'absence de DSA, nous ne pouvons pas exclure que les DSA non détectés par les techniques utilisées soient impliqués dans le mécanisme d'apparition du C4d. Les techniques de détection des anticorps anti-HLA ont considérablement évoluées dans le temps. Elles sont de plus en plus sensibles, spécifiques et ont une meilleure résolution mais manquent encore de standardisation. Les seuils de positivité sont peu standardisés et varient selon l'expérience de chaque laboratoire. L'absence de détection d'anticorps pourrait être due à un effet prozone quand on est en présence d'un taux très élevé d'anticorps (excès d'anticorps). Par ailleurs, dans la pratique quotidienne des centres de TP, la recherche des DSA est limitée aux anticorps de type l'IgG pour les antigènes HLA de type A, B pour les classes 1 et DQ, DR pour les classes 2. Les anti-HLA-Cw et anti-HLA DP ne sont pas détectés car leur pertinence clinique n'est pas encore établie. Des études en cours ont pour objectif d'en évaluer la pertinence. En transplantation rénale, la positivité de C4d en absence de DSA (A, B, DQ, DR) a suscité l'intérêt grandissant pour les anti-HLA-Cw et anti-HLA-DP. Une étude récente a ainsi démontré un effet délétère des anti-HLA-Cw/DP du même ordre que les anti-HLA-A/B/DQ/DR (Bachelet et al., 2015). Des rejets humoraux avec des DSA anti-HLA-Cw et DP ont été également rapportés dans la littérature (Samaniego et al., 2006; Suneja and Kuppachi, 2012; Thauat et al., 2009).

Bien que le complément puisse être activé par des anticorps de type IgG, la présence d'anticorps de type IgM ne contre-indique pas la transplantation et par conséquent la recherche de DSA de type IgM n'est pas systématique durant le suivi de greffe. Des études récentes ont rapportés des rejets humoraux avec des DSA de type IgM dans le rein suggérant leurs effets délétères sur le greffon (Everly et al., 2014; Nizio et al., 2015).

D'autres part, l'existence de DSA intra-greffon (DSA *in situ*) a été déjà démontrée dans des cas de C4d positif en absence de DSA circulants (Bachelet et al., 2013; Bocrie et al., 2007) en transplantation rénale. Dans le poumon, aucun travail n'a exploré l'existence de DSA intra-greffon à l'heure actuelle.

Le marquage C4d peut être aussi dû à une activation du complément par des anticorps non dirigés contre les molécules HLA du donneur et donc non détectés par les techniques actuelles. Le rôle des anticorps non anti-HLA dans les rejets humoraux a été déjà rapporté dans la littérature (Giral et al., 2013; Ming et al., 2015; Zou et al., 2007).

Enfin, nous ne pouvons pas exclure des marquages C4d faussement positif. Dans notre étude, un marquage positif C4d au niveau des capillaires minime (39 % des cas) a été considéré comme positif. La signification de ce marquage minime de C4d reste cependant indéterminée.

Compte tenu de nos résultats et des données de la littérature, nous pensons que le marquage C4d doit être effectué en cas de détection de DSA circulants, en présence de lésions histologiques compatibles avec un RAH (inflammation microvasculaire, lésion d'agression alvéolaire aiguë) et en présence d'une dysfonction du greffon sans autres cause identifiable. Il faut souligner l'importance d'avoir des biopsies adéquates avec un nombre minimum de fragments alvéolaires associés à des capillaires afin que l'interprétation du marquage C4d soit contributive.

La fréquence de marquage C4d+ est faible dans les groupes contrôles de patients transplantés avec une histologie de type rejet aigu cellulaire (6,2 %) et sans rejet (3,3 %). Par ailleurs ce marquage C4d en cas de rejet aigu cellulaire et chez les patients stables n'est pas associé à la présence de DSA. Ce marquage peut être considéré soit comme un faux positif car rien ne distingue la localisation de ce marquage de celle observée en cas de rejet

humoral, soit comme la traduction de la présence d'anticorps activant le complément non détectés par les techniques actuelles (recherche de DSA) ou d'une activation locale du complément pour d'autres raisons non identifiées. Dans ce contexte la prise en charge thérapeutique des patients n'est pas influencée par cet immunomarquage isolé.

Depuis quelques années en transplantation rénale, la validité du C4d en tant que biomarqueur de rejet aigu humoral a été remise en cause du fait de la reconnaissance des rejets humoraux C4d négatifs (définis par une inflammation de la microcirculation modérée en présence de DSA et une augmentation de transcrits associés à l'activation endothéliale). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'absence de marquage C4d dans les biopsies. La première serait la faible sensibilité du marquage C4d (Cohen et al., 2012; Loupy et al., 2011; Sis et al., 2009). Une autre hypothèse serait l'existence des DSA qui ont une affinité faible ou nulle de fixer le complément. D'autres travaux soutiennent l'implication des voies d'activation par les DSA indépendantes du complément (Colvin, 2007). Cependant en absence d'autres marqueurs fiables aujourd'hui, le marquage C4d reste utile en routine pour le diagnostic de RAH en transplantation pulmonaire. Dans l'avenir, de nouvelles technologies «omics» (protéomique) associées ou non à l'immunohistochimie pourraient améliorer le diagnostic du RAH.

A notre connaissance, nous rapportons pour la première fois dans cette étude, le suivi anatomopathologique des patients RAH. Pour chaque patient, nous avons pu analyser les biopsies transbronchiques disponibles jusqu'à la fin du suivi des patients avec RAH dans le cadre de cette étude. Le délai médian post-RAH de la dernière biopsie disponible était de 254 jours [84 – 717]. Vingt-huit pourcent des patients (n=8) avaient un marquage C4d persistant après le traitement, ces patients n'ont pas répondu au traitement du rejet. Six patients sur les huit avaient des DSA persistants. Les deux autres patients avaient des DSA négatifs quelques jours après le traitement (7 et 10 jours) mais les recherches suivantes de DSA se sont révélées positives. Il semble donc que la persistance du marquage C4d soit associée à une persistance des DSA. A l'inverse, la disparition du marquage C4d est non seulement associée à une disparition des DSA mais également à une réponse favorable au traitement suggérant qu'il peut être un bon marqueur de réponse au traitement.

Enfin, nous avons pu montrer que si le RAH peut être réversible sous traitement, sa survenue augmente le risque de mortalité lié à la forte incidence de passage à la chronicité de la dysfonction du greffon (étude détaillée en annexe) comme cela a été décrit dans des séries précédentes (DeNicola et al., 2013; Witt et al., 2013). De plus, le marquage C4d seul (sans que les patients développent un RAH) ne semble pas être associé au développement d'une dysfonction du greffon ni à une altération de la survie à long terme. Il est cependant nécessaire pour évaluer le réel impact du dépôt de C4d de se comparer à un groupe de patients n'ayant jamais eu de marquage C4d et de DSA.

Actuellement, il n'existe pas encore de directives précises sur la prise en charge de RAH dans le poumon, d'autres études sont nécessaires pour définir la stratégie thérapeutique la plus optimale.

IV. CONCLUSION

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. Un des points clé pour atteindre ces objectifs est la détection précoce et précise du rejet aigu.

Nous avons démontré que le marquage C4d réalisé sur des tissus fixés et inclus en paraffine est dans notre expérience : 1/ un marqueur reflétant un rejet de type humoral avec ou sans dysfonction du greffon ; 2/ un outil permettant de confirmer le diagnostic de RAH et d'évaluer la réponse au traitement. En revanche, les lésions histologiques ne sont pas spécifiques et l'inflammation microvasculaire, la lésion la plus évocatrice du RAH, est inconstante et difficile à identifier avec fiabilité. D'autres études multicentriques sont nécessaires pour confirmer ces résultats et établir des définitions consensuelles des lésions notamment l'infiltration des capillaires alvéolaires par les leucocytes.

En absence d'autres marqueurs fiables à l'heure actuelle, le marquage C4d est important pour confirmer un diagnostic de RAH. L'identification de nouveaux marqueurs du rejet, en particulier le rejet humoral est nécessaire. En transplantation rénale, le niveau d'expression ENDAT (ENDothelial-Associated gene Transcripts) sur des biopsies de greffon fait actuellement partie intégrante des critères diagnostiques du rejet aigu humoral (Haas et al., 2014; Sis et al., 2009).

PARTIE 2 : REJET AIGU ET POLARISATION DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES

I. PRESENTATION DES RESULTATS

Nous avons étudié la composition cellulaire des LBA de patients transplantés selon leur statut clinique et histopathologique. Quatre groupes de patients ont été étudiés : 1/ patients stables cliniquement sans rejet (RAH-RAC-, groupe contrôle, n = 54) ; 2/ patients avec rejet aigu cellulaire (RAH-RAC+, n = 48) ; 3/ patients avec rejet aigu humoral (RAH+RAC-, n = 13). ; et 4/ patients avec rejet mixte cellulaire et humoral (RAH+RAC+, n = 9). Le diagnostic de RAC et de RAH a été établi selon les recommandations de l'ISHLT avec cependant les limites précédemment discutées.

Les résultats des comptes cellulaires de LBA sont colligés dans le Tableau 23. Il n'y a aucune différence significative entre les différents groupes.

Bien que le pourcentage de macrophages apparaisse plus faible chez les patients avec rejet aigu, une différence statistiquement significative a été observée uniquement entre le groupe de patients avec RAC sans RAH (RAH-RAC+) et le groupe contrôle (RAH-RAC-). Cependant, comparé au groupe RAH-RAC+ le pourcentage de macrophages observé dans le groupe de patients avec RAH (RAH+RAC-) et avec rejet mixte (RAH+RAC+) semble plus faible. La comparaison des groupes 2 à 2, sans prendre en compte l'inflation du risque α lié aux comparaisons multiples, révèle des différences significatives entre les groupes RAH+RAC-, RAH+RAC+ et le groupe contrôle.

A l'inverse, le pourcentage de neutrophiles est légèrement plus élevé chez les patients avec rejet aigu sans différence statistiquement significative par rapport au groupe contrôle. Le pourcentage de lymphocytes ne diffère pas entre les différents groupes.

Tableau 23 : Caractéristiques des LBA

Groupes	RAH-RAC- (n=54)	RAH-RAC+ (n=48)	RAH+RAC- (n=13)	RAH+RAC+ (n=9)
Numération totale, x10³/mL	320 [175 - 505]	330 [212,5 - 600]	600 [290 - 1270]	340 [240 - 480]
Macrophages, %	85,5 [69 - 94,3]	73 [44,3 - 85]*	59 [42,5 - 84]	63 [32,5 - 85]
Macrophages, x10³/mL	236,2 [124 - 374]	212,9 [132 - 362]	354 [196 - 543]	214,2 [101 - 380]
Lymphocytes, %	3,5 [1 - 7,3]	5 [2 - 17,8]	3 [1,5 - 8]	8 [4,5 - 19]
Lymphocytes, x10³/mL	11,9 [2,4 - 28,2]	15 [7,2 - 63,8]	25,6 [5,4 - 35,6]	34,2 [23 - 73,2]*
PNN, %	6,5 [2 - 22,3]	12 [4 - 24]	25 [5,5 - 55]	12 [5 - 43,5]
PNN, x10³/mL	16,8 [4,8 - 56,5]	35,2 [12 - 87,4]	132,6 [21,2 - 559]*	43,5 [18,3 - 210]

Les résultats sont représentés sous forme de médiane [25% percentile – 75% percentile]. PNN : Polynucléaire neutrophile

* p<0.05 versus groupe contrôle (RAH-RAC-)

Pour étudier la polarisation des macrophages alvéolaires chez les patients transplantés, l'expression de HLA-DR (marqueur M1) et CD206 (marqueur M2) par cytométrie en flux a été analysée sur une série de 94 LBA provenant de 59 patients transplantés. La série de LBA effectuée sur chaque patient était considérée comme des événements séparés (délai minimum entre 2 LBA provenant d'un même patient = 1 mois). Chaque LBA a été ensuite attribué dans un groupe selon la présence ou non d'un rejet aigu au moment du LBA. Nous avons ainsi constitué 2 groupes : des patients sans rejet aigu (groupe RAC-) que nous considérons comme groupe contrôle et des patients avec rejet aigu cellulaire uniquement (groupe RAC+).

Les caractéristiques des patients et des LBA sont représentées dans le Tableau 24. Aucune différence significative n'a été observée entre les 2 groupes hormis la proportion des neutrophiles dans le LBA. Cependant comme observé dans l'étude précédente, on peut constater une légère baisse de la proportion de macrophages dans les LBA chez les patients avec RAC.

Tableau 24 : Caractéristiques des patients et du LBA

	RAC- (n=86)	RAC+ (n=8)	p
EFR			
VEMS, %	73 [59,3 - 96]	72,5 [68,8 - 83]	0,992
CV, %	83 [66,5 - 97]	78 [68,8 - 86,2]	0,557
VEMS/CV, %	85 [74,3 - 94]	89 [80,8 - 93]	0,722
Immunosuppression			
Corticoïde, mg/jr	15 [5 - 31,1]	30 [11,3 - 38,8]	0,34
Tacrolimus, mg/jr	4,75 [2,88 - 7,5]	5,5 [2,63 - 9,5]	0,472
Ciclosporine, mg/jr	2000 [1000 - 2000]	2000 [1000 - 3000]	0,41
Infection, n (%)	24 (27,9)	3 (37,5)	0,174
Caractéristiques du LBA			
Numération totale, x10 ³ /mL	290 [200 - 500]	325 [190 - 1380]	0,645
Macrophages, %	89 [72 - 95]	72 [43,8 - 85,5]	0,059
Macrophages, x10 ³ /mL	225,6 [155,3 - 336,6]	146,2 [102,4 - 601,2]	0,524
Lymphocytes, %	3 [1 - 7]	3,5 [2 - 6,5]	0,784
Lymphocytes, x10 ³ /mL	8,8 [3,18 - 24,2]	12,3 [6,4 - 29,4]	0,655
PNN, %	5 [2 - 15]	23,5 [12,5 - 41]	0,013
PNN, x10 ³ /mL	16,4 [5,2 - 35,1]	67,2 [28,2 - 165]	0,011

Les résultats sont représentés sous forme de médiane [25% percentile – 75% percentile] sauf pour l'infection (nombre et pourcentage). CV : Capacité Vitale. EFR : Exploration Fonctionnelle Respiratoire. PNN : Polynucléaire neutrophile. VEMS : Volume Expiratoire Maximal par Seconde.

L'infection peut augmenter le pourcentage de neutrophile dans le LBA (Clelland et al., 1993; Reynaud-Gaubert et al., 2002). Dans notre étude, 27,9 % et 37,5 % des patients dans le groupe RAC- et le groupe RAC+ respectivement avaient une infection. En excluant les patients avec infection, nous n'observons plus de différence significative sur le pourcentage de neutrophile entre les deux groupes

La polarisation des macrophages alvéolaires a été caractérisée par l'expression ou non de HLA-DR et CD206. Sont considérés comme M1 les macrophages exprimant HLA-DR mais pas CD206 (HLADR+, CD206-) et M2 les macrophages exprimant CD206 mais pas HLA-DR

(HLADR-, CD206+) ; M1/M2 les macrophages exprimant HLA-DR et CD206 (HLADR+, CD206+) et M0 les macrophages non polarisés n'exprimant ni HLA-DR ni CD206. Les résultats montrent que la proportion de chaque type de macrophage, n'est pas significativement différente dans les 2 groupes de patients (Tableau 25).

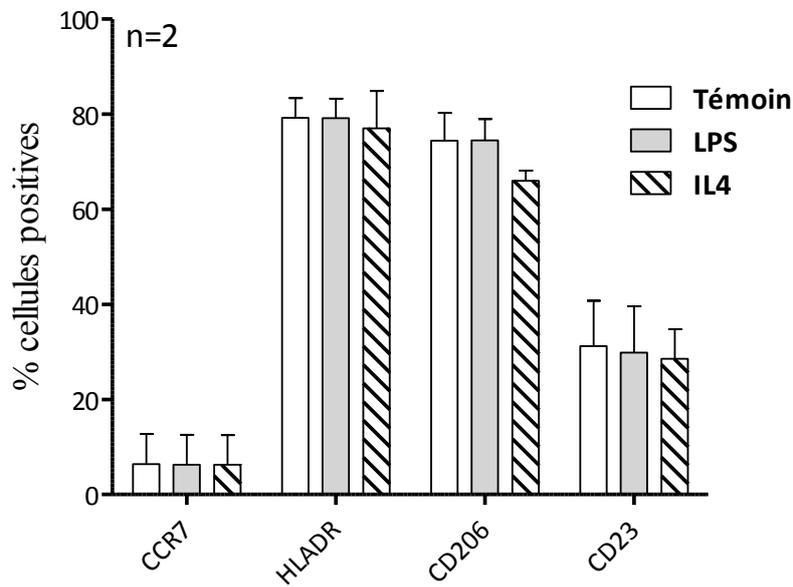
Tableau 25 : Proportion des macrophages alvéolaires polarisés

	RAC- (n=8)		RAC+ (n=86)		p
M1 (HLADR+, CD206-), %	0,92	[0,12 - 2,86]	1,95	[0,26 - 8,63]	0,389
M1M2 (HLADR+, CD206+), %	67,8	[16,7 - 87,5]	70,05	[26,5 - 78,6]	0,818
M2 (HLADR-, CD206+), %	10,3	[2,8 - 48,2]	4,9	[1,38 - 32,13]	0,375
M0 (HLADR-, CD206-), %	10,2	[4,2 - 21,9]	20,4	[6,8 - 25,7]	0,182

Les résultats sont représentés sous forme de médiane [25% percentile–75% percentile].

Afin de vérifier si les marqueurs de membrane utilisés pour identifier l'état de polarisation des macrophages étaient modulés par une polarisation induite *in vitro*, nous avons étudié en cytométrie de flux ces marqueurs ainsi que d'autres marqueurs comme le CCR7 (M1) et le CD23 (M2) sur des macrophages de LBA exposés au LPS (polarisation M1) ou à l'IL-4 (polarisation M2). Les résultats indiquent qu'aucun de ces marqueurs membranaires n'est modulé par le LPS ou par l'IL-4 (Figure 31).

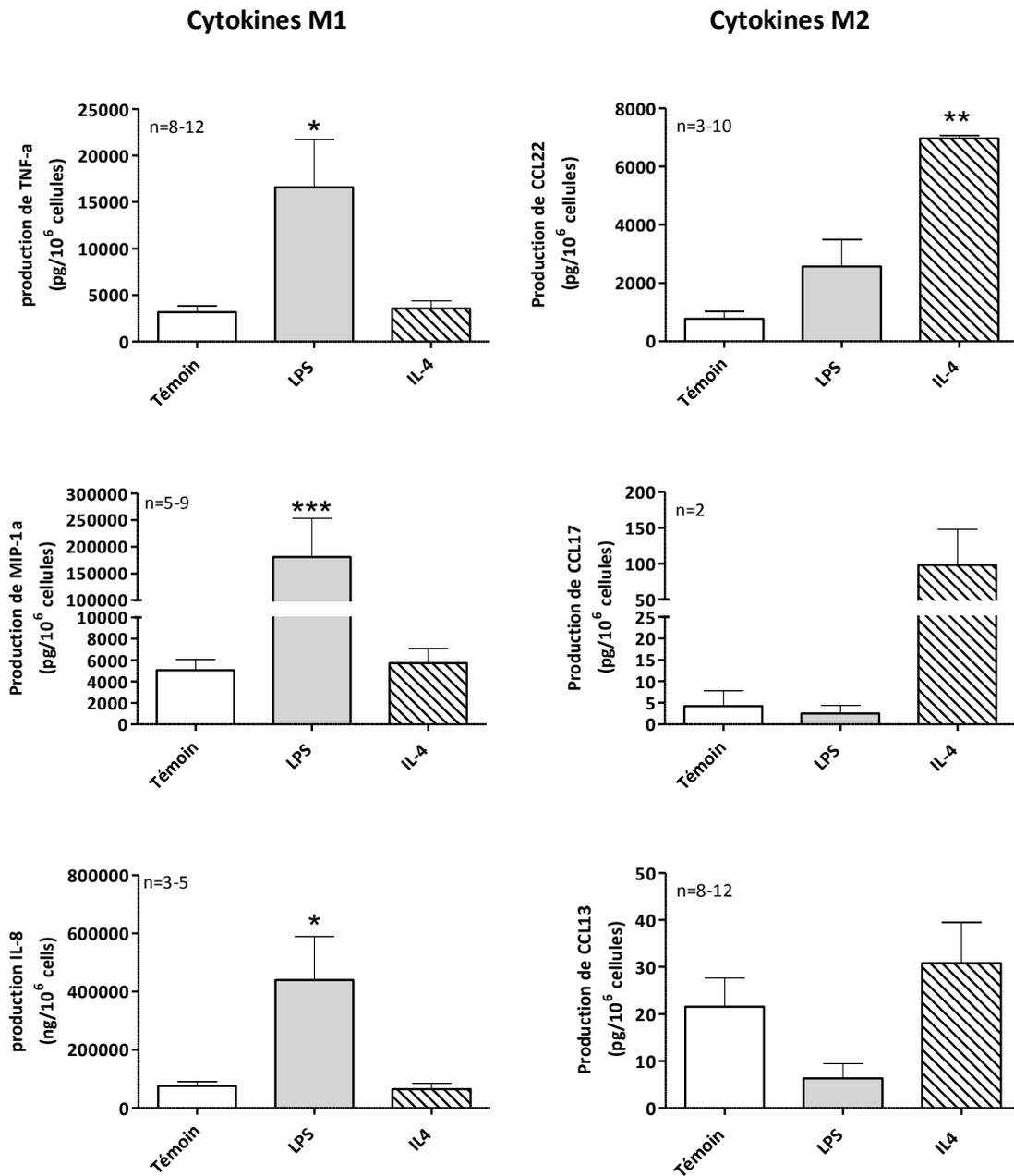
Figure 31 : Phénotypage des macrophages alvéolaires polarisés



Devant ces résultats, nous avons regardé si la production de cytokines et l'expression des transcrits étaient bien modulées dans ces macrophages exposés au LPS ou à l'IL-4.

Plusieurs cytokines spécifiques de la polarisation M1 et M2, identifiées dans le laboratoire UPRES EA220 sur des macrophages pulmonaires humains, ont été mesurés par ELISA. Les résultats montrent que le LPS induit une augmentation de la production de cytokines M1 : TNF- α , MIP1- α et IL-8, et que l'IL-4 induit une augmentation de la production de cytokines M2 : CCL13, CCL17 et CCL22 (Figure 32).

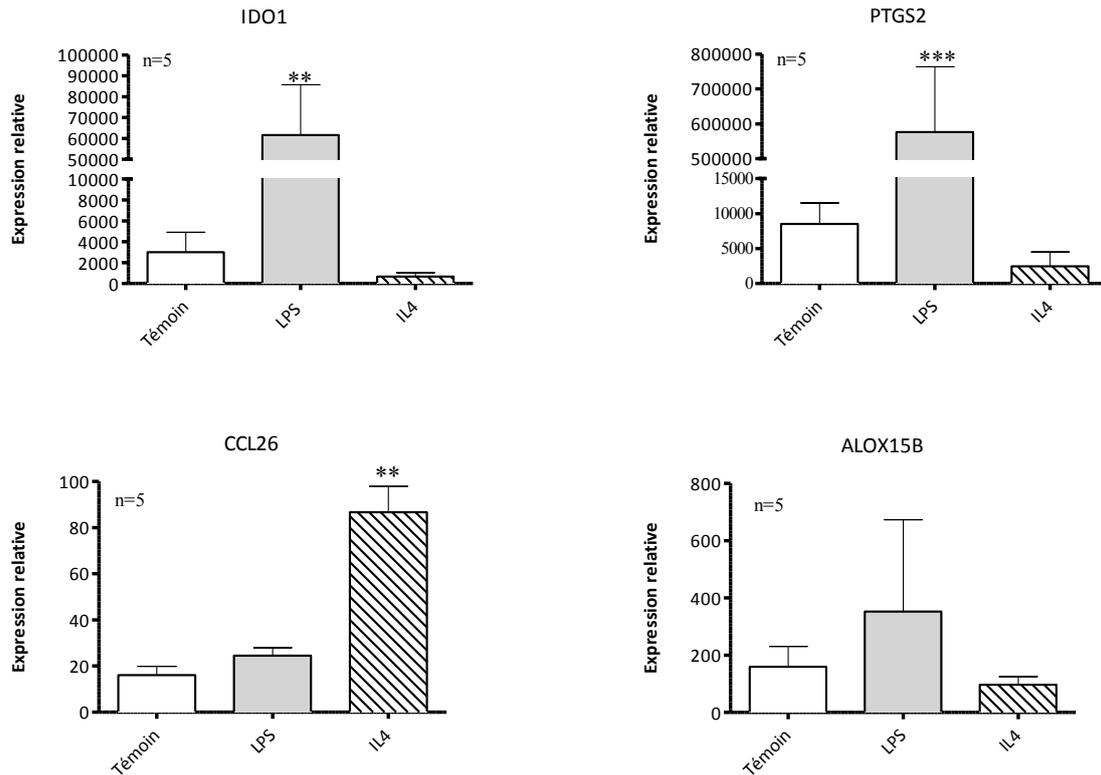
Figure 32 : Production de marqueurs cytokiniques M1/M2 par les macrophages alvéolaires



* indique une différence significative avec le témoin (*p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.005)

Concernant l'expression des transcrits spécifiques aux macrophages M1/M2, nous avons aussi observé une augmentation des marqueurs transcriptionnels M1 (IDO1, PTGS2, ALOX15B) avec le LPS et M2 avec l'IL-4 (CCL26) (Figure 33).

Figure 33 : Expression des marqueurs transcriptionnels M1/M2 par les macrophages alvéolaires



* indique une différence significative avec le témoin (**p<0.01 ; ***p<0.005)

In vitro, les macrophages alvéolaires issus d'un LBA peuvent donc être polarisés en M1 ou M2 en termes de production de cytokines et expression des transcrits spécifiques de ces deux états d'activation sans pour autant que les marqueurs membranaires choisis pour les identifier soient modifiés en cytométrie de flux.

II. DISCUSSION - CONCLUSION

En accord avec des travaux antérieurs (Clelland et al., 1993; Reynaud-Gaubert et al., 2002), nos résultats ont montré une proportion plus faible de macrophages et, bien qu'il ne soit pas significative, un pourcentage plus élevé de neutrophiles chez les patients avec un RAC. Cependant la proportion de lymphocytes en cas de RAC ne diffère pas des patients stables et reste dans les valeurs normales (Meyer et al., 2012), contrairement à celle observée dans d'autres études où elle augmentait (Clelland et al., 1993; Laan et al., 2003; Reynaud-Gaubert et al., 2002). Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par les différences de méthode de récupération et de préparation des LBA (notamment dans certains centres la fraction bronchique est séparée de la fraction alvéolaire) qui pourrait jouer sur les populations cellulaires. Par ailleurs, la technique de LBA est connue pour être peu reproductible et sensible en transplantation pulmonaire (Clelland et al., 1993; Tikkanen et al., 2001).

Concernant le rejet aigu humoral, il n'existe aucune donnée dans la littérature sur les populations cellulaires du lavage bronchiolo-alvéolaire. Nos données indiquent des résultats similaires au rejet aigu cellulaire mais le faible effectif dans le groupe rejet aigu humoral limite la portée de ce résultat.

Dans cette étude, notre objectif était d'explorer le profil des éléments cellulaires du LBA dans les rejets aigus en transplantation pulmonaire. Nous avons pour cela constitué, initialement, des groupes de patients en s'appuyant sur les données histologiques (rejet aigu prouvé histologiquement). Par conséquent, la présence ou non d'une infection n'a pas été prise en compte constituant un éventuel facteur de confusion. En excluant les patients infectés, l'augmentation du pourcentage des neutrophiles n'est plus significative.

En résumé, la répartition des différentes populations cellulaires des lavages bronchiolo-alvéolaires ne permet pas de différencier un rejet aigu.

A notre connaissance, ce travail constitue une première tentative d'immunophénotypage des macrophages alvéolaires chez les transplantés pulmonaires. Cette étude explore la polarisation des macrophages alvéolaires suivant l'évolution du greffon en utilisant des

marqueurs membranaires. Aucune différence d'état de polarisation des macrophages entre les patients avec et sans rejet n'a été détectée mais le manque de spécificité des marqueurs membranaires ne permet pas de conclure. Le HLA-DR est fortement exprimé par les macrophages M1 induit par le LPS (Junliang Ma et al., 2010; Ohri et al., 2011; Wang et al., 2014). De même, le CD206, récepteur au mannose de type-1, a été suggéré initialement comme marqueur de macrophages M2 du fait de l'augmentation de son expression sur les macrophages traité par l'IL-4 et de la baisse de son expression avec le LPS et INF- γ (Martinez et al., 2006; Martinez-Pomares et al., 2003; Stein et al., 1992). Ces théories ont été remises en cause récemment par des travaux sur les marqueurs de surface des différents types de macrophages pulmonaires humains. En effet dans ces travaux, les auteurs ont montré que HLA-DR et CD206 sont exprimés par tous les types de macrophages pulmonaires (Bharat et al., 2016; Yu et al., 2016). Ces marqueurs seraient donc des marqueurs ubiquistes des macrophages, ce qui pourrait expliquer aussi le fort pourcentage de nos macrophages alvéolaires exprimant à la fois HLA-DR et CD206.

In vitro, nous avons démontré qu'il était possible de polariser les macrophages obtenus par lavage alvéolaire en présence de LPS ou d'IL-4. Par contre, le niveau d'expression des marqueurs membranaires HLA-DR et CD206 n'était pas modulé ce qui vient conforter l'absence de spécificité de ces marqueurs. L'absence de modulation de ces marqueurs membranaires aurait pu être liée à un temps d'incubation trop court pour permettre une modulation mesurable. Pour répondre à cette question, nous avons effectué une étude pilote de cinétique d'expression de ces marqueurs à J0, J2, J3, J4 et J5. Nos résultats n'étaient malheureusement pas concluants (une seule préparation de macrophages a été maintenue en vie jusqu'au 5^{ème} jour et ne montre pas de modulation. Dans les autres cultures, la survie des cellules n'a guère dépassé deux jours).

Malgré ces résultats cette étude nous a permis de rendre compte du manque de spécificité des marqueurs membranaires M1/M2 utilisés dans la littérature, et de l'intérêt d'identifier des marqueurs appropriés et utilisables en cytométrie de flux pour avancer sur la thématique de la polarisation des macrophages du LBA.

BIBLIOGRAPHIES

- Abrial, C., Grassin-Delyle, S., Salvator, H., Brolo, M., Naline, E., and Devillier, P. (2015). 15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 4319–4330.
- Adamson, I.Y., and Bowden, D.H. (1980). Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages II. Kinetic studies after carbon loading. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *42*, 518–524.
- Agence de la biomedecine (2010). Recommandations pour le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes ou greffés.
- Akashi, S., Sho, M., Kashizuka, H., Hamada, K., Ikeda, N., Kuzumoto, Y., Tsurui, Y., Nomi, T., Mizuno, T., Kanehiro, H., et al. (2005). A novel small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* *80*, 378–384.
- Ambarus, C.A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T.R.D.J., Reedquist, K.A., Tak, P.P., and Baeten, D.L.P. (2012). Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods* *375*, 196–206.
- Angaswamy, N., Saini, D., Ramachandran, S., Nath, D.S., Phelan, D., Hachem, R., Trulock, E., Patterson, G.A., and Mohanakumar, T. (2010). Development of antibodies to human leukocyte antigen precedes development of antibodies to major histocompatibility class I-related chain A and are significantly associated with development of chronic rejection after human lung transplantation. *Hum. Immunol.* *71*, 560–565.
- Astor, T.L., Weill, D., Cool, C., Teitelbaum, I., Schwarz, M.I., and Zamora, M.R. (2005). Pulmonary capillaritis in lung transplant recipients: treatment and effect on allograft function. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *24*, 2091–2097.
- Astor, T.L., Galantowicz, M., Phillips, A., Palafox, J., and Baker, P. (2009). Pulmonary capillaritis as a manifestation of acute humoral allograft rejection following infant lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *9*, 409–412.
- Azimzadeh, A., Zorn, G.L., Blair, K.S.A., Zhang, J.P., Pfeiffer, S., Harrison, R.A., Cozzi, E., White, D.J.G., and Pierson, R.N. (2003). Hyperacute lung rejection in the pig-to-human model. 2. Synergy between soluble and membrane complement inhibition. *Xenotransplantation* *10*, 120–131.
- Bachelet, T., Couzi, L., Lepreux, S., Legeret, M., Pariscoat, G., Guidicelli, G., Merville, P., and Taupin, J.-L. (2013). Kidney intragraft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *13*, 2855–2864.
- Bachelet, T., Martinez, C., Del Bello, A., Couzi, L., Kejji, S., Guidicelli, G., Lepreux, S., Visentin, J., Congy-Jolivet, N., Rostaing, L., et al. (2015). Deleterious Impact of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Toward HLA-Cw and HLA-DP in Kidney Transplantation. *Transplantation*.

- Badesch, D.B., Zamora, M., Fullerton, D., Weill, D., Tuder, R., Grover, F., and Schwarz, M.I. (1998). Pulmonary capillaritis: a possible histologic form of acute pulmonary allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 17, 415–422.
- Batal, I., Girnita, A., Zeevi, A., Saab, B.A., Stockhausen, S., Shapiro, R., Basu, A., Tan, H., Morgan, C., and Randhawa, P. (2008). Clinical significance of the distribution of C4d deposits in different anatomic compartments of the allograft kidney. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 21, 1490–1498.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., Lynch, J.P., Zisman, D.A., Xue, Y.Y., Li, K., Ardehali, A., Ross, D.J., and Strieter, R.M. (2003). Role of CXCL9/CXCR3 Chemokine Biology during Pathogenesis of Acute Lung Allograft Rejection. *J. Immunol.* 171, 4844–4852.
- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.-L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 3733–3739.
- Bentall, A., Tyan, D.B., Sequeira, F., Everly, M.J., Gandhi, M.J., Cornell, L.D., Li, H., Henderson, N.A., Raghavaiah, S., Winters, J.L., et al. (2014). Antibody-mediated rejection despite inhibition of terminal complement. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 27, 1235–1243.
- Berry, G., Burke, M., Andersen, C., Angelini, A., Bruneval, P., Calabrese, F., Calbrese, F., Fishbein, M.C., Goddard, M., Leone, O., et al. (2013a). Pathology of pulmonary antibody-mediated rejection: 2012 update from the Pathology Council of the ISHLT. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 32, 14–21.
- Berry, G.J., Burke, M.M., Andersen, C., Bruneval, P., Fedrigo, M., Fishbein, M.C., Goddard, M., Hammond, E.H., Leone, O., Marboe, C., et al. (2013b). 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. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 32, 1147–1162.
- Beyer, M., Mallmann, M.R., Xue, J., Staratschek-Jox, A., Vorholt, D., Krebs, W., Sommer, D., Sander, J., Mertens, C., Nino-Castro, A., et al. (2012). High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. *PLoS ONE* 7.
- Bharat, A., Bhorade, S.M., Morales-Nebreda, L., McQuattie-Pimentel, A.C., Soberanes, S., Ridge, K., DeCamp, M.M., Mestan, K.K., Perlman, H., Budinger, G.R.S., et al. (2016). Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54, 147–149.
- Bitterman, P.B., Saltzman, L.E., Adelberg, S., Ferrans, V.J., and Crystal, R.G. (1984). Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. *J. Clin. Invest.* 74, 460–469.
- Bittner, H.B., Dunitz, J., Hertz, M., Bolman, M.R., and Park, S.J. (2001). Hyperacute rejection in single lung transplantation--case report of successful management by means of plasmapheresis and antithymocyte globulin treatment. *Transplantation* 71, 649–651.

- Bocrie, O., Hussein Aly, A.A., Guignier, F., Funes de la Vega, M., Rifle, G., Mousson, C., and Martin, L. (2007). Distribution of donor-specific antibodies in the cortex and the medulla of renal transplants with chronic allograft nephropathy. *Transpl. Immunol.* *17*, 227–229.
- Bordron, A., Révélen, R., D'Arbonne, F., Dueymes, M., Renaudineau, Y., Jamin, C., and Youinou, P. (2001). Functional heterogeneity of anti-endothelial cell antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* *124*, 492–501.
- Borthwick, L.A., Corris, P.A., Mahida, R., Walker, A., Gardner, A., Suwara, M., Johnson, G.E., Moisey, E.J., Brodly, M., Ward, C., et al. (2013). TNF α from classically activated macrophages accentuates epithelial to mesenchymal transition in obliterative bronchiolitis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *13*, 621–633.
- Brugière, O., Suberbielle, C., Thabut, G., Lhuillier, E., Dauriat, G., Metivier, A.-C., Gautreau, C., Charron, D., Mal, H., Parquin, F., et al. (2013). Lung transplantation in patients with pretransplantation donor-specific antibodies detected by Luminex assay. *Transplantation* *95*, 761–765.
- Budding, K., van de Graaf, E.A., and Otten, H.G. (2014). Humoral immunity and complement effector mechanisms after lung transplantation. *Transpl. Immunol.* *31*, 260–265.
- Buenestado, A., Grassin-Delyle, S., Guitard, F., Naline, E., Faisy, C., Israël-Biet, D., Sage, E., Bellamy, J., Tenor, H., and Devillier, P. (2012). Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF- α from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 1877–1890.
- Burlingham, W.J., Love, R.B., Jankowska-Gan, E., Haynes, L.D., Xu, Q., Bobadilla, J.L., Meyer, K.C., Hayney, M.S., Braun, R.K., Greenspan, D.S., et al. (2007). IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J. Clin. Invest.* *117*, 3498–3506.
- Burton, C.M., Andersen, C.B., Jensen, A.S., Iversen, M., Milman, N., Boesgaard, S., Arendrup, H., Eliassen, K., and Carlsen, J. (2006). The incidence of acute cellular rejection after lung transplantation: a comparative study of anti-thymocyte globulin and daclizumab. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *25*, 638–647.
- Burton, C.M., Iversen, M., Scheike, T., Carlsen, J., and Andersen, C.B. (2008). Minimal acute cellular rejection remains prevalent up to 2 years after lung transplantation: a retrospective analysis of 2697 transbronchial biopsies. *Transplantation* *85*, 547–553.
- Chamberlain, D., Maurer, J., Chaparro, C., and Idolor, L. (1994). Evaluation of transbronchial lung biopsy specimens in the diagnosis of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *13*, 963–971.
- Chana, K.K., Fenwick, P.S., Nicholson, A.G., Barnes, P.J., and Donnelly, L.E. (2014). Identification of a distinct glucocorticosteroid-insensitive pulmonary macrophage phenotype in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *133*, 207–216.e11.

Chen, F., Chibana, N., Kanematsu, A., Takakura, S., Yurugi, K., Hishida, R., Fukatsu, A., Kubo, T., Shoji, T., Fujinaga, T., et al. (2012). Antibody-mediated rejection of a unilateral donor lung in bilateral living-donor lobar lung transplantation: report of a case. *Surg. Today* 42, 808–811.

Choi, J.K., Kearns, J., Palevsky, H.I., Montone, K.T., Kaiser, L.R., Zmijewski, C.M., and Tomaszewski, J.E. (1999). Hyperacute Rejection of a Pulmonary Allograft. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1015–1018.

Christie, J.D., Carby, M., Bag, R., Corris, P., Hertz, M., Weill, D., and ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction (2005a). Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part II: definition. A consensus statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 24, 1454–1459.

Christie, J.D., Sager, J.S., Kimmel, S.E., Ahya, V.N., Gaughan, C., Blumenthal, N.P., and Kotloff, R.M. (2005b). Impact of primary graft failure on outcomes following lung transplantation. *Chest* 127, 161–165.

Christie, J.D., Van Raemdonck, D., de Perrot, M., Barr, M., Keshavjee, S., Arcasoy, S., Orens, J., and ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction (2005c). Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part I: introduction and methods. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 24, 1451–1453.

Christie, J.D., Kotloff, R.M., Ahya, V.N., Tino, G., Pochettino, A., Gaughan, C., DeMissie, E., and Kimmel, S.E. (2005d). The effect of primary graft dysfunction on survival after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 1312–1316.

Clelland, C., Higenbottam, T., Stewart, S., Otulana, B., Wreghitt, T., Gray, J., Scott, J., and Wallwork, J. (1993). Bronchoalveolar lavage and transbronchial lung biopsy during acute rejection and infection in heart-lung transplant patients. Studies of cell counts, lymphocyte phenotypes, and expression of HLA-DR and interleukin-2 receptor. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147, 1386–1392.

Cohen, D., Buurma, A., Goemaere, N.N., Girardi, G., le Cessie, S., Scherjon, S., Bloemenkamp, K.W.M., de Heer, E., Bruijn, J.A., and Bajema, I.M. (2011). Classical complement activation as a footprint for murine and human antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J. Pathol.* 225, 502–511.

Cohen, D., Colvin, R.B., Daha, M.R., Drachenberg, C.B., Haas, M., Nickeleit, V., Salmon, J.E., Sis, B., Zhao, M.-H., Bruijn, J.A., et al. (2012). Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int.* 81, 628–639.

Colombat, M., Castier, Y., Lesèche, G., Rufat, P., Mal, H., Thabut, G., Fournier, M., Groussard, O., Degott, C., and Couvelard, A. (2004). Early expression of adhesion molecules after lung transplantation: evidence for a role of aggregated P-selectin-positive platelets in human primary graft failure. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 23, 1087–1092.

- Colombat, M., Holifanjaniaina, S., Hirschi, S., Mal, H., and Stern, M. (2014). Histologic Reconstruction of Bronchiolar Lesions in Lung Transplant Patients With Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.*
- Colvin, R.B. (2007). Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 1046–1056.
- Colvin, R.B., and Smith, R.N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 807–817.
- Cook, H.T. (2015). C4d Staining in the Diagnosis of C3 Glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.*
- Cooper, D.K. (1969). Transplantation of the heart and both lungs. I. Historical review. *Thorax* 24, 383–390.
- Cooper, J.D., Billingham, M., Egan, T., Hertz, M.I., Higenbottam, T., Lynch, J., Mauer, J., Paradis, I., Patterson, G.A., and Smith, C. (1993). A working formulation for the standardization of nomenclature and for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts. International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 12, 713–716.
- Covarrubias, M., Ware, L.B., Kawut, S.M., De Andrade, J., Milstone, A., Weinacker, A., Orens, J., Lama, V., Wille, K., Bellamy, S., et al. (2007). Plasma intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 2573–2578.
- Daud, S.A., Yusen, R.D., Meyers, B.F., Chakinala, M.M., Walter, M.J., Aloush, A.A., Patterson, G.A., Trulock, E.P., and Hachem, R.R. (2007). Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 507–513.
- Dausset, J. (1958). Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* 20, 156–166.
- DeNicola, M.M., Weigt, S.S., Belperio, J.A., Reed, E.F., Ross, D.J., and Wallace, W.D. (2013). Pathologic findings in lung allografts with anti-HLA antibodies. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 32, 326–332.
- Dheda, S., Chong, S., Lucy, R., Wong, G., and Hon, W. (2013). Detection of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation and the Management of Highly Sensitised Kidney Transplant Recipients. In *Current Issues and Future Direction in Kidney Transplantation*, T. Rath, ed. (InTech), p.
- Diamond, J.M., Lee, J.C., Kawut, S.M., Shah, R.J., Localio, A.R., Bellamy, S.L., Lederer, D.J., Cantu, E., Kohl, B.A., Lama, V.N., et al. (2013). Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 527–534.
- Ding, J.W., Zhou, T., Ma, L., Yin, D., Shen, J., Ding, C.P.Y., Tang, I.Y., Byrne, G.W., and Chong, A.S. (2008). Expression of complement regulatory proteins in accommodated xenografts

induced by anti-alpha-Gal IgG1 in a rat-to-mouse model. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *8*, 32–40.

Dragun, D., Catar, R., Kusch, A., Heidecke, H., and Philippe, A. (2012). Non-HLA-antibodies targeting Angiotensin type 1 receptor and antibody mediated rejection. *Hum. Immunol.* *73*, 1282–1286.

Dutau, H., Vandemoortele, T., Laroumagne, S., Gomez, C., Boussaud, V., Cavailles, A., Cellerin, L., Colchen, A., Degot, T., Gonin, F., et al. (2014). A new endoscopic standardized grading system for macroscopic central airway complications following lung transplantation: the MDS classification. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* *45*, e33–e38.

Endo, T., Ogushi, F., Kawano, T., and Sone, S. (1998). Comparison of the Regulations by Th2-type Cytokines of the Arachidonic-Acid Metabolic Pathway in Human Alveolar Macrophages and Monocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *19*, 300–307.

Espinosa, M., Ortega, R., Gómez-Carrasco, J.M., López-Rubio, F., López-Andreu, M., López-Oliva, M.O., and Aljama, P. (2009). Mesangial C4d deposition: a new prognostic factor in IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* *24*, 886–891.

Espinosa, M., Ortega, R., Sánchez, M., Segarra, A., Salcedo, M.T., González, F., Camacho, R., Valdivia, M.A., Cabrera, R., López, K., et al. (2014). Association of C4d Deposition with Clinical Outcomes in IgA Nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN.*

Estenne, M., Maurer, J.R., Bohler, A., Egan, J.J., Frost, A., Hertz, M., Mallory, G.B., Snell, G.I., and Yousem, S. (2002). Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *21*, 297–310.

Evans, M.J., Shami, S.G., and Martinez, L.A. (1986). Enhanced proliferation of pulmonary alveolar macrophages after carbon instillation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *54*, 154–159.

Everly, M.J., Rebellato, L.M., Haisch, C.E., Briley, K.P., Bolin, P., Kendrick, W.T., Kendrick, S.A., Morgan, C., Maldonado, A.Q., Harland, R.C., et al. (2014). Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. *Transplantation* *97*, 494–501.

Fadel, E., de Perrot, M., Pierre, A., Waddell, T., Chaparro, C., Hutcheon, M., Singer, L., and Keshavjee, S. (2008). 131: Factors Affecting Airway Complications after Lung Transplantation: A Single-Center Experience of 460 Patients. *J. Heart Lung Transplant.* *27*, S106–S107.

Fedrigo, M., Feltrin, G., Poli, F., Frigo, A.C., Benazzi, E., Gambino, A., Tona, F., Caforio, A.L.P., Castellani, C., Toscano, G., et al. (2013). Intravascular macrophages in cardiac allograft biopsies for diagnosis of early and late antibody-mediated rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *32*, 404–409.

Fenton, M.J., Buras, J.A., and Donnelly, R.P. (1992). IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. *J. Immunol.* *149*, 1283–1288.

Fiser, S.M., Tribble, C.G., Long, S.M., Kaza, A.K., Kern, J.A., Jones, D.R., Robbins, M.K., and Kron, I.L. (2002). Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann. Thorac. Surg.* 73, 1041-1047-1048.

Fishbein, G.A., and Fishbein, M.C. (2012). Morphologic and immunohistochemical findings in antibody-mediated rejection of the cardiac allograft. *Hum. Immunol.* 73, 1213–1217.

Fredrich, R., Toyoda, M., Czer, L.S., Galfayan, K., Galera, O., Trento, A., Freimark, D., Young, S., and Jordan, S.C. (1999). The clinical significance of antibodies to human vascular endothelial cells after cardiac transplantation. *Transplantation* 67, 385–391.

Frost, A.E., Jammal, C.T., and Cagle, P.T. (1996). Hyperacute rejection following lung transplantation. *Chest* 110, 559–562.

Gashouta, M.A., Merlo, C.A., Pipeling, M.R., McDyer, J.F., Hayanga, J.W.A., Orens, J.B., and Girgis, R.E. (2014). Serial monitoring of exhaled nitric oxide in lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.*

Giral, M., Foucher, Y., Dufay, A., Van Huyen, J.P.D., Renaudin, K., Moreau, A., Philippe, A., Hegner, B., Dechend, R., Heidecke, H., et al. (2013). Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 13, 2567–2576.

Girlanda, R., Kleiner, D.E., Duan, Z., Ford, E.A.S., Wright, E.C., Mannon, R.B., and Kirk, A.D. (2008). Monocyte Infiltration and Kidney Allograft Dysfunction During Acute Rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 8, 600.

Girnita, A.L., McCurry, K.R., Iacono, A.T., Duquesnoy, R., Corcoran, T.E., Awad, M., Spichty, K.J., Yousem, S.A., Burckart, G., Dauber, J.H., et al. (2004). HLA-specific antibodies are associated with high-grade and persistent-recurrent lung allograft acute rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 23, 1135–1141.

Girnita, A.L., Duquesnoy, R., Yousem, S.A., Iacono, A.T., Corcoran, T.E., Buzoianu, M., Johnson, B., Spichty, K.J., Dauber, J.H., Burckart, G., et al. (2005). HLA-specific antibodies are risk factors for lymphocytic bronchiolitis and chronic lung allograft dysfunction. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 131–138.

Girnita, A.L., Lee, T.M., McCurry, K.R., Baldwin, W.M., 3rd, Yousem, S.A., Detrick, B., Pilewski, J., Toyoda, Y., Jelinek, L., Lomago, J., et al. (2008). Anti-human leukocyte antigen antibodies, vascular C4d deposition and increased soluble c4d in broncho-alveolar lavage of lung allografts. *Transplantation* 86, 342–347.

Glanville, A.R. (2010). Antibody-mediated rejection in lung transplantation: myth or reality? *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 29, 395–400.

Glanville, A.R. (2013). Antibody-mediated rejection in lung transplantation: turning myth into reality. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 32, 12–13.

- Glanville, A.R., Aboyoun, C.L., Havryk, A., Plit, M., Rainer, S., and Malouf, M.A. (2008). Severity of lymphocytic bronchiolitis predicts long-term outcome after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *177*, 1033–1040.
- Golde, D.W., Byers, L.A., and Finley, T.N. (1974). Proliferative Capacity of Human Alveolar Macrophage. *Nature* *247*, 373–375.
- Golshayan, D., Buhler, L., Lechler, R.I., and Pascual, M. (2007). From current immunosuppressive strategies to clinical tolerance of allografts. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *20*, 12–24.
- González-Stawinski, G.V., Tan, C.D., Smedira, N.G., Starling, R.C., and Rodríguez, E.R. (2008). Decay-accelerating factor expression may provide immunoprotection against antibody-mediated cardiac allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *27*, 357–361.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 23–35.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 953–964.
- Gorer, P.A. (1936). The Detection of Antigenic Differences in Mouse Erythrocytes by the Employment of Immune Sera. *Br. J. Exp. Pathol.* *17*, 42–50.
- Grandaliano, G., Gesualdo, L., Ranieri, E., Monno, R., Stallone, G., and Schena, F.P. (1997). Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation* *63*, 414–420.
- Green, M., and Avery, R.K. (2004). Guidelines for the prevention and management of infectious complications of solid organ transplantation. *Am. J. Transplant.* *4*, 6–9.
- Grenzi, P.C., de Marco, R., Silva, R.Z.R., Campos, É.F., and Gerbase-DeLima, M. (2013). Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay. *Hum. Immunol.* *74*, 1300–1303.
- Haas, M., Montgomery, R.A., Segev, D.L., Rahman, M.H., Racusen, L.C., Bagnasco, S.M., Simpkins, C.E., Warren, D.S., Lepley, D., Zachary, A.A., et al. (2007). Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *7*, 576–585.
- Haas, M., Sis, B., Racusen, L.C., Solez, K., Glotz, D., Colvin, R.B., Castro, M.C.R., David, D.S.R., David-Neto, E., Bagnasco, S.M., et al. (2014). Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *14*, 272–283.
- Hachem, R.R., Yusen, R.D., Chakinala, M.M., Meyers, B.F., Lynch, J.P., Aloush, A.A., Patterson, G.A., and Trulock, E.P. (2007). A randomized controlled trial of tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *26*, 1012–1018.

- Hachem, R.R., Meyers, B.F., Yusen, R.D., Patterson, A., and Trulock, E.P. (2008). 132: Airway Complications after Lung Transplantation: Incidence and Risk Factors in a Contemporary Series. *J. Heart Lung Transplant.* 27, S107.
- Hachem, R.R., Yusen, R.D., Meyers, B.F., Aloush, A.A., Mohanakumar, T., Patterson, G.A., and Trulock, E.P. (2010). Anti-human leukocyte antigen antibodies and preemptive antibody-directed therapy after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 29, 973–980.
- Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 351, 2715–2729.
- Hancock, W.W., Wang, L., Ye, Q., Han, R., and Lee, I. (2003). Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 479–486.
- Hankey, K.G., Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Klassen, D.K., Philosophe, B., Bartlett, S.T., Groh, V., Spies, T., and Mann, D.L. (2002). MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation* 73, 304–306.
- Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Jr., Walker GR, and Jr. (1963). Lung homotransplantation in man: Report of the initial case. *JAMA* 186, 1065–1074.
- Hartwig, M.G., Appel, J.Z., and Davis, R.D. (2005). Antireflux surgery in the setting of lung transplantation: strategies for treating gastroesophageal reflux disease in a high-risk population. *Thorac. Surg. Clin.* 15, 417–427.
- Hedrick, J.A., Helms, A., Vicari, A., and Zlotnik, A. (1998). Characterization of a Novel CC Chemokine, HCC-4, Whose Expression Is Increased by Interleukin-10. *Blood* 91, 4242–4247.
- Heemann, U.W., Tullius, S.G., Tamatami, T., Miyasaka, M., Milford, E., and Tilney, N.L. (1994). Infiltration patterns of macrophages and lymphocytes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 7, 349–355.
- Hegde, S., Mellon, J.K., Hargrave, S.L., and Niederkorn, J.Y. (2002). Effect of alloantibodies on corneal allograft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1012–1018.
- Hidalgo, L.G., Sis, B., Sellares, J., Campbell, P.M., Mengel, M., Einecke, G., Chang, J., and Halloran, P.F. (2010). 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. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 10, 1812–1822.
- Hirohashi, T., Chase, C.M., Pelle, P.D., Sebastian, D., Alessandrini, A., Madsen, J.C., Russell, P.S., and Colvin, R.B. (2012). A Novel Pathway of Chronic Allograft Rejection Mediated by NK Cells and Alloantibody. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 313–321.

- Hoffmann, U., Bergler, T., Segerer, S., Rümmele, P., Krüger, B., Banas, M.C., Reinhold, S., Banas, B., and Krämer, B.K. (2010). Impact of chemokine receptor CX3CR1 in human renal allograft rejection. *Transpl. Immunol.* *23*, 204–208.
- Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Kawanami, O., Ferrans, V.J., and Crystal, R.G. (1979). Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.* *97*, 149–206.
- Ionescu, D.N., Girnita, A.L., Zeevi, A., Duquesnoy, R., Pilewski, J., Johnson, B., Studer, S., McCurry, K.R., and Yousem, S.A. (2005). C4d deposition in lung allografts is associated with circulating anti-HLA alloantibody. *Transpl. Immunol.* *15*, 63–68.
- Ismail, A.M., Badawi, R.M., El-Agroudy, A.E., and Mansour, M.A. (2009). Pretransplant detection of anti-endothelial cell antibodies could predict renal allograft outcome. *Exp. Clin. Transplant. Off. J. Middle East Soc. Organ Transplant.* *7*, 104–109.
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* *281*, 51–61.
- Jose, M.D., Ikezumi, Y., van Rooijen, N., Atkins, R.C., and Chadban, S.J. (2003). Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation* *76*, 1015–1022.
- Junliang Ma, Liu, L., Che, G., Yu, N., Dai, F., and You, Z. (2010). The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* *10*, 112.
- Kaku, Y., Imaoka, H., Morimatsu, Y., Komohara, Y., Ohnishi, K., Oda, H., Takenaka, S., Matsuoka, M., Kawayama, T., Takeya, M., et al. (2014). Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on Alveolar Macrophages in the Lungs of Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE* *9*.
- Kakuta, Y., Okumi, M., Miyagawa, S., Tsutahara, K., Abe, T., Yazawa, K., Matsunami, K., Otsuka, H., Takahara, S., and Nonomura, N. (2012). Blocking of CCR5 and CXCR3 Suppresses the Infiltration of Macrophages in Acute Renal Allograft Rejection: *Transplantation* *93*, 24–31.
- Kauke, T., Kneidinger, N., Martin, B., Dick, A., Schneider, C., Schramm, R., Meimarakis, G., Preissler, G., Eickelberg, O., von Dossow, V., et al. (2015). Bronchiolitis obliterans syndrome due to donor-specific HLA-antibodies. *Tissue Antigens* *86*, 178–185.
- Kfoury, A.G., Hammond, M.E.H., Snow, G.L., Drakos, S.G., Stehlik, J., Fisher, P.W., Reid, B.B., Everitt, M.D., Bader, F.M., and Renlund, D.G. (2009). Cardiovascular mortality among heart transplant recipients with asymptomatic antibody-mediated or stable mixed cellular and antibody-mediated rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *28*, 781–784.

- Kim, E.N., Yoon, B.H., Lee, J.Y., Hwang, D., Kim, K.C., Lee, J., Shim, J.-Y., and Kim, C.J. (2015). Placental C4d deposition is a feature of defective placentation: observations in cases of preeclampsia and miscarriage. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 466, 717–725.
- Kim, M., Martin, S.T., Townsend, K.R., and Gabardi, S. (2014). Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacotherapy* 34, 733–744.
- King, B.J., Iyer, H., Leidi, A.A., and Carby, M.R. (2009). Gastroesophageal reflux in bronchiolitis obliterans syndrome: a new perspective. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 28, 870–875.
- Kirby, J.A., Givan, A.L., Shenton, B.K., Talbot, D., Forsythe, J.L., Lennard, T.W., Proud, G., and Taylor, R.M. (1990). Renal allograft rejection. Possible involvement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transplantation* 50, 225–229.
- Kissmeyer-Nielsen, F., Olsen, S., Petersen, V.P., and Fjeldborg, O. (1966). Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 2, 662–665.
- Knoop, C., and Estenne, M. (2006). Acute and chronic rejection after lung transplantation. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 27, 521–533.
- Kobashigawa, J., Crespo-Leiro, M.G., Ensminger, S.M., Reichenspurner, H., Angelini, A., Berry, G., Burke, M., Czer, L., Hiemann, N., Kfoury, A.G., et al. (2011). Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transpl.* 30, 252–269.
- Koning, N., van Eijk, M., Pouwels, W., Brouwer, M.S.M., Voehringer, D., Huitinga, I., Hoek, R.M., Raes, G., and Hamann, J. (2010). Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. *J. Innate Immun.* 2, 195–200.
- Kosmoliaptsis, V., Bradley, J.A., Peacock, S., Chaudhry, A.N., and Taylor, C.J. (2009). Detection of Immunoglobulin G Human Leukocyte Antigen-Specific Alloantibodies in Renal Transplant Patients Using Single-Antigen-Beads is Compromised by the Presence of Immunoglobulin M Human Leukocyte Antigen-Specific Alloantibodies: *Transplantation* 87, 813–820.
- Kosmoliaptsis, V., O'Rourke, C., Bradley, J.A., and Taylor, C.J. (2010). Improved Luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum. Immunol.* 71, 45–49.
- Kumar, D., Husain, S., Chen, M.H., Moussa, G., Himsworth, D., Manuel, O., Studer, S., Pakstis, D., McCurry, K., Doucette, K., et al. (2010). A Prospective Molecular Surveillance Study Evaluating the Clinical Impact of Community-Acquired Respiratory Viruses in Lung Transplant Recipients: *Transplantation* 89, 1028–1033.
- Laan, M., Lindén, A., and Riise, G.C. (2003). IL-16 in the airways of lung allograft recipients with acute rejection or obliterative bronchiolitis. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 290–296.

Lachmann, N., Todorova, K., Schulze, H., and Schönemann, C. (2013). Luminex® and Its Applications for Solid Organ Transplantation, Hematopoietic Stem Cell Transplantation, and Transfusion *. *Transfus. Med. Hemotherapy* 40, 182–189.

Lan, H.Y. (2008). Role of macrophage migration inhibition factor in kidney disease. *Nephron Exp. Nephrol.* 109, e79-83.

Landsman, L., and Jung, S. (2007). Lung Macrophages Serve as Obligatory Intermediate between Blood Monocytes and Alveolar Macrophages. *J. Immunol.* 179, 3488–3494.

Lau, C.L., Palmer, S.M., Posther, K.E., Howell, D.N., Reinsmoen, N.L., Massey, H.T., Tapson, V.F., Jagers, J.J., D'Amico, T.A., and Davis, R.D. (2000). Influence of panel-reactive antibodies on posttransplant outcomes in lung transplant recipients. *Ann. Thorac. Surg.* 69, 1520–1524.

Le Meur, Y., Tesch, G.H., Hill, P.A., Mu, W., Foti, R., Nikolic-Paterson, D.J., and Atkins, R.C. (2002). Macrophage accumulation at a site of renal inflammation is dependent on the M-CSF/c-fms pathway. *J. Leukoc. Biol.* 72, 530–537.

Lepin, E.J., Zhang, Q., Zhang, X., Jindra, P.T., Hong, L.S., Ayele, P., Peralta, M.V.P., Gjertson, D.W., Kobashigawa, J.A., Wallace, W.D., et al. (2006). Phosphorylated S6 Ribosomal Protein: A Novel Biomarker of Antibody-Mediated Rejection in Heart Allografts. *Am. J. Transplant.* 6, 1560–1571.

Lohmann-Matthes, M.L., Steinmuller, C., and Franke-Ullmann, G. (1994). Pulmonary macrophages. *Eur. Respir. J.* 7, 1678–1689.

Loupy, A., Suberbielle-Boissel, C., Hill, G.S., Lefaucheur, C., Anglicheau, D., Zuber, J., Martinez, F., Thervet, E., Méjean, A., Charron, D., et al. (2009). Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 2561–2570.

Loupy, A., Hill, G.S., Suberbielle, C., Charron, D., Anglicheau, D., Zuber, J., Timsit, M.O., Duong, J.P., Bruneval, P., Vernerey, D., et al. (2011). Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 11, 56–65.

Magil, A.B. (2005). Infiltrating cell types in transplant glomerulitis: relationship to peritubular capillary C4d deposition. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 45, 1084–1089.

Magil, A.B., and Tinckam, K. (2003). Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. *Kidney Int.* 63, 1888–1893.

Magro, C.M. (2003). Use of C4d as a diagnostic adjunct in lung allograft biopsies. *Am J Transpl.* 3, 1143–1154.

Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Allavena, P. (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol.* 22, 328–336.

- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J. Immunol.* *177*, 7303–7311.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *13*, 453–461.
- Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 451–483.
- Martinez, F.O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B.N., Draijer, C., Thomas, B., Fabbri, M., Crawshaw, A., Ho, L.P., et al. (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* *121*, e57–e69.
- Martinez-Pomares, L., Reid, D.M., Brown, G.D., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Linehan, S.A., Zamze, S., Gordon, S., and Wong, S.Y.C. (2003). Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 604–613.
- Martinu, T., Pavlisko, E.N., Chen, D.-F., and Palmer, S.M. (2011). Acute Allograft Rejection: Cellular and Humoral Processes. *Clin. Chest Med.* *32*, 295–310.
- Masetti, M., Potena, L., Nardoza, M., Prestinenzi, P., Taglieri, N., Saia, F., Pece, V., Magnani, G., Fallani, F., Coccolo, F., et al. (2013). Differential Effect of Everolimus on Progression of Early and Late Cardiac Allograft Vasculopathy in Current Clinical Practice. *Am. J. Transplant.* *13*, 1217–1226.
- McNeil, K., Glanville, A.R., Wahlers, T., Knoop, C., Speich, R., Mamelok, R.D., Maurer, J., Ives, J., and Corris, P.A. (2006). Comparison of mycophenolate mofetil and azathioprine for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome in de novo lung transplant recipients. *Transplantation* *81*, 998–1003.
- Ménoret, S., Plat, M., Blancho, G., Martinat-Botté, F., Bernard, P., Karam, G., Tesson, L., Renaudin, K., Guillouet, P., Weill, B., et al. (2004). Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. *Transplantation* *77*, 1468–1471.
- Meyer, K.C., Raghu, G., Baughman, R.P., Brown, K.K., Costabel, U., du Bois, R.M., Drent, M., Haslam, P.L., Kim, D.S., Nagai, S., et al. (2012). An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *185*, 1004–1014.

- Ming, Y., Hu, J., Luo, Q., Ding, X., Luo, W., Zhuang, Q., and Zou, Y. (2015). Acute Antibody-Mediated Rejection in Presence of MICA-DSA and Successful Renal Re-Transplant with Negative-MICA Virtual Crossmatch. *PLoS ONE* 10, e0127861.
- Moreno, I., Vicente, R., Ramos, F., Vicente, J.L., and Barberá, M. (2007). Determination of interleukin-6 in lung transplantation: association with primary graft dysfunction. *Transplant. Proc.* 39, 2425–2426.
- Morrell, M.R., Patterson, G.A., Trulock, E.P., and Hachem, R.R. (2009). Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 28, 96–100.
- Morrell, M.R., Pilewski, J.M., Gries, C.J., Pipeling, M.R., Crespo, M.M., Ensor, C.R., Yousem, S.A., D’Cunha, J., Shigemura, N., Bermudez, C.A., et al. (2014). De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 33, 1288–1294.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737.
- Neumann, J., Tarrasconi, H., Bortolotto, A., Machuca, T., Canabarro, R., Sporleder, H., Fernandes, S., Schio, S., Costa, C., Camargo, S., et al. (2010). Acute humoral rejection in a lung recipient: reversion with bortezomib. *Transplantation* 89, 125–126.
- Nizio, A., Superdock, K., Ramirez, C., John Swanson, S., Scantlebury, V., Gilibert, S., and Colombe, B. (2015). IGM Donor specific antibody is associated with antibody-mediated rejection in two adult kidney recipients in the absence of IgG HLA antibodies. *Hum. Immunol.* 76, *Supplement*, 67.
- Novak, M.L., and Koh, T.J. (2013). Macrophage phenotypes during tissue repair. *J. Leukoc. Biol.* 93, 875–881.
- Ofek, E., Sato, M., Saito, T., Wagnetz, U., Roberts, H.C., Chaparro, C., Waddell, T.K., Singer, L.G., Hutcheon, M.A., Keshavjee, S., et al. (2013). Restrictive allograft syndrome post lung transplantation is characterized by pleuroparenchymal fibroelastosis. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 26, 350–356.
- Ohri, C.M., Shikotra, A., Green, R.H., Waller, D.A., and Bradding, P. (2009). Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur. Respir. J.* 33, 118–126.
- Ohri, C.M., Shikotra, A., Green, R.H., Waller, D.A., and Bradding, P. (2011). The Tissue Microlocalisation and Cellular Expression of CD163, VEGF, HLA-DR, iNOS, and MRP 8/14 Is Correlated to Clinical Outcome in NSCLC. *PLoS ONE* 6.

- Opelz, G., and Collaborative Transplant Study (2005). Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 365, 1570–1576.
- Otten, H.G., van den Bosch, J.M.M., van Ginkel, W.G.J., van Loon, M., and van de Graaf, E.A. (2006). Identification of non-HLA target antigens recognized after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 25, 1425–1430.
- Oyaizu, T., Okada, Y., Shoji, W., Matsumura, Y., Shimada, K., Sado, T., Sato, M., and Kondo, T. (2003). Reduction of recipient macrophages by gadolinium chloride prevents development of obliterative airway disease in a rat model of heterotopic tracheal transplantation. *Transplantation* 76, 1214–1220.
- Pakhale, S.S., Hadjiliadis, D., Howell, D.N., Palmer, S.M., Gutierrez, C., Waddell, T.K., Chaparro, C., Davis, R.D., Keshavjee, S., Hutcheon, M.A., et al. (2005). Upper lobe fibrosis: a novel manifestation of chronic allograft dysfunction in lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 24, 1260–1268.
- Palmer, S.M., Davis, R.D., Hadjiliadis, D., Hertz, M.I., Howell, D.N., Ward, F.E., Savik, K., and Reinsmoen, N.L. (2002). Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 74, 799–804.
- Pannellini, T., Iezzi, M., Di Carlo, E., Eleuterio, E., Coletti, A., Modesti, A., Rosini, S., Neri, M., and Musiani, P. (2004). The expression of LEC/CCL16, a powerful inflammatory chemokine, is upregulated in ulcerative colitis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 17, 171–180.
- Paraskeva, M., Bailey, M., Levvey, B.J., Griffiths, A.P., Kotsimbos, T.C., Williams, T.P., Snell, G., and Westall, G. (2011). Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 11, 2190–2196.
- Patel, R., and Terasaki, P.I. (1969). Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 280, 735–739.
- Pechkovsky, D.V., Prasse, A., Kollert, F., Engel, K.M.Y., Dentler, J., Luttmann, W., Friedrich, K., Müller-Quernheim, J., and Zissel, G. (2010). Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis—mediator production and intracellular signal transduction. *Clin. Immunol.* 137, 89–101.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 123–128.
- de Perrot, M., Liu, M., Waddell, T.K., and Keshavjee, S. (2003). Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 490–511.
- Qi, F., Adair, A., Ferenbach, D., Vass, D.G., Mylonas, K.J., Kipari, T., Clay, M., Kluth, D.C., Hughes, J., and Marson, L.P. (2008). Depletion of cells of monocyte lineage prevents loss of renal microvasculature in murine kidney transplantation. *Transplantation* 86, 1267–1274.

Quantz, M.A., Bennett, L.E., Meyer, D.M., and Novick, R.J. (2000). Does human leukocyte antigen matching influence the outcome of lung transplantation? An analysis of 3,549 lung transplantations. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *19*, 473–479.

Racusen, L.C., Colvin, R.B., Solez, K., Mihatsch, M.J., Halloran, P.F., Campbell, P.M., Cecka, M.J., Cosyns, J.-P., Demetris, A.J., Fishbein, M.C., et al. (2003). Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *3*, 708–714.

Reitz, B.A., Wallwork, J.L., Hunt, S.A., Pennock, J.L., Billingham, M.E., Oyer, P.E., Stinson, E.B., and Shumway, N.E. (1982). Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N. Engl. J. Med.* *306*, 557–564.

Reynaud-Gaubert, M., Thomas, P., Gregoire, R., Badier, M., Cau, P., Sampol, J., Giudicelli, R., and Fuentes, P. (2002). Clinical utility of bronchoalveolar lavage cell phenotype analyses in the postoperative monitoring of lung transplant recipients. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* *21*, 60–66.

Roberts, J.A., Barrios, R., Cagle, P.T., Ge, Y., Takei, H., Haque, A.K., Burns, K.M., Land, G.A., Dilioglou, S., and Bernard, D.W. (2013). The Presence of Anti-HLA Donor-Specific Antibodies in Lung Allograft Recipients Does Not Correlate With C4d Immunofluorescence in Transbronchial Biopsy Specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med.*

Roza, A.M., Cooper, M., Pieper, G., Hilton, G., Dembny, K., Lai, C.S., Lindholm, P., Komorowski, R., Felix, C., Johnson, C., et al. (2000). NOX 100, A NITRIC OXIDE SCAVENGER, ENHANCES CARDIAC ALLOGRAFT SURVIVAL AND PROMOTES LONG-TERM GRAFT ACCEPTANCE 1. [Miscellaneous Article]. *Transplantation* *69*.

Safavi, S., Robinson, D.R., Soresi, S., Carby, M., and Smith, J.D. (2014). De novo donor HLA-specific antibodies predict development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.*

Salama, A.D., Delikouras, A., Pusey, C.D., Cook, H.T., Bhangal, G., Lechler, R.I., and Dorling, A. (2001). Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *1*, 260–269.

Salehi, S., and Reed, E.F. (2015). The divergent roles of macrophages in solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* *20*, 446–453.

Samaniego, M., Mezrich, J., Torrealba, J., Lorentzen, D., Schadde, E., Djamali, A., Zachariah, M., Sollinger, H., and Pirsch, J. (2006). C4d-positive acute antibody-mediated rejection due to anti-HLA-DP antibody: a tale of one patient and a review of the University of Wisconsin experience. *Clin. Transpl.* 503–507.

Santana, M.-J., Feeny, D., Jackson, K., Weinkauf, J., and Lien, D. (2009). Improvement in health-related quality of life after lung transplantation. *Can. Respir. J. J. Can. Thorac. Soc.* *16*, 153–158.

- Sato, M., and Keshavjee, S. (2008). Bronchiolitis obliterans syndrome: alloimmune-dependent and -independent injury with aberrant tissue remodeling. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *20*, 173–182.
- Sato, M., Waddell, T.K., Wagnetz, U., Roberts, H.C., Hwang, D.M., Haroon, A., Wagnetz, D., Chaparro, C., Singer, L.G., Hutcheon, M.A., et al. (2011). Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *30*, 735–742.
- Schmid, R.A., Boehler, A., Speich, R., Frey, H.R., Russi, E.W., and Weder, W. (1997). Bronchial anastomotic complications following lung transplantation: still a major cause of morbidity? *Eur. Respir. J.* *10*, 2872–2875.
- Schnaidt, M., Weinstock, C., Jurisic, M., Schmid-Horch, B., Ender, A., and Wernet, D. (2011). HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect: *Transplantation* *92*, 510–515.
- Schroder, K., Sweet, M.J., and Hume, D.A. (2006). Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* *211*, 511–524.
- Schwaiger, E., Wahrmann, M., Bond, G., Eskandary, F., and Böhmig, G.A. (2014). Complement component C3 activation: the leading cause of the prozone phenomenon affecting HLA antibody detection on single-antigen beads. *Transplantation* *97*, 1279–1285.
- Scornik, J.C., Zander, D.S., Baz, M.A., Donnelly, W.H., and Staples, E.D. (1999). SUSCEPTIBILITY OF LUNG TRANSPLANTS TO PREFORMED DONOR-SPECIFIC HLA ANTIBODIES AS DETECTED BY FLOW CYTOMETRY. [Miscellaneous Article]. *Transplantation* *68*, 1542–1546.
- Sellarés, J., Reeve, J., Loupy, A., Mengel, M., Sis, B., Skene, A., de Freitas, D.G., Kreepala, C., Hidalgo, L.G., Famulski, K.S., et al. (2013). Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *13*, 971–983.
- Servettaz, A., Guilpain, P., Tamas, N., Kaveri, S.V., Camoin, L., and Mouthon, L. (2008). Natural anti-endothelial cell antibodies. *Autoimmun. Rev.* *7*, 426–430.
- Sethi, S., Nasr, S.H., Vriese, A.S.D., and Fervenza, F.C. (2015). C4d as a Diagnostic Tool in Proliferative GN. *J. Am. Soc. Nephrol. ASN.2014040406*.
- Shamonki, J.M., Salmon, J.E., Hyjek, E., and Baergen, R.N. (2007). Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *196*, 167.e1-5.
- Sharples, L.D., McNeil, K., Stewart, S., and Wallwork, J. (2002). Risk factors for bronchiolitis obliterans: a systematic review of recent publications. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *21*, 271–281.

- Shaykhiev, R., Krause, A., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Harvey, B.-G., O'Connor, T.P., and Crystal, R.G. (2009). Smoking-dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of COPD. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 2867–2883.
- Sigdel, T.K., and Sarwal, M.M. (2013). Moving beyond HLA: a review of nHLA antibodies in organ transplantation. *Hum. Immunol.* *74*, 1486–1490.
- Sironi, M., Martinez, F.O., D'Ambrosio, D., Gattorno, M., Polentarutti, N., Locati, M., Gregorio, A., Iellem, A., Cassatella, M.A., Damme, J.V., et al. (2006). Differential regulation of chemokine production by Fcγ receptor engagement in human monocytes: association of CCL1 with a distinct form of M2 monocyte activation (M2b, Type 2). *J. Leukoc. Biol.* *80*, 342–349.
- Sis, B., Jhangri, G.S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B., and Halloran, P.F. (2009). Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *9*, 2312–2323.
- Song, E., Ouyang, N., Hörbelt, M., Antus, B., Wang, M., and Exton, M.S. (2000). Influence of Alternatively and Classically Activated Macrophages on Fibrogenic Activities of Human Fibroblasts. *Cell. Immunol.* *204*, 19–28.
- Stegall, M.D., Diwan, T., Raghavaiah, S., Cornell, L.D., Burns, J., Dean, P.G., Cosio, F.G., Gandhi, M.J., Kremers, W., and Gloor, J.M. (2011). Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *11*, 2405–2413.
- Stegall, M.D., Chedid, M.F., and Cornell, L.D. (2012). The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* *8*, 670–678.
- Stehlik, J., Edwards, L.B., Rowe, A., Philibin, K., Williamson, J., Kirklin, J.K., Taylor, D.O., and Hertz, M.I. (2013). ISHLT International Registry for Heart and Lung Transplantation - three decades of scientific contributions. *Transplant. Rev. Orlando Fla* *27*, 38–42.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* *176*, 287–292.
- Stewart, S., Winters, G.L., Fishbein, M.C., Tazelaar, H.D., Kobashigawa, J., Abrams, J., Andersen, C.B., Angelini, A., Berry, G.J., Burke, M.M., et al. (2005). Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *24*, 1710–1720.
- Stewart, S., Fishbein, M.C., Snell, G.I., Berry, G.J., Boehler, A., Burke, M.M., Glanville, A., Gould, F.K., Magro, C., Marboe, C.C., et al. (2007a). Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *26*, 1229–1242.

Stewart, S., Fishbein, M.C., Snell, G.I., Berry, G.J., Boehler, A., Burke, M.M., Glanville, A., Gould, F.K., Magro, C., Marboe, C.C., et al. (2007b). Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 26, 1229–1242.

Sumitran-Holgersson, S. (2008). Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 607–613.

Suneja, M., and Kuppachi, S. (2012). Acute antibody-mediated renal allograft rejection associated with HLA-Cw17 antibody. *Clin. Kidney J.* 5, 254–256.

Tait, B.D., Süsal, C., Gebel, H.M., Nickerson, P.W., Zachary, A.A., Claas, F.H.J., Reed, E.F., Bray, R.A., Campbell, P., Chapman, J.R., et al. (2013). Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 95, 19–47.

Takemoto, S.K., Zeevi, A., Feng, S., Colvin, R.B., Jordan, S., Kobashigawa, J., Kupiec-Weglinski, J., Matas, A., Montgomery, R.A., Nickerson, P., et al. (2004). National Conference to Assess Antibody-Mediated Rejection in Solid Organ Transplantation. *Am. J. Transplant.* 4, 1033–1041.

Tambur, A.R., Herrera, N.D., Haarberg, K.M.K., Cusick, M.F., Gordon, R.A., Leventhal, J.R., Friedewald, J.J., and Glotz, D. (2015). Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*

Tan, C.D., Sokos, G.G., Pidwell, D.J., Smedira, N.G., Gonzalez-Stawinski, G.V., Taylor, D.O., Starling, R.C., and Rodriguez, E.R. (2009). Correlation of donor-specific antibodies, complement and its regulators with graft dysfunction in cardiac antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 2075–2084.

Thaunat, O., Hanf, W., Dubois, V., McGregor, B., Perrat, G., Chauvet, C., Touraine, J.-L., and Morelon, E. (2009). Chronic humoral rejection mediated by anti-HLA-DP alloantibodies: insights into the role of epitope sharing in donor-specific and non-donor specific alloantibodies generation. *Transpl. Immunol.* 20, 209–211.

Tikkanen, J., Lemström, K., Halme, M., Pakkala, S., Taskinen, E., and Koskinen, P. (2001). Cytological monitoring of peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid, and transbronchial biopsy specimens during acute rejection and cytomegalovirus infection in lung and heart–lung allograft recipients. *Clin. Transplant.* 15, 77–88.

Tiriveedhi, V., Angaswamy, N., Brand, D., Weber, J., Gelman, A.G., Hachem, R., Trulock, E.P., Meyers, B., Patterson, G., and Mohanakumar, T. (2012). A shift in the collagen V antigenic epitope leads to T helper phenotype switch and immune response to self-antigen leading to chronic lung allograft rejection. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 158–168.

Todd, J.L., and Palmer, S.M. (2011). Bronchiolitis obliterans syndrome: the final frontier for lung transplantation. *Chest* 140, 502–508.

- Ungar, J., and Wilson, G.R. (1935). Monocytes as a Source of Alveolar Phagocytes. *Am. J. Pathol.* *11*, 681–692.5.
- Valenzuela, N.M., and Reed, E.F. (2013). Antibodies in Transplantation: The Effects of HLA and Non-HLA Antibody Binding and Mechanisms of Injury. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ *1034*.
- Vanaudenaerde, B.M., De Vleeschauwer, S.I., Vos, R., Meyts, I., Bullens, D.M., Reynders, V., Wuyts, W.A., Van Raemdonck, D.E., Dupont, L.J., and Verleden, G.M. (2008). The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *8*, 1911–1920.
- Venner, J.M., Hidalgo, L.G., Famulski, K.S., Chang, J., and Halloran, P.F. (2015). The Molecular Landscape of Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection: Evidence for NK Involvement Through CD16a Fc Receptors. *Am. J. Transplant.* *15*, 1336–1348.
- Verleden, G.M., Raghu, G., Meyer, K.C., Glanville, A.R., and Corris, P. (2014). A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *33*, 127–133.
- Villani, A.P., Chouvet, B., and Kanitakis, J. (2015). Application of C4d Immunohistochemistry on Routinely Processed Tissue Sections for the Diagnosis of Autoimmune Bullous Dermatoses. *Am. J. Dermatopathol.*
- Wallace, W.D., Reed, E.F., Ross, D., Lassman, C.R., and Fishbein, M.C. (2005). C4d staining of pulmonary allograft biopsies: an immunoperoxidase study. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *24*, 1565–1570.
- Wallace, W.D., Weigt, S.S., and Farver, C.F. (2014). Update on pathology of antibody-mediated rejection in the lung allograft. *Curr. Opin. Organ Transplant.* *19*, 303–308.
- Wang, H., Arp, J., Liu, W., Faas, S.J., Jiang, J., Gies, D.R., Ramcharran, S., Garcia, B., Zhong, R., and Rother, R.P. (2007). Inhibition of terminal complement components in presensitized transplant recipients prevents antibody-mediated rejection leading to long-term graft survival and accommodation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 4451–4463.
- Wang, H., Wang, X., Li, X., Fan, Y., Li, G., Guo, C., Zhu, F., Zhang, L., and Shi, Y. (2014). CD68(+)HLA-DR(+) M1-like macrophages promote motility of HCC cells via NF- κ B/FAK pathway. *Cancer Lett.* *345*, 91–99.
- Weinstock, C., and Schnaidt, M. (2013). The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int. J. Immunogenet.* *40*, 171–177.
- Westall, G.P., Snell, G.I., McLean, C., Kotsimbos, T., Williams, T., and Magro, C. (2008). C3d and C4d deposition early after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *27*, 722–728.

- Wiebe, C., Gibson, I.W., Blydt-Hansen, T.D., Karpinski, M., Ho, J., Storsley, L.J., Goldberg, A., Birk, P.E., Rush, D.N., and Nickerson, P.W. (2012). Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *12*, 1157–1167.
- Witt, C.A., Gaut, J.P., Yusen, R.D., Byers, D.E., Ippa, J.A., Bennett Bain, K., Alexander Patterson, G., Mohanakumar, T., Trulock, E.P., and Hachem, R.R. (2013). Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *32*, 1034–1040.
- Wood, K.J., Zaitso, M., and Goto, R. (2013). Cell mediated rejection. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1034*, 71–83.
- Worrall, N.K., Misko, T.P., Sullivan, P.M., Hui, J.J., and Ferguson, T.B. (1996). Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates established acute cardiac allograft rejection. *Ann. Thorac. Surg.* *62*, 378–385.
- Worrall, N.K., Boasquevisque, C.H., Misko, T.P., Sullivan, P.M., Ferguson, T.B., and Patterson, G.A. (1997). Inducible nitric oxide synthase is expressed during experimental acute lung allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *16*, 334–339.
- Wu, G.W., Kobashigawa, J.A., Fishbein, M.C., Patel, J.K., Kittleson, M.M., Reed, E.F., Kiyosaki, K.K., and Ardehali, A. (2009). Asymptomatic Antibody-mediated Rejection After Heart Transplantation Predicts Poor Outcomes. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *28*.
- Wuest, S.J.A., Crucet, M., Gemperle, C., Loretz, C., and Hersberger, M. (2012). Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* *225*, 121–127.
- Wyburn, K.R., Jose, M.D., Wu, H., Atkins, R.C., and Chadban, S.J. (2005). The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation* *80*, 1641–1647.
- Wynn, T. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* *214*, 199–210.
- Xu, L., Collins, J., Drachenberg, C., Kukuruga, D., and Burke, A. (2014). Increased macrophage density of cardiac allograft biopsies is associated with antibody-mediated rejection and alloantibodies to HLA antigens. *Clin. Transplant.* *28*, 554–560.
- Yousem, S.A., and Zeevi, A. (2012). The histopathology of lung allograft dysfunction associated with the development of donor-specific HLA alloantibodies. *Am. J. Surg. Pathol.* *36*, 987–992.
- Yserbyt, J., Doms, C., Decramer, M., and Verleden, G. (2014). ACUTE LUNG ALLOGRAFT REJECTION : DIAGNOSTIC ROLE OF PROBE-BASED CONFOCAL LASER ENDOMICROSCOPY OF THE RESPIRATORY TRACT. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.*

Yu, Y.-R.A., Hotten, D.F., Malakhau, Y., Volker, E., Ghio, A.J., Noble, P.W., Kraft, M., Hollingsworth, J.W., Gunn, M.D., and Tighe, R.M. (2016). Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *54*, 13–24.

Yusen, R.D., Christie, J.D., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Benden, C., Dipchand, A.I., Dobbels, F., Kirk, R., Lund, L.H., Rahmel, A.O., et al. (2013). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirtieth adult lung and heart-lung transplant report--2013; focus theme: age. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *32*, 965–978.

Yusen, R.D., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Benden, C., Dipchand, A.I., Goldfarb, S.B., Levvey, B.J., Lund, L.H., Meiser, B., Rossano, J.W., et al. (2015). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J. Heart Lung Transplant.* *34*, 1264–1277.

Zachary, A.A., Lucas, D.P., Detrick, B., and Leffell, M.S. (2009). Naturally occurring interference in Luminex[®] assays for HLA-specific antibodies: Characteristics and resolution. *Hum. Immunol.* *70*, 496–501.

Zhang, X., and Reed, E.F. (2009). Effect of Antibodies on Endothelium. *Am. J. Transplant.* *9*, 2459–2465.

Zhang, Q., Cecka, J.M., Gjertson, D.W., Ge, P., Rose, M.L., Patel, J.K., Ardehali, A., Kobashigawa, J.A., Fishbein, M.C., and Reed, E.F. (2011). HLA and MICA: Targets of Antibody-Mediated Rejection in Heart Transplantation. *Transplantation* *91*, 1153–1158.

Zou, Y., Mirbaha, F., Lazaro, A., Zhang, Y., Lavingia, B., and Stastny, P. (2002). MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum. Immunol.* *63*, 30–39.

Zou, Y., Stastny, P., Süsal, C., Döhler, B., and Opelz, G. (2007). Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* *357*, 1293–1300.

ANNEXE

Antibody-Mediated Rejection in Lung Transplantation: Clinical Outcomes and Donor-Specific Antibody Characteristics

A. Roux^{1,2,3,*}, I. Bendib Le Lan¹,
S. Holifanjaniaina⁴, K. A. Thomas²,
A. M. Hamid¹, C. Picard¹, D. Grenet¹,
S. De Miranda¹, B. Douvry¹, L. Beaumont-
Azuar¹, E. Sage^{3,5}, J. Devaquet⁶,
E. Cuquemelle⁷, M. Le Guen⁸, R. Spreafico^{9,10},
C. Suberbielle-Boissel¹¹ M. Stern¹ and
F. Parquin⁷ on behalf of the Foch Lung
Transplantation Group

¹Pneumology, Adult Cystic Fibrosis Center and Lung Transplantation Department, Foch Hospital, Suresnes, France

²Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA

³Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, UPRES EA220, Suresnes, France

⁴Pathology Department, Foch Hospital, Suresnes, France

⁵Thoracic Surgery Department, Foch Hospital, Suresnes, France

⁶Intensive Care Unit, Foch Hospital, Suresnes, France

⁷Thoracic Intensive Care Unit, Foch Hospital, Suresnes, France

⁸Anesthesiology Department, Foch Hospital, Suresnes, France

⁹Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA

¹⁰Institute for Quantitative and Computational Biosciences, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA

¹¹Laboratoire Régional d'Histocompatibilité, Saint-Louis Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

* Corresponding author: Antoine Roux,
a.roux@hopital-foch.org, ARoux@mednet.ucla.edu

In the context of lung transplant (LT), because of diagnostic difficulties, antibody-mediated rejection (AMR) remains a matter of debate. We retrospectively analyzed an LT cohort at Foch Hospital to demonstrate the impact of AMR on LT prognosis. AMR diagnosis requires association of clinical symptoms, donor-specific antibodies (DSAs), and C4d⁺ staining and/or histological patterns consistent with AMR. Prospective categorization split patients into four groups: (i) DSA positive, AMR positive (DSA^{pos}AMR^{pos}); (ii) DSA positive, AMR

negative (DSA^{pos}AMR^{neg}); (iii) DSA limited, AMR negative (DSA^{lim}; equal to one specificity, with mean fluorescence intensity of 500–1000 once); and (iv) DSA negative, AMR negative (DSA^{neg}). AMR treatment consisted of a combination of plasmapheresis, intravenous immunoglobulin and rituximab. Among 206 transplanted patients, 10.7% were DSA^{pos}AMR^{pos} (n = 22), 40.3% were DSA^{pos}AMR^{neg} (n = 84), 6% were DSA^{lim} (n = 13) and 43% were DSA^{neg} (n = 88). Analysis of acute cellular rejection at month 12 showed higher cumulative numbers (mean plus or minus standard deviation) in the DSA^{pos}AMR^{pos} group (2.1 ± 1.7) compared with DSA^{pos}AMR^{neg} (1 ± 1.2), DSA^{lim} (0.75 ± 1), and DSA^{neg} (0.7 ± 1.23) groups. Multivariate analysis demonstrated AMR as a risk factor for chronic lung allograft dysfunction (hazard ratio [HR] 8.7) and graft loss (HR 7.56) for DSA^{pos}AMR^{pos} patients. Our results show a negative impact of AMR on LT clinical course and advocate for an early active diagnostic approach and evaluation of therapeutic strategies to improve prognosis.

Abbreviations: ACR, acute cellular rejection; AFOP, acute fibrinous organizing pneumonia; ALI, acute lung injury; AMR, antibody-mediated rejection; ARDS, acute respiratory distress syndrome; BOS, bronchiolitis obliterans syndrome; C, chronic lung allograft dysfunction; CF, cystic fibrosis; CI, confidence interval; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; CMV, cytomegalovirus; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; D, deceased; Dn, donor; DSA, donor-specific antibody; DSA^{lim}, donor-specific antibody limited, antibody-mediated rejection negative; DSA^{neg}, donor-specific antibody negative, antibody-mediated rejection negative; DSA^{pos}AMR^{neg}, donor-specific antibody positive, antibody-mediated rejection negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, donor-specific antibody positive, antibody-mediated rejection positive; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; FEV1, forced expiratory volume at 1s; FVC, forced vital capacity; GERD, gastroesophageal reflux disease; HELT, high-emergency lung transplantation; HLA-Ab, HLA antibodies; HR, hazard ratio; IQR, interquartile range; ISHLT, International Society for Heart and Lung Transplantation; IVIG, intravenous immunoglobulin; KT, kidney transplantation; LAS, lung allocation score; LT, lung transplantation; MFI, mean fluorescence intensity; MOF, multiorgan failure; P/F ratio, PaO₂/FiO₂ ratio; PF, pulmonary fibrosis; PGD, primary graft failure; PGD3, primary graft dysfunction grade 3; PP, plasmapheresis; PTLD, posttransplant lymphoproliferative disease; R, rejection; RAS,

restrictive allograft syndrome; Rc, recipient; reTx, retransplanted; SAB, single-antigen bead; SD, standard deviation; SOT, solid organ transplant; TBB, transbronchial biopsy

Received 05 June 2015, revised 13 October 2015 and accepted for publication 17 October 2015

Introduction

Graft failure after kidney transplantation (1) and heart transplantation (2) is driven mainly by humoral immunity and subsequent antibody-mediated rejection (AMR). The diagnostic criteria for AMR in those solid organ transplants (SOTs) are robust and well established (3,4), with specific subtypes of rejection now being deciphered based on molecular microscopy (5–7) or outcome studies of large populations (8,9). In contrast, diagnosis of AMR in the context of lung transplantation (LT) remains a challenging concern that has been highlighted by different groups (10,11).

Almost 20 years ago, Frost et al first reported hyperacute rejection related to HLA donor-specific antibodies (DSAs) in LT (12). This was followed by multiple informative clinical (13–16) and pathologic (17,18) reports that sketched the boundaries of AMR in LT. According to the most recent International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) update (19), the diagnosis of pulmonary AMR requires a multidisciplinary approach that includes the presence of clinical allograft dysfunction, circulating DSAs, and explicit pathologic findings. Because of lack of specificity and technical difficulties, not only is C4d staining cautiously interpreted, its inclusion in AMR diagnosis remains a matter of debate (20).

Despite these previous publications, there is currently no widely accepted definition of AMR in LT (19,20). Uncertainty of diagnostic criteria leads numerous studies to demonstrate the association of DSAs and LT prognosis while circumventing discussion regarding the role of AMR in LT outcome. Girnita et al found that DSAs were associated with more frequent high-grade and/or persistent acute cellular rejection (ACR) (21), lymphocytic bronchiolitis and chronic lung allograft dysfunction (CLAD) (22). Later, Brugiere et al showed that pre-LT class II HLA antibodies (HLA-Ab) were associated with poorer outcomes (23). Finally, Morrell et al demonstrated that post-LT DSAs were also associated with CLAD occurrence and worse survival (24).

We and others (15,16,25) consider the role of humoral immunity in the context of LT to be a research field of great interest. Considering the lack of current gold standard diagnostic criteria for AMR in LT, because of the relatively novel yet hazy acknowledgement of its effect on LT outcome, we propose a pragmatic approach based on clinical prognosis, DSAs, and AMR categorization. We conducted a retrospective monocentric analysis of

consecutive LT patients with prospective diagnosis of AMR to determine whether there was an association among DSAs, AMR, CLAD occurrence, and graft survival and to describe the frequency and characteristics of DSAs according to AMR-DSA status.

Methods

Study population

All consecutive LT patients of Foch Hospital (an academic teaching hospital affiliated with Université Versailles Saint-Quentin, Versailles, France) between January 2010 and December 2013 were eligible for inclusion. All patients received bilateral LT. Patients who were deceased prior to the first post-LT (post-LT day 1) single-antigen bead (SAB) assay or who were lost to follow-up were excluded from the population used in the descriptive and survival analyses. Moreover, patients who were deceased before 6 mo, who had bronchial issues restraining respiratory function evaluation or who lacked at least 2 years of follow-up without CLAD occurrence were excluded from the population used to analyze freedom from CLAD.

HLA-Ab testing strategy and DSA description

All patients were screened for pre-LT HLA-Ab with the LABScreen SAB assay (One Lambda; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at least once and then every 6 mo until LT. Postoperatively, patients were screened for HLA-Ab (by SAB) routinely (days 1, 7, 21, and 30; months 2–6, 9, and 12; and then every 6 mo thereafter) and during episodes of graft dysfunction and for monitoring response to treatment. DSAs were classified as preformed if found prior to LT (on graft allocation), whereas if found only after LT, they were classified as *de novo*. Further classification of DSAs was based on specificity for either HLA class I or II, thus each patient could have preformed, *de novo*, or both preformed and *de novo* DSAs. Similarly, they could have DSAs specific for either class I or II or for both classes I and II. The immunodominant DSAs were defined as the DSAs with the highest mean fluorescence intensity (MFI). For patients who were DSA positive, AMR negative (DSA^{pos}AMR^{neg}), the time point for each patient at which the sum MFI (cumulative MFI of each DSA in a given sample) was highest was defined as the peak. Alternatively, for patients who were DSA positive, AMR positive (DSA^{pos}AMR^{pos}), the peak was defined as the time of AMR diagnosis. The number of DSAs (according to specificity) was also reported at the peak for each patient. Because DSAs specific for HLA-DQ were previously reported to be more pathogenic in other SOTs (26), we also reported the existence of HLA-DQ DSAs.

Patient categorization and AMR-DSA status

Patients were categorized prospectively by a multidisciplinary physician and pathologist team according to occurrence of AMR (Table 1). Patients who were DSA^{pos}AMR^{pos} (DSA MFI >1000 or MFI of 500–1000 with more than two specificities and/or detected more than once) had a prospective diagnosis of AMR defined as either (i) AMR C4d positive with the association of clinical dysfunction and DSAs and C4d-positive staining with or without histological patterns suggestive of AMR or (ii) AMR C4d negative with the association of clinical dysfunction and negative C4d staining with histological patterns suggestive of AMR. On the basis of publications prior to 2010, we defined histological pattern suggestive of AMR as either neutrophil capillaritis (27,28) or acute lung injury (14) with exclusion of other causes (i.e. ischemia–reperfusion, infection, aspiration, and drug toxicity). The non-AMR population was subdivided according to DSA status as DSA^{pos}AMR^{neg}, with DSA positivity as described above without AMR during the entire follow-up period; DSA limited (DSA^{lim}), with DSA detected only once and

Table 1: Criteria for AMR-DSA status categorization

AMR patients(DSA ^{pos} AMR ^{pos})		Non-AMR patients		
		DSA ^{pos} AMR ^{neg}	DSA ^{Lim}	DSA ^{neg}
DSA positivity: DSA MFI >1000, or MFI of 500–1000 with more than two specificities and/or detected more than once		DSA positivity: DSA MFI > 1000, or MFI of 500–1000 with more than two specificities and/or detected more than once	DSA detected only once and having only one specificity with an MFI of 500–1000	All single-antigen tests with DSA MFI <500
AMR C4d ^{Pos}	AMR C4d ^{Neg}	No AMR diagnosis throughout entire follow-up		
Clinical dysfunction and DSA positivity and C4d positive staining with or without histological patterns suggestive of AMR	Clinical dysfunction and DSA positivity and negative C4d staining with histological patterns suggestive of AMR: neutrophilic capillaritis,‡ acute lung injury‡			

AMR, antibody-mediated rejection; C4d^{Neg}, C4d negative; C4d^{Pos}, C4d positive; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; DSA, donor-specific antibody; DSA^{Lim}, DSA limited, AMR negative; DSA^{neg}, DSA negative, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{neg}, DSA positive, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive; MFI, mean fluorescence intensity.

‡At the exclusion of other diagnosis (ischemia–reperfusion, infection, aspiration, and drug toxicity).

having only one specificity with an MFI of 500–1000); and DSA negative (DSA^{neg}), with all single-antigen tests with DSAs at an MFI <500 (15,29).

Histology, C4d staining, and AMR diagnosis criteria

Specimens examined by histology were most often transbronchial biopsies (TBBs; both routine and for cause) and, more rarely, pulmonary biopsies acquired through thoracotomy or explantation. Hematoxylin and eosin sections were analyzed for the presence of ACR and subsequently graded as defined by ISHLT (30). The following histological patterns compatible with AMR were also analyzed: (i) neutrophil capillaritis and (ii) acute lung injury with or without diffuse alveolar damage and with or without organizing pneumonia (19,20). The presence of DSAs, clinical dysfunction or histological pattern suggestive of AMR was further characterized by C4d immunohistochemical stains performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Biopsy staining was considered positive if C4d was found to be deposited along capillary walls; subsequent distribution was characterized as focal (<50%) or diffuse (≥50%), and an intensity score was ascribed (from 1 to 3) (19).

Patient characteristics

The following clinical data were collected from exhaustive screening of medical reports for each patient: recipient age; sex; BMI; lung allocation score (LAS) and underlying disease; donor age and PaO₂/FiO₂ ratio (P/F ratio); donor and recipient HLA typing and number of HLA mismatches; ischemic time; cytomegalovirus (CMV) donor–recipient serology; pre-, peri- or postoperative resort to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO); DSA before LT; plasmapheresis (PP) before LT; high-emergency LT (HELT); *ex vivo* procedure; primary graft dysfunction grade 3 (PGD3) at 72 h; presence of ACR at postoperative day 7; cumulative number of acute rejections at month 12 (regardless of any association with AMR); gastroesophageal reflux disease; and number of SAB assays per patient during follow-up.

Prognosis of LT

CLAD was defined as forced expiratory volume at 1 s (FEV1) ≤80% of baseline (two measurements at 3-week intervals). Baseline was defined as the average of the two best values throughout follow-up. CLAD with obstructive ventilatory defect (FEV1 to forced vital capacity [FVC] <0.7) defined bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), whereas restrictive

ventilatory defect (total lung capacity <80% of baseline or FVC ≤80% of baseline without obstructive defect; i.e. with proportional defect of FEV1 and FVC) defined restrictive allograft syndrome (RAS) (31). Graft loss was defined by death or retransplantation. Survival time was defined as time from LT to end of follow-up (for living patients), death or retransplantation.

Ethics and statistical analysis

This observational study was approved by the research protocol evaluation committee of the institutional review board of the French Learned Society for Respiratory Medicine (Société de Pneumologie de Langue Française). Baseline demographics and clinical characteristics were compared between the four AMR-DSA groups. Time to peak and HLA-DQ DSA presence were compared among DSA^{Lim}, DSA^{pos}AMR^{neg}, and DSA^{pos}AMR^{pos} patients, whereas other DSA characteristics were compared only between the latter two groups. Quantitative variables were expressed either as median with 25–75 interquartile range (IQR) or as mean plus or minus standard deviation. Categorical variables were expressed as both a number and a percentage. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for comparison of quantitative variables, whereas Fisher or chi-square tests were used for categorical variables.

Freedom from CLAD and graft survival were plotted with Kaplan-Meier curves. Univariate analyses of categorical variables were performed using the log-rank method, with hazard ratios (HRs) determined as described (32). Univariate analyses of continuous variables and multivariate models were constructed using Cox regression.

All analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0 for Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, CA) and R 3.2.1 with the survival package (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A p-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Study population and baseline characteristics

During the study period, 209 patients were transplanted (Figure 1). Three were excluded from descriptive and survival analyses: two were deceased before the first SAB

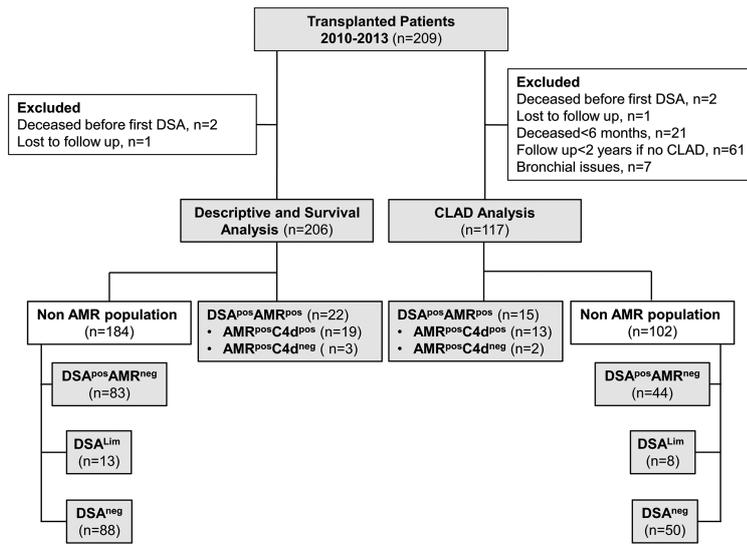


Figure 1: Flow chart of eligibility, exclusion, and subsequent patient populations for analysis. AMR, antibody-mediated rejection; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; DSA, donor-specific antibody; DSA^{Lim}, DSA limited, AMR negative; DSA^{neg}, DSA negative, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{neg}, DSA positive, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive.

assay (day 1), and one was lost to follow-up. Of 22 patients with a positive AMR diagnosis (10.5% of the entire cohort, 18% of all DSA^{pos} patients), only three had C4d-negative biopsies. More than 42% of the total population were found to be DSA^{neg}, whereas the DSA^{pos}AMR^{neg} patients represented the second largest group (40.3%) (Figure 1). Of note, no AMR episodes were identified in patients with DSA^{Lim} criteria, reinforcing our assumption that DSAs with this characteristic were not clinically relevant.

Patients of each group did not differ for sex ratio, age, underlying disease distribution, BMI, LAS, donor age and P/F ratio, CMV status, resort to HELT, preoperative ECMO, or *ex vivo* use (Table 2). Interestingly, pre-LT DSAs and related pre-LT PP (according to our perioperative strategy) (Supplemental Materials and Methods) were similarly frequent in DSA^{pos}AMR^{pos} and DSA^{pos}AMR^{neg} patients but were far more frequent compared with patients who were DSA^{Lim} and DSA^{neg}. DSA^{pos}AMR^{pos} patients also had a significantly higher number of HLA mismatches (6.9 ± 0.7) compared with DSA^{pos}AMR^{neg} (5.9 ± 1.2), DSA^{Lim} (6.3 ± 0.8) and DSA^{neg} (5.6 ± 1.4) patients (Table 2). We did not find any significant differences between the four AMR-DSA patient groups for frequency of PGD3 at 72 h, postoperative ECMO use, induction therapy, ACR at day 7 or length of follow-up. In contrast, cumulative numbers of ACR at month 12 were significantly higher in the DSA^{pos}AMR^{pos} patients (2.1 ± 1.7) compared with DSA^{pos}AMR^{neg} (1 ± 1.2), DSA^{Lim} (0.75 ± 1) and DSA^{neg} (0.72 ± 1.23) patients.

DSA^{neg} patients had lower numbers of SAB tests than DSA^{pos}AMR^{pos} patients but a similar number of assays compared with DSA^{pos}AMR^{neg} and DSA^{Lim} patients (Table 2). Additional tests needed for monitoring treatment response are partly able to explain the higher number of SAB assays in the DSA^{pos}AMR^{pos} population. All AMR patients (except one with <3-mo mortality) had ≥10 SAB

assays during individual follow-up. Patients with fewer than six assays during follow-up composed 7.22% (6 of 83) of the DSA^{pos}AMR^{neg} group and 20.45% of the DSA^{neg} group (18 of 88, with 12 deceased in the first 3 mo). Furthermore, according to previously chosen DSA positivity cutoff values (MFI >1000) (13,24), only 16 DSA^{pos}AMR^{neg} and all DSA^{Lim} patients would have been categorized as DSA^{neg}, which would not have affected our results.

AMR patients and DSA analysis

All AMR episodes were clinically symptomatic, and two cases of AMR followed an insufficient FK506 dosage. None of the 21 DSA^{pos}AMR^{pos} patients tested for complement-dependent cytotoxicity crossmatch had a positive crossmatch immediately prior to LT. The timeline figure (Supplemental Figure S1) highlights the wide variability in clinical time course: AMR could occur at the first DSA appearance or after a few months of DSA positivity, CLAD and graft loss occurrence, and time between AMR diagnosis and CLAD and graft loss vary from a few days or weeks to many months.

Clinical presentation and pathology of the three C4d-negative patients are summarized in Supplemental Table 1. Of note, analysis of TBB results among DSA^{neg} patients, either at last TBB before death (n = 20) (Supplemental Table 2) or at last TBB before CLAD occurrence (n = 5) (Supplemental Table 3), demonstrated few histological patterns compatible with AMR. Furthermore, diagnoses other than AMR were determined for every patient except one (see patients 23, 26, 27, 35, 37, and 41). Nine AMR^{pos} patients were associated with ACR (A2, n = 5; A1, n = 4). Median time from LT to AMR was 120 days (IQR 24–349) and 8 of 22 patients had AMR before 45 days (Table 3). AMR treatment consisted of PP plus rituximab and intravenous immunoglobulin (IVIg) for 17 patients, whereas three patients received only PP (due to death before IVIg

Table 2: Description of study population

	DSA ^{pos} AMR ^{pos} (n = 22)	DSA ^{pos} AMR ^{neg} (n = 83)	DSA ^{lim} (n = 13)	DSA ^{neg} (n = 88)	p-value	Statistical analyses
Female Rc, n (%)	11 (50)	44 (53)	5 (38)	48 (55)	0.72	§
Age Rc (years), median (IQR 25–75)	35.45 (23.65–53.25)	36.30 (27.7–51.3)	46 (25.9–53.7)	40.2 (28.5–53.75)	0.64	¶
Underlying disease (CF/PF/COPD/other), n	10/5/4/3	45/15/15/8	7/3/3	48/7/17/16	0.38	§
BMI at LT, median (IQR 25–75)	18.5 (17.7–26.2)	19.5 (17.7–21.4)	18.9 (18.25–25.2)	18.5 (17–21.3)	0.33	¶
LAS, median (IQR 25–75)	36.85 (33.2–42.1)	38 (35.1–43.7)	36.5 (34.6–39.2)	38.15 (34.2–43.8)	0.60	¶
Age Dn (years), median (IQR 25–75)	46.5 (36.25–60.25)	52 (40–60)	54 (44.5–60)	50 (34–59.75)	0.49	¶
P/F ratio Dn, median (IQR 25–75)	388 (322.3–441.3)	372 (308–433)	323 (315.5–393.5)	361.5 (301.8–437.8)	0.75	¶
CMV status (Dn–Rc–/Dn+Rc+/Dn–Rc+/Dn+Rc–), n	8/5/6/3	20/26/19/18	3/3/2/5	23/20/16/29	0.57	§
Ischemic time (min), median (IQR 25–75)	352 (280–412.5)	374 (330–444.5)	377 (280–438)	342.5 (300–411.3)	0.24	¶
HELT, n (%)	3 (13.6)	15 (18)	2 (15)	17 (19.7)	0.91	§
Ex vivo procedure, n (%)	2 (9)	17 (20)	2 (15)	17 (19.7)	0.65	§
ECMO pre-LT, n (%)	0 (0)	6 (7)	0 (0)	7 (8)	0.41	§
ECMO peri-LT, n (%)	10 (45)	39 (46)	4 (30)	43 (50)	0.68	§
ECMO post-LT, n (%)	3 (13)	16 (19)	4 (30)	24 (27.9)	0.37	§
PGD3 at 72 h, n (%)	3 (13)	20 (23)	1 (7)	21 (24.4)	0.41	§
Pre-LT DSA, n (%)	12 (54)	58 (69)	3 (23)	21 (24)	<0.001	§
Pre-LT plasmapheresis, n (%)	8 (36)	40 (49)	3 (23)	11 (13)	<0.001	§
HLA mismatch, mean (SD)	6.9 (0.7)	5.9 (1.2)	6.3 (0.8)	5.6 (1.4)	<0.001	¶
Induction therapy, n (%)	12 (54)	52 (62.3)	6 (46)	47 (53)	0.47	§
ACR at day 7, n (%)	8 (36)	21 (25)	3 (23)	17 (19.7)	1	§
Cumulative no. of ACR at month 12, mean (SD)	2.1 (1.7)	1 (1.2)	0.75 (1)	0.72 (1.23)	<0.001	¶
No. of SAB assay, median (IQR 25–75)	14.5 (11–31)	10 (8–13)	8 (7–13)	10 (6–13)	<0.001	¶
Follow-up (days), median (IQR 25–75)	598 (300–1117)	756 (432–995)	845 (506–1206)	705 (391–1077)	0.82	¶

ACR, acute cellular rejection; AMR, antibody-mediated rejection; BMI, body mass index; CF, cystic fibrosis; CMV, cytomegalovirus; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; Dn, donor; DSA, donor-specific antibody; DSA^{lim}, DSA limited, AMR negative; DSA^{neg}, DSA negative, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive; DSA^{pos}AMR^{neg}, DSA positive, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; HELT, high-emergency lung transplantation; IQR, interquartile range; LAS, lung allocation score; LT, lung transplantation; P/F ratio, PaO₂/FIO₂ ratio; PF, pulmonary fibrosis; PGD3, primary graft dysfunction grade 3; Rc, recipient; SAB, single-antigen bead; SD, standard deviation. Other included in underlying disease: bronchiectasis (n = 11), retransplantation (n = 10), Lymphangioleiomyomatosis (n = 4), Sarcoidosis (n = 2), Bronchiolitis obliterans secondary (BOS) to GVH (n = 2), hypersensitivity pneumonitis (n = 1). Statistical analyses: §, Chi-square, Kruskal-Wallis.

Table 3: Donor specific antibody characteristics according to antibody mediated rejection-donor specific antibody status

	DSA ^{pos} AMR ^{pos} (n = 22)	DSA ^{pos} AMR ^{neg} (n = 83)	DSA ^{Lim} (n = 13)	p-value	Statistical analyses
Performed/ <i>de novo</i> /both, n	2/1/9	21/31/31	1/12/0	0.58 ¹	\$\$
Class I/class II/both, n	1/6/15	7/37/39	2/11/0	0.53 ¹	\$\$
Anti-DQ DSA, n (%)	21 (95)	50 (60)	6 (46)	0.0028 ²	\$
No. of specificity at peak/AMR, mean (SD)	3.4 (2.28)	1.8 (1.2)	1 (0)	0.0013 ¹	¶¶
Time to peak, days, median (IQR 25–75)	120 (24–349)	34 (25–188)	150 (18–653.5)	0.15 ²	¶
Exposure duration, days, median (IQR 25–75)	248 (117–755)	161 (28–349.5)	0 (0)	0.048 ¹	¶¶
Immunodominant DSA MFI at peak/AMR, median (IQR 25–75)	7332 (3383–10585)	1972 (1121–3604)	574 (520.5–675.5)	<0.001 ¹	¶¶

AMR, antibody-mediated rejection; DSA, donor-specific antibody; DSA^{Lim}, DSA limited, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{neg}, DSA positive, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive; IQR, interquartile range; MFI, mean fluorescence intensity; SD, standard deviation.
 Statistical analyses: \$, Chi-square; \$\$, Fisher; ¶, Kruskal-Wallis; ¶¶, Mann-Whitney.¹ Comparison of DSA^{pos}AMR^{pos} vs. DSA^{pos}AMR^{neg}. ²Comparison of DSA^{pos}AMR^{pos} vs. DSA^{pos}AMR^{neg} vs. DSA^{Lim}.

and rituximab treatment) and two patients received only IVIG (due to full recovery after methylprednisone pulse and an increased risk of infection). Only one patient received bortezomib for maintenance treatment. Interestingly, the proportion of negative SAB tests at the end of follow-up is significantly higher among DSA^{pos}AMR^{pos} patients who were alive (8 of 10) compared with those with graft loss (2 of 12) (Fisher exact test, p = 0.008).

Compared with DSA^{pos}AMR^{neg} patients, DSA^{pos}AMR^{pos} patients did not differ significantly for *de novo*/performed or class II/I specificity distribution (Table 3). In contrast, at the peak, DSA^{pos}AMR^{pos} patients clearly had a greater proportion of DQ DSAs (21 [95%] vs. 51 [61%]), an increased number of DSA specificities (3.4 ± 2.28 vs. 1.8 ± 1.2) and higher immunodominant DSA MFI (7332 [IQR 3383–10585] vs. 1972 [IQR 1121–3604]) compared with DSA^{pos}AMR^{neg} patients (Table 3).

Prognosis analysis

As shown in the clinical timeline for AMR^{pos} patients (Supplemental Figure S1), graft loss resulted from eight deceased and four retransplanted patients. Graft survival was significantly worse in DSA^{pos}AMR^{pos} patients compared with the three other populations (Figure 2A). Interestingly, none of the 20 deceased DSA^{neg} patients had CLAD by the end of follow-up (Supplemental Table 2).

After exclusion of patients with bronchial issues, who were deceased before month 6 or who had follow-up of <2 years without CLAD (Supplemental Materials and Methods), 117 patients were included in CLAD occurrence analysis (Figure 1). Despite specific treatment, DSA^{pos}AMR^{pos} patients had earlier and more frequent CLAD occurrence than the three other populations (Kaplan-Meier method) (Figure 2B). In the non-AMR population, >80% of the patients were free from CLAD by the end of the follow-up period. On the contrary, 34% of the DSA^{pos}AMR^{pos} patients had CLAD by 1 year and ≈60% had CLAD by 2 years of follow-up. Further analysis of CLAD subtypes revealed the exclusive presence of RAS only in DSA^{pos}AMR^{pos} patients, whereas BOS or mixed CLAD (RAS plus BOS) were found in each group (Table 4). As expected, analysis including patients without CLAD with <2 years of follow-up had similar results (Supplemental Figure S2). Furthermore, the differences for graft survival and freedom from CLAD remained significant when comparing only C4d-positive AMR patients with DSA^{pos}AMR^{neg} patients (Supplemental Figure S3). Of note, no difference was seen between the DSA^{neg}, DSA^{Lim} and DSA^{pos}AMR^{neg} populations for CLAD occurrence and graft survival.

Univariate analysis demonstrated that CLAD occurrence was significantly associated with AMR (HR 7.28), whereas graft loss was associated with AMR (HR 3.06), pulmonary fibrosis (HR 4.13), BMI (HR 1.1), LAS (HR 1.02), peri- and

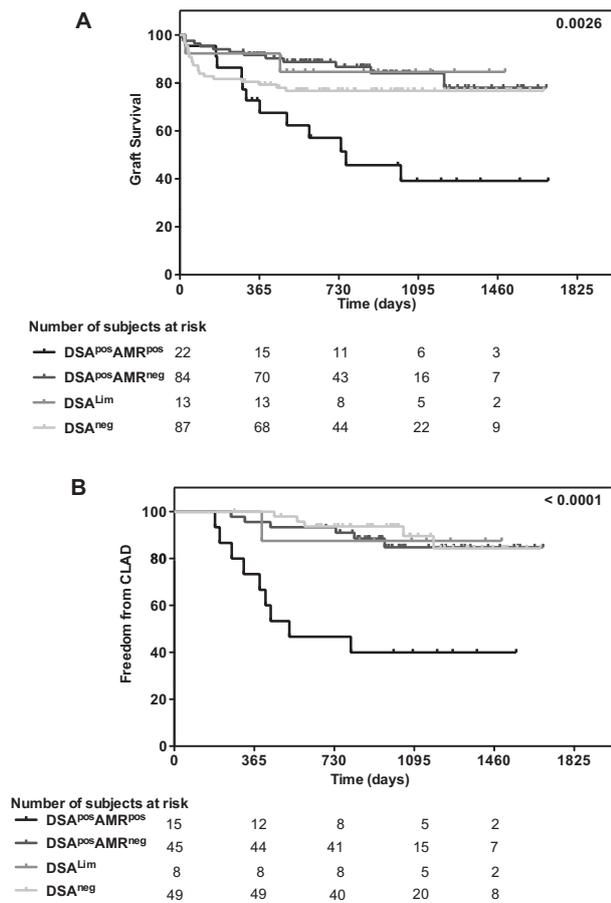


Figure 2: Graft survival (A) and freedom from CLAD (B) according to AMR-DSA status. Comparison by Kaplan-Meier method. AMR, antibody-mediated rejection; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; DSA, donor-specific antibody; DSA^{Lim}, DSA limited, AMR negative; DSA^{neg}, DSA negative, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{neg}, DSA positive, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive.

postoperative ECMO (HR 1.83 and 2.7, respectively), and PGD3 at 72 h (HR 1.99) (Table 5). Multivariate analysis confirmed a role for AMR, even after controlling for relevant variables. These relevant variables were selected by either

prior knowledge or by an unbiased algorithm. In the former model, AMR was associated with higher risk of CLAD occurrence (HR 10.13) and graft loss (HR 7.56) (Table 6). The latter model showed consistent results (Supplemental Table 4). In sum, several univariate and multivariate analyses concordantly suggested a role for AMR in CLAD occurrence and graft loss.

Discussion

In this study, we used frequent single-antigen monitoring and C4d staining to prospectively monitor for AMR in our cohort of LT patients. This strategy allowed for a detailed assessment of patient prognosis according to AMR-DSA status and in-depth description of DSA characteristics. Our results showed an association of AMR diagnosis with CLAD occurrence and graft survival. Analysis of specificities and immunodominant MFI demonstrated that DSAs from DSA^{pos}AMR^{pos} patients had characteristics distinct from those of DSA^{pos}AMR^{neg} patients. These results provide evidence that bolsters the clinical relevance of the previously proposed AMR definitions in LT (19,20).

The frequency of AMR (10.5%) in our cohort is higher than the frequency reported in a similar data set by Witt et al (4.3%) (16) but lower than the incidence reported by Lobo et al (27%) (13). Furthermore, Witt et al (16) described a longer median delay for AMR appearance (258 days) but a similar proportion of patients with AMR in the first 45 days (7 of 21 patients). Association of ACR with DSAs has been reported previously (21) because high-grade and recurrent ACR are suggestive of AMR and warrant C4d staining (14). The higher frequency of ACR associated with DSAs and graft dysfunction (74%) reported by Yousem et al (18) might be explained by their different definition of patients of interest and controls. Unfortunately, compliance with treatment was not systematically reported in our data set. Because it is most often considered as an explanation for DSA appearance or AMR occurrence, the lack of this information does not undermine our results.

In a previous case-control study with nonconsecutive patients and a smaller population including a large

Table 4: Chronic lung allograft dysfunction type according to antibody mediated rejection-donor specific antibody status

	DSA ^{pos} AMR ^{pos} (n = 15)	DSA ^{pos} AMR ^{neg} and DSA ^{Lim} (n = 53)	DSA ^{neg} (n = 49)	p-value	Statistical analyses
CLAD, n (%)	9 (60)	6 (11)	5 (10)	<0.0001	§
RAS, n	6	0	0	0.03	§
BOS, n	2	5	4		
Mixed, n	1	1	1		

AMR, antibody-mediated rejection; BOS, bronchiolitis obliterans syndrome; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; DSA, donor-specific antibody; DSA^{Lim}, DSA limited, AMR negative; DSA^{neg}, DSA negative, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{neg}, DSA positive, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive; RAS, restrictive allograft syndrome. Statistical analyses: §, Chi-square.

Table 5: Univariate analysis for chronic lung allograft dysfunction occurrence and graft survival

Univariate analysis	CLAD occurrence ¹		Graft loss ²	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Recipient				
Female vs. male	0.58 (0.70–4.05)	0.22	0.68 (0.81–2.6)	0.20
Age (for 1-year increment)	0.96 (0.93–1.01)	0.13	1.02 (0.99–1.04)	0.15
Underlying disease				
PF vs. others	2.68 (0.56–12.83)	0.0654	4.13 (1.67–10.26)	<0.001
COPD vs. others	0.75 (0.22–2.54)	0.64	1.05 (0.50–2.0)	0.89
CF vs. others	0.70 (0.30–1.66)	0.42	0.40 (0.22–0.72)	0.003
BMI (for 1-point increment)	1.06 (0.96–1.18)	0.23	1.11 (1.04–1.17)	<0.001
LAS (for 1-point increment)	1.02 (0.99–1.05)	0.13	1.02 (1.01–1.04)	0.002
Donor				
Age (for 1-year increment)	0.98 (0.95–1.01)	0.254	1.01 (0.99–1.02)	0.66
Donor P/F ratio (for 1-point increment)	1.00 (0.99–1.01)	0.64	1.00 (0.99–1.00)	0.54
ECMO				
Preoperative (yes vs. no)	–	0.28	1.59 (0.46–5.5)	0.37
Perioperative (yes vs. no)	1.37 (0.57–3.29)	0.46	1.83 (1.02–3.27)	0.04
Postoperative (yes vs. no)	0.97 (0.33–2.85)	0.96	2.7 (1.29–5.60)	<0.001
Pre-LT DSA				
DSA ^{pos} vs. DSA ^{neg}	1.19 (0.51–2.80)	0.69	1.10 (0.62–1.97)	0.74
Pre-LT PP				
Yes vs. no	0.731 (0.29–1.86)	0.54	0.93 (0.49–1.75)	0.83
HELT				
Yes vs. no	1.87 (0.60–5.71)	0.19	1.70 (0.79–3.64)	0.11
Ischemic time ⁵ (for 1-min increment)	1.00 (0.99–1.01)	0.10	0.99 (0.99–1.00)	0.89
PGD3 at 72 h				
Yes vs. no	1.25 (0.43–3.63)	0.67	1.99 (1.08–3.69)	0.03
Induction therapy				
Yes vs. no	1.17 (0.49–2.75)	0.73	1.13 (0.63–2.01)	0.69
AMR status				
DSA ^{pos} AMR ^{pos} vs. non-AMR	7.28 (1.67–31.69)	<0.001	3.06 (1.18–7.9)	<0.001
DQ DSA				
Yes vs. no (among DSA ^{pos})	3.26 (0.85–6.98) ³	0.09	1.20 (0.52–2.76) ⁴	0.67
Cumulative no. of ACRs at month 12 (for one-episode increment)	0.72 (0.35–1.48)	0.37	0.81 (0.62–1.06) ⁶	0.12
CMV				
Dn ⁺ or Rc ⁺ vs. Dn ⁻ Rc ⁻	1.84 (0.73–4.66)	0.27	0.83 (0.44–1.56)	0.56
Reactivation vs. no reactivation	0.67 (0.2–2.28)	0.52	0.98 (0.50–1.94)	0.96
GERD				
Yes vs. no	0.73 (0.25–2.30) ⁷	0.57	0.54 (0.18–1.74) ⁸	0.26

ACR, acute cellular rejection; AMR, antibody-mediated rejection; BMI, body mass index; CF, cystic fibrosis; CI, confidence interval; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; CMV, cytomegalovirus; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; Dn, donor; DSA, donor-specific antibody; DSA^{neg}, DSA negative, AMR negative; DSA^{pos}, DSA positive; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; GERD, gastroesophageal reflux disease; HELT, high-emergency lung transplantation; HR, hazard ratio; LAS, lung allocation score; LT, lung transplantation; PF, pulmonary fibrosis; P/F ratio, PaO₂/FiO₂ ratio; PGD3, primary graft dysfunction grade 3; PP, plasmapheresis; Rc, recipient.

Due to the absence of CLAD in patients with preoperative ECMO, 95% CI cannot be computed. Hazard ratios (HR) were determined with the log-rank method for categorical variables and with Cox regression for continuous variables.

¹n = 117 unless otherwise noted.

²n = 206 unless otherwise noted.

³n = 68 (after exclusion of DSA^{neg} patients).

⁴n = 118 (after exclusion of DSA^{neg} patients).

⁵HR for ischemic time was calculated in a population excluding *ex vivo* patients (n = 168 for graft loss analysis and n = 97 for CLAD occurrence analysis).

⁶n = 186 (including patients alive at M6).

⁷n = 99 (including only patients with GERD exploration).

⁸n = 151 (including only patients with GERD exploration).

Table 6: Multivariate analysis for CLAD occurrence and graft survival

	Hazard ratio (95% CI)	p-value
For CLAD occurrence		
AM	10.13 (3.44–29.84)	<0.001
PF	2.82 (0.89–8.93)	0.078
LAS	1.02 (0.99–1.06)	0.162
Donor age	0.97 (0.94–1.00)	0.008
PGD	1.36 (0.41–4.50)	0.61
CMV	2.34 (0.71–7.65)	0.16
For graft loss		
AMR	7.56 (3.70–15.48)	<0.001
PF	3.09 (1.59–6.03)	<0.001
LAS	1.02 (1.00–1.04)	0.03
Donor age	0.99 (0.97–1.02)	0.56
PGD	1.84 (0.93–3.63)	0.08
CMV	1.28 (0.40–1.45)	0.45

AMR, antibody-mediated rejection; CI, confidence interval; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; CMV, cytomegalovirus; LAS, lung allocation score; PF, pulmonary fibrosis; PGD, primary graft failure.

proportion of AMR^{pos}C4d^{neg} patients (11 of 17 biopsies), Denicola et al (17) also showed worse outcome for AMR^{pos} LT patients. In addition, Otani et al found CLAD-related deaths in six of nine AMR-treated patients (15). Apart from these reports, previous publications regarding LT prognosis have focused on the presence of DSAs but completely bypassed AMR diagnoses in DSA^{pos} patients (13,23,24). Morrell et al published a well-conducted monocentric study providing a reliable demonstration of DSA association with CLAD occurrence and graft survival without acknowledging the role of AMR (24). Because their graft allocation strategy matched grafts with recipients without pre-LT DSAs, the authors only considered *de novo* DSAs in their analyses. In contrast, we cannot exclude that our strategy of allowing LT with pre-LT DSAs may inflate the frequencies and impact of both preformed DSAs and AMR. The previously described AMR^{pos}C4d^{neg} populations in LT (17,33) are relatively underrepresented in our cohort. This could reflect the wide use of C4d staining in our cohort and the technical difficulties associated with this diagnostic criterion.

Because of our population size and relatively short follow-up, lack of association of DSA^{pos}AMR^{neg} status with survival and CLAD compared with DSA^{neg} patients does not formally exclude the existence of DSA-associated CLAD outside of AMR cases. In kidney transplantation, studies regarding DSA^{pos}AMR^{neg} prognosis show conflicting results. As we showed in this study in LT, Lefaucheur et al demonstrated no difference for graft survival between DSA^{pos}AMR^{neg} and DSA^{neg} kidney transplant patients (34). More recently, Loupy et al (35) and Wiebe et al (36) demonstrated the impact of subclinical AMR on GFR in DSA^{pos}AMR^{neg} patients. These studies highlight remaining questions regarding the prognosis of DSA^{pos} patients without clinical AMR in the field of LT and the identification of DSA^{pos} patients at risk for AMR and/or CLAD without

AMR (if the latter exists). Further studies of DSA characteristics, such as subclass or complement fixation, may provide additional value during risk stratification of LT patients.

The frequency of, exclusively, preformed or class I DSAs in DSA^{pos}AMR^{pos} patients was rare in our cohort and did not differ significantly from the frequency of these DSAs in our DSA^{pos}AMR^{neg} patients. This is reminiscent of results reported by Witt et al (16) and suggests different underlying pathophysiologies. Nevertheless, a previous report of hyperacute AMR linked to preformed HLA-A2 DSAs (37) and the occurrence of AMR with solely preformed or class I (n=1) DSAs in our study are evidence that warrants consideration of these two characteristics during AMR diagnosis. Interestingly, all AMR patients had DQ DSA except the sole patient without DQ mismatch; however, because DQ DSAs were also frequently found in the DSA^{pos}AMR^{neg} population, this characteristic is not significantly associated with CLAD occurrence or graft survival.

The immunodominant MFI is supposedly one of the more reliable indicators of DSA pathogenicity in the absence of complement-fixing assays. In this regard, the large difference in peak immunodominant MFI values between DSA^{pos}AMR^{pos} and DSA^{pos}AMR^{neg} groups strengthens this hypothesis. We are aware of the inherent restrictions of using the MFI of immunodominant DSAs to determine real DSA exposure, particularly in cases of multiple specificities or due to other effects, such as prozone and sponge effects.

There are currently three limitations of C4d staining in LT biopsies: (i) sampling-related limitations (TBB provides randomly limited tissue sampling), (ii) technical constraints, and (iii) positivity interpretation. Previous studies have explored different C4d staining techniques including immunofluorescence (38,39), immunohistochemistry (40–42) and the use of either frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies, with contradicting results. Besides AMR, C4d positivity can also be due to either nonspecific staining of noncomplement proteins (i.e. elastic fibers or collagen type IV) (19) or C4d deposition in response to complement activation, which is unrelated to rejection (i.e. infections or ischemia–reperfusion) (42). To this end, C4d positivity criteria proposed by Ionescu et al (40) and recommended by ISHLT guidelines (19) may allow for a dramatic reduction in false-positive diagnoses.

Neither of the aforementioned histological patterns used in AMR diagnosis are pathologies unique to AMR alone. Because pathognomonic signs are noted exceptions within the field of clinical diagnostics, a differential grouping of positive or negative clinical/paraclinical signs is the standard during the general diagnostic approach. The same is true for AMR (19), in which a combination of DSA presence, graft dysfunction, histological lesion and/or C4d staining as well as exclusion of concurrent differential diagnoses are

Roux et al

required for proper diagnosis. This diagnostic approach allows significant stratification of patients according to their outcome but has inherent limitations resulting in missed diagnoses. Recent technological advances, such as molecular microscopy, will prove valuable in these situations for diagnosis and patient management (43).

Generalization of our results is limited by the retrospective and monocentric nature of our study, and prospective validation of our results is necessary to corroborate this AMR categorization. Furthermore, multicenter validation of this AMR categorization would provide evaluation of the reproducibility of C4d staining and histological scoring. Of note, our study was not designed to assess the diagnostic value of each histological pattern and C4d staining; therefore, we did not infer any sensitivity, specificity, or positive or negative predictive value from our data.

LT physicians adapted their therapeutic decisions according to AMR assessment and diagnosis. This could have notably undermined the outcomes difference between AMR and non-AMR patients. Because the use of proteasome inhibitors in AMR therapy is on the rise, one could argue that using a proteasome inhibitor as the depleting agent, instead of rituximab, may have improved the poor clinical outcomes in our AMR patients.

Last, although our multivariate models were constructed with established methods of variable selection, the possibility that potentially relevant variables have not been measured and, consequently, not modeled cannot be ruled out.

Furthermore, because our data support the clinical relevance of AMR diagnostic criteria during LT with regard to HLA DSAs, the relationship between AMR and non-HLA-Ab (of either allo- or autoimmune nature) (44) may be further characterized, analogous to what has occurred in kidney transplantation (45–47). Our data indicate the presence of RAS exclusively during AMR. In this regard, RAS in an HLA DSA^{neg} patient would warrant discussion regarding the presence of non-HLA DSAs; however, due to current lack of knowledge concerning non-HLA targets in LT and simple affordable assays for large screening of non-HLA DSAs, this diagnosis remains very difficult and most likely is underestimated.

Conclusions

Our results show that AMR, as defined by the current diagnostic criteria, is associated with poor clinical outcome in LT. Widespread use of the recent AMR definition, although fully aware of the current weaknesses or under-representations (AMR^{pos}C4d^{neg} cases, non-HLA DSA-related AMR), may be useful for clinical practice and for further evaluation of therapeutic strategies for AMR amelioration. In addition, the role of complement activation

by DSAs and how this characteristic can lead to risk stratification for AMR and CLAD (48) requires further research.

The Foch Lung Transplantation Group, Foch Hospital, Suresnes, France

Pneumology, Adult CF Center and Lung Transplantation Department: Dr. Clément Picard, Dr. Dominique Grenet, Dr. Sandra De Miranda, Dr. Abdul Monem Hamid, Dr. Benoit Douvry, Dr. Laurence Beaumont-Azuar, Dr. Geneviève Le Bourdelles, Dr. Hélène Neveu, Dr. Daniela Usturoi, Dr. Marc Stern, Dr. Antoine Roux. *Thoracic Surgery Department:* Pr. Alain Chapelier, Dr. Edouard Sage, Dr. Philippe Puyo, Dr. Pierre Bonnette, Dr. Jocelyn Bellier, Dr. Mathieu Glorion, Dr. Salam Abou-Taam, Dr. François Gonin, Dr. Triet Ngo. *Thoracic Intensive Care Unit:* Dr. Elise Cuquemelle, Dr. François Parquin. *Intensive Care Unit:* Dr. Charles Cerf, Dr. Grégoire Trebbia, Dr. Alexis Soummer, Dr. Jérôme Devaquet, Dr. Anthony Lanceleur, Dr. Kocella Bouferrache, Dr. David Courtier, Dr. Vincent Caille, Dr. Anne-Gaëlle Si Larbi. *Anesthesiology Department:* Pr. Marc Fischler, Dr. Morgan Le Guen, Dr. Virginie Dumans-Nizard, Dr. Barbara Szekeley, Dr. Mireille Michel-Cherqui, Dr. Jean- Yves Marandon, Dr. Ngai Liu, Dr. Léa Ley, Dr. Julie Bresson, Dr. Marie Louise Felten, Dr. Béatrice Angemont, Dr. Valentina Assenzo, Dr. Olivier Belze, Dr. Marie Binczak, Dr. Patrick Clapson, Dr. Camille Cornet, Dr. Jean-Louis Dumoulin, Dr. Sébastien Jacqmin, Dr. Olivier Pruszkowski, Dr. Adrian Radu, Dr. Céline Roussel, Dr. Benoît Vandembunder, Dr. Nicolas Verroust, Dr. Thibaut Mariaux de Serres. *Pathology Department:* Dr. Leila Zemoura, Dr. Magali Colombat, Sonia Holifanjaniana. *Radiology Department:* Dr. François Mellot, Dr. Axel Guth. *Biology Department:* Pr. Marc Vasse, Dr. Eric Farfour, Dr. Emilie Cardot, Dr. Pierre Cahen, Dr. Philippe Lesprit, Dr. Damien Mathonnet. *Internal Medicine:* Dr. Sophie Hillaire, Dr. Christine Veyrie, Dr. Florence Bouilloud, Dr. Barbara Néraud. *Pharmacy Department:* Dr. Dominique Dardelle.

Acknowledgments

The authors would like to thank the following members of the UCLA Immunogenetics Center: Dr. David Gjertson for his expertise in statistical analyses and Drs. Michelle Hickey and Nicole Valenzuela for their help with HLA mismatch assessment and manuscript revision. This work was financially supported by contributions from the Association Gregory Lemarchal, the Fondation du souffle and Fondation Foch.

Disclosure

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. A. Roux has served as a consultant for Novartis France (concerning cytomegalovirus in solid organ transplantation). The other authors have no conflicts of interest to disclose.

References

- Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012; 12: 388–399.
- Loupy A, Cazes A, Guillemain R, et al. 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.
- Berry GJ, Burke MM, Andersen C, 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: 1147–1162.
- Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014; 14: 272–283.
- Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, 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: 1812–1822.
- Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 2267–2277.
- 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: 2312–2323.
- Loupy A, Vernerey D, Tinel C, et al. Subclinical rejection phenotypes at 1 year post-transplant and outcome of kidney allografts. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 1721–1731.
- Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: A population-based study. *Lancet* 2013; 381: 313–319.
- Glanville AR. Antibody-mediated rejection in lung transplantation: Myth or reality? *J Heart Lung Transplant* 2010; 29: 395–400.
- Westall GP, Snell GI. Antibody-mediated rejection in lung transplantation: Fable, spin, or fact? *Transplantation* 2014; 98: 927–930.
- Frost AE, Jammal CT, Cagle PT. Hyperacute rejection following lung transplantation. *Chest* 1996; 110: 559–562.
- Lobo LJ, Aris RM, Schmitz J, Neuringer IP. Donor-specific antibodies are associated with antibody-mediated rejection, acute cellular rejection, bronchiolitis obliterans syndrome, and cystic fibrosis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 70–77.
- Morrell MR, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28: 96–100.
- Otani S, Davis AK, Cantwell L, et al. Evolving experience of treating antibody-mediated rejection following lung transplantation. *Transpl Immunol* 2014; 31: 75–80.
- Witt CA, Gaut JP, Yusen RD, et al. Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 1034–1040.
- DeNicola MM, Weigt SS, Belperio JA, Reed EF, Ross DJ, Wallace WD. Pathologic findings in lung allografts with anti-HLA antibodies. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 326–332.
- Yousem SA, Zeevi A. The histopathology of lung allograft dysfunction associated with the development of donor-specific HLA alloantibodies. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 987–992.
- Berry G, Burke M, Andersen C, et al. Pathology of pulmonary antibody-mediated rejection: 2012 Update from the Pathology Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 14–21.
- Wallace WD, Weigt SS, Farver CF. Update on pathology of antibody-mediated rejection in the lung allograft. *Curr Opin Organ Transplant* 2014; 19: 303–308.
- Girmita AL, McCurry KR, Iacono AT, et al. HLA-specific antibodies are associated with high-grade and persistent-recurrent lung allograft acute rejection. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 1135–1141.
- Girmita AL, Duquesnoy R, Yousem SA, et al. HLA-specific antibodies are risk factors for lymphocytic bronchiolitis and chronic lung allograft dysfunction. *Am J Transplant* 2005; 5: 131–138.
- Brugiere O, Suberbielle C, Thabut G, et al. Lung transplantation in patients with pretransplantation donor-specific antibodies detected by Luminex assay. *Transplantation* 2013; 95: 761–765.
- Morrell MR, Pilewski JM, Gries CJ, et al. De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33: 1288–1294.
- Hachem R. Antibody-mediated lung transplant rejection. *Curr Respir Care Rep* 2012; 1: 157–161.
- Freitas MC, Rebellato LM, Ozawa M, et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation* 2013; 95: 1113–1119.
- Astor TL, Galantowicz M, Phillips A, Palafox J, Baker P. Pulmonary capillaritis as a manifestation of acute humoral allograft rejection following infant lung transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9: 409–412.
- Astor TL, Weill D, Cool C, Teitelbaum I, Schwarz MI, Zamora MR. Pulmonary capillaritis in lung transplant recipients: Treatment and effect on allograft function. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 2091–2097.
- Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1398–1406.
- Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, et al. Revision of the 1996 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26: 1229–1242.
- Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P. A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33: 127–133.
- Machin D, Cheung YB, Parmar M. *Survival Analysis: A Practical Approach*. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2006.
- Daoud AH, Betensley AD. Diagnosis and treatment of antibody mediated rejection in lung transplantation: A retrospective case series. *Transpl Immunol* 2013; 28: 1–5.
- Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 324–331.
- Loupy A, Vernerey D, Tinel C, et al. Subclinical rejection phenotypes at 1 year post-transplant and outcome of kidney allografts. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 1721–1731.
- Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 2012; 12: 1157–1167.
- Bittner HB, Dunitz J, Hertz M, Bolman MR, III., Park SJ. Hyperacute rejection in single lung transplantation-case report of successful management by means of plasmapheresis and antithymocyte globulin treatment. *Transplantation* 2001; 71: 649–651.

38. Magro CM, Pope Harman A, Klinger D, et al. Use of C4d as a diagnostic adjunct in lung allograft biopsies. *Am J Transplant* 2003; 3: 1143–1154.
39. Roberts JA, Barrios R, Cagle PT, et al. The presence of anti-HLA donor-specific antibodies in lung allograft recipients does not correlate with C4d immunofluorescence in transbronchial biopsy specimens. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1053–1058.
40. Ionescu DN, Girnita AL, Zeevi A, et al. C4d deposition in lung allografts is associated with circulating anti-HLA alloantibody. *Transpl Immunol* 2005; 15: 63–68.
41. Wallace WD, Reed EF, Ross D, Lassman CR, Fishbein MC. C4d staining of pulmonary allograft biopsies: An immunoperoxidase study. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1565–1570.
42. Westall GP, Snell GI, McLean C, Kotsimbos T, Williams T, Magro C. C3d and C4d deposition early after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27: 722–728.
43. Sellares J, Reeve J, Loupy A, et al. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant* 2013; 13: 971–983.
44. Tiriveedhi V, Gautam B, Sarma NJ, et al. Pre-transplant antibodies to α 1 tubulin and collagen-V in lung transplantation: Clinical correlations. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32: 807–814.
45. Holgersson J, Elsheikh E, Grufman P, Sumitran-Holgersson S, Tyden G. A case of acute vascular rejection caused by endothelial-reactive non-HLA antibodies. *Clin Transpl* 2006; 535–538.
46. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005; 352: 558–569.
47. Banasik M, Boratynska M, Koscielska-Kasprzak K, et al. Non-HLA antibodies: Angiotensin II type 1 receptor (anti-AT1R) and endothelin-1 type A receptor (anti-ETAR) are associated with renal allograft injury and graft loss. *Transplant Proc* 2014; 46: 2618–2621.
48. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013; 369: 1215–1226.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Supplemental Material and Methods

Figure S1: Clinical timeline of patients with AMR. Each line represents a single patient. For clarity, three different time scales are represented (A–C). Dashed lines represent time from first appearance of DSA to AMR occurrence (rejection). No dashed line means that the first appearance of DSA corresponded with AMR diagnosis. An intact line represents time from AMR to CLAD or end of the follow-up period (arrowhead). The status at the end of follow-up is either alive, dead or retransplanted. The DSA status at the end of follow-up compared with DSA at the moment of AMR is also described as follows: (i) DSA^{neg} if the last DSA test was negative (MFI <500), (ii) DSA decreased if the last MFI decreased by >20%, (iii) DSA increased if the last MFI increased by >20%, and (iv) DSA stable if the last MFI did not vary more than \pm 20%. Comparison of negative SAB tests demonstrated a significantly higher proportion of negative SAB tests in patients who were alive versus

deceased or retransplanted (Fisher exact test, $p=0.008$). For patient 16, CLAD preceded the AMR diagnosis. Retrospective analysis showed that AMR probably started before CLAD and may have been misdiagnosed initially. *For deceased patients without formal criteria for CLAD, cause of death (and relation with AMR) were as follows: patient 1, sudden cardiac arrest (related to AMR: unknown); patient 5, ARDS secondary to AMR and/or inhalation pneumonia related to severe gastroparesis (related to AMR: probable); patient 6, ARDS after a monthly degradation secondary to active AMR and concurrent infection (related to AMR: probable); patient 8, multiorgan failure and ARDS following treatment of AMR (interpreted as failure of treatment; related to AMR: probable); patient 22, ARDS with active AMR and exclusion of concurrent diagnosis, evaluation of forced expiratory volume at 1 s at 2 days before admission in the intensive care unit showed CLAD (related to AMR: certain). A, alive; AMR, antibody-mediated rejection; ARDS, acute respiratory distress syndrome; C, chronic lung allograft dysfunction; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; D, deceased; DSA, donor-specific antibody; MFI, mean fluorescence intensity; R, rejection; reTx, retransplanted; SAB, single-antigen bead.

Figure S2: Freedom from CLAD according to AMR-DSA status including patients without CLAD with <2 years of follow-up. Comparison by Kaplan-Meier method. AMR, antibody-mediated rejection; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; DSA, donor-specific antibody; DSA^{Lim}, DSA limited, AMR negative; DSA^{neg}, DSA negative, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{neg}, DSA positive, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive.

Figure S3: Graft survival (A) and freedom from CLAD (B) according to AMR-DSA status excluding the three patients with C4d-negative AMR. Comparison by Kaplan-Meier method. AMR, antibody-mediated rejection; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; DSA, donor-specific antibody; DSA^{Lim}, DSA limited, AMR negative; DSA^{neg}, DSA negative, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{neg}, DSA positive, AMR negative; DSA^{pos}AMR^{pos}, DSA positive, AMR positive.

Table S1: Clinical and histological description of the three C4d-negative AMR patients. ACR was defined as recommended by Stewart et al (30). ALI and neutrophilic capillaritis were graded from 0 to 3. Of note, of the three patients, two died directly following AMR occurrence, and the third experienced a chronic lung allograft dysfunction (restrictive allograft syndrome type), leading to retransplantation 506 days after the first LT and 401 days after AMR diagnosis. †At the moment of AMR. *Transbronchial biopsy before ARDS. **Open thorax biopsies 45 days after admission for ARDS. ACR, acute cellular rejection; ALI, acute lung injury; AMR, antibody-mediated rejection; ARDS, acute respiratory distress syndrome; DSA, donor-specific antibody; FEV1, forced expiratory volume at 1 s; LT, lung transplantation; MFI, mean fluorescence intensity.

Antibody-Mediated Rejection

Table S2: Cause of death and histology among DSA-negative patients with graft loss. Twenty DSA-negative patients died throughout the study period. For these patients, we reported the results of the last TBB prior to graft loss. None of these 20 patients had chronic lung allograft dysfunction. ‡Secondary to ischemic colitis and hemophagocytic syndrome. ‡‡Dependent on volemia with neither pulmonary venous stenosis nor left cardiac insufficiency. ‡‡‡Due to intracranial hemorrhagic septic embolism due to endocarditis aspergillosis. *Persistent PGD3. **Infectious ARDS at the moment of the biopsy. AFOP, acute fibrinous organizing pneumonia; ARDS, acute respiratory distress syndrome; DSA, donor-specific antibody; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; LT, lung transplantation; MOF, multiorgan failure; PTLN, posttransplant lymphoproliferative disease; PGD3, primary graft failure grade 3; TBB, transbronchial biopsy.

Table S3: Histology among DSA-negative patients with CLAD. Only five DSA-negative patients had CLAD. For those patients, we reported the results of the last TBB prior to the diagnosis of CLAD. CLAD, chronic lung allograft dysfunction; DSA, donor-specific antibody; LT, lung transplantation; TBB, transbronchial biopsy.

Table S4: Multivariate analysis for CLAD occurrence and graft survival (stepwise backward model). Variables retained by stepwise backward selection, for either graft loss or CLAD occurrence. AMR, antibody-mediated rejection; CI, confidence interval; CLAD, chronic lung allograft dysfunction; CMV, cytomegalovirus; D, deceased; LAS, lung allocation score; PF, pulmonary fibrosis; PGD, primary graft failure; R, rejection.

Titre : Rejet aigu en transplantation pulmonaire: intérêts de l'histologie et de l'immunomarquage C4d dans le diagnostic de rejet aigu humoral et de l'évaluation de la polarisation des macrophages alvéolaires

Mots clés : rejet aigu humoral, immunomarquage C4d, inflammation microvasculaire, polarisation macrophage, transplantation pulmonaire

Résumé : La transplantation pulmonaire est depuis une vingtaine d'années une option thérapeutique valide pour une grande variété de pathologies pulmonaires au stade terminal. Malgré les progrès réalisés ces dernières années en matière de traitement immunosuppresseur, les rejets restent une cause majeure de la perte du greffon. Plusieurs études ont souligné l'importance du rejet aigu comme un facteur contributif important à l'évolution de la dysfonction chronique du greffon (ou CLAD) et, *in fine*, à la perte du greffon. Par conséquent, des outils diagnostiques fiables de rejet aigu s'imposent pour mieux prévenir le CLAD. Dans notre première étude, nous avons évalué les marqueurs tissulaires de rejet aigu humoral (RAH) pulmonaire. Nous avons montré ainsi que les lésions histologiques dont l'inflammation microvasculaire ne sont pas spécifiques et le marquage C4d est un marqueur utile pour confirmer le diagnostic de RAH. Dans un second temps, nous avons étudié en cytométrie de flux la polarisation des macrophages obtenus par lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA) chez des patients transplantés avec et sans rejet. Nos résultats montrent les limites des marqueurs membranaires (HLA-DR et CD206) dans l'évaluation de l'état de polarisation des macrophages au cours des rejets.

Ce travail montre l'intérêt des marqueurs tissulaires, en particulier le marquage C4d, dans le suivi des patients transplantés pulmonaires et souligne la nécessité d'identifier des marqueurs appropriés et utilisables en cytométrie de flux pour avancer sur l'état de polarisation des macrophages alvéolaires.

Title : Acute rejection in lung transplantation: interest of histopathologic findings and C4d staining in the diagnosis of acute antibody-mediated rejection and evaluation of alveolar macrophage polarization

Keywords : acute antibody-mediated rejection, C4d staining, microvascular inflammation, macrophage polarization, lung transplantation

Abstract : Lung transplantation is considered as a valid therapeutic option for patients with end-stage lung disease. Despite considerable progress in immunosuppressive therapy, allograft rejection remains a major cause of graft loss. Multiple studies have highlighted the importance of acute rejection as an important risk factor for the development of chronic lung allograft dysfunction (CLAD) leading to graft failure. Therefore, the improvement in the diagnosis of acute rejection represents a major challenge to prevent CLAD. In this study, we evaluated the tissue markers of acute antibody-mediated rejection (AMR) in lung transplantation. In our experience, the histopathologic findings including the microvascular inflammation in pulmonary AMR are not specific and C4d staining is a useful marker to confirm the diagnosis of AMR. Secondly, we investigated by flow cytometry the polarization of alveolar macrophage obtained by bronchoalveolar lavage (BAL) from lung transplant patients with and without acute rejection. Our results show the limits of surface markers (CD206 and HLA-DR) in the evaluation of alveolar macrophage polarization.

This study shows the interest of tissue markers, especially the C4d staining, for follow up of lung transplant recipients and highlights the need to identify appropriate and available markers for future studies of alveolar macrophage polarization by flow cytometry.

