



**HAL**  
open science

# Rejet humoral d'allogreffe rénale et allo-immunisation HLA

Tristan De Nattes

► **To cite this version:**

Tristan De Nattes. Rejet humoral d'allogreffe rénale et allo-immunisation HLA. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR053 . tel-04850251

**HAL Id: tel-04850251**

**<https://theses.hal.science/tel-04850251v1>**

Submitted on 20 Dec 2024

**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.

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**  
**Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

### **Rejet humoral d'allogreffe rénale et allo-immunisation HLA**

**Présentée et soutenue par**  
**TRISTAN DE NATTES**

**Thèse soutenue le 19/12/2023**  
**devant le jury composé de**

M. PHILIPPE GATAULT	Professeur des Univ - Prat Hospitalier, UNIVERSITE DE TOURS	Rapporteur du jury
M. RENAUD SNANOUDJ	Professeur des Univ - Prat Hospitalier, Université Paris-Saclay	Rapporteur du jury
M. DOMINIQUE BERTRAND	,	Membre du jury
MME GUISLAINE CARCELAIN	Professeur des Univ - Prat Hospitalier, UNIVERSITE PARIS CITE	Membre du jury
MME MARION RABANT	Professeur des Univ - Prat Hospitalier, UNIVERSITE PARIS CITE	Membre du jury
MME SOPHIE CANDON	Professeur des Univ - Prat Hospitalier, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par SOPHIE CANDON (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE)**



**THESE**

**Pour obtenir le diplôme de doctorat  
Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Rejet humoral d'allogreffe rénale et allo-immunisation HLA**

**Présentée et soutenue par  
Tristan de Nattes**

**Thèse soutenue le 19/12/2023  
devant le Jury composé de**

M. Philippe Gatault	Professeur des universités – praticien hospitalier, Université de Tours	Rapporteur du Jury
M. Renaud Snanoudj	Professeur des universités – praticien hospitalier, Université Paris-Saclay	Rapporteur du Jury
M. Dominique Bertrand	Praticien hospitalier, CHU de Rouen	Membre du Jury
Mme. Guislaine Carcelain	Professeure des universités – praticien hospitalier, Université Paris Cité	Membre du Jury
Mme. Marion Rabant	Professeure des universités – praticien hospitalier, Université Paris Cité	Membre du Jury
Mme. Sophie Candon	Professeure des universités – praticien hospitalier, Université de Rouen Normandie	Directrice de Thèse

**Thèse dirigée par Mme. Sophie Candon, Université de Rouen Normandie**

## **Remerciements**

### **A la Professeure Sophie Candon,**

Chère Sophie, il ne serait pas facile de résumer ces années de cohabitation de Master puis de Thèse et tout le bien que je pense de toi en quelques lignes. Alors je dirais simplement merci pour ton accompagnement qui dépasse largement les frontières de cette Thèse. Je suis heureux que nos chemins se soient croisés et que tu aies fait naître en moi le goût du laboratoire et de l'immunologie. J'espère que cette Thèse n'est que le début des travaux que nous pourrons mener ensemble. Enfin, je m'excuse de la -légère- pugnacité dont j'ai pu -parfois- faire preuve pour obtenir ce que je voulais !

### **Aux rapporteurs du Jury de cette Thèse,**

Je vous remercie tous les deux d'avoir accepté d'être membre et rapporteurs du Jury.

Pr Gatault, vous avez déjà eu l'occasion de connaître une partie de ces travaux, et je vous remercie de prendre part à leur jugement.

Pr Sanoudj, je vous remercie de juger ce travail, influencé par votre propre Thèse.

### **Aux membres du Jury de cette Thèse,**

Au Dr Bertrand, tu auras dirigé ma Thèse d'exercice, et maintenant tu juges ma Thèse de sciences. Merci pour ton compagnonnage dont j'espère continuer à bénéficier, et pour ton dynamisme qui nous aidera tous ensemble à aller de l'avant.

Au Pr. Carcelain, je suis honoré que soyez membre de ce Jury.

Au Pr. Rabant, je vous remercie de prendre part à ce Jury et espère que vous trouverez en ces travaux un intérêt pour la néphrologie.

### **Au laboratoire INSERM U1234,**

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur aide sans laquelle les travaux de cette thèse n'auraient probablement pas pu aboutir. Je vous remercie aussi pour votre clémence lors de mes pas hasardeux passés et à venir.

### **Au laboratoire londonien,**

Je remercie très chaleureusement les Dr Candice Roufosse, Jack Beadle et Frederic Toulza pour leur accueil à l'*Imperial College of London*. Leur aide au cours de cette année et les échanges que nous avons eu m'ont été très précieux. J'espère que ceux-ci continueront encore et que nous pourrons poursuivre nos collaborations visant à améliorer de nos pratiques diagnostiques.

### **A toutes les personnes ayant participé en partie à l'élaboration de cette thèse,**

Je pense en particulier au service d'anatomopathologie rénale du CHU de Rouen, au laboratoire HLA, au laboratoire de génétique, au service de néphrologie et aux patients y étant suivis. Merci pour votre aide lors des différentes étapes de ces travaux et pour votre bienveillance.

### **A mes proches et mes amis,**

Je vous remercie pour votre soutien et accompagnement pendant ces années de Thèse. J'ai une pensée particulière pour la Dr Valentine Jacob, « co-thésarde à distance », qui connaît déjà bien ces travaux.

### **Aux organisations m'ayant soutenu financièrement pendant ces années de Thèse,**

La Société Francophone de Transplantation, la Société Française de Néphrologie, Dialyse et Transplantation et la Fondation Charles Nicolle.

## Résumé

La transplantation rénale est le meilleur traitement de l'insuffisance rénale chronique terminale, que ce soit en termes d'espérance ou de qualité de vie. Malgré les progrès réalisés en immunologie de la transplantation et dans la gestion globale des patients transplantés, la principale étiologie de perte de greffon reste le rejet, et en particulier le rejet humoral.

L'évaluation du risque de rejet humoral repose principalement sur le dosage des anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon. Pourtant, il apparaît que ces anticorps ont un faible pouvoir prédictif de l'incidence et du pronostic du rejet, ce qui pourrait être expliqué par une hétérogénéité de leurs caractéristiques intrinsèques. Ces caractéristiques dépendent des cellules responsables de leur sécrétion, plasmocytes à courte et longue durée de vie, et donc indirectement des cellules responsables du maintien du pool de ces cellules sécrétrices d'anticorps : les lymphocytes B mémoires. Il a été montré en pathologies infectieuses que ces lymphocytes B mémoires sont hétérogènes en termes de phénotype, de fonction, de degré de clonalité et de diversification de leur BCR. Néanmoins, ceci n'a pas encore été analysé en transplantation rénale. Un des objectifs de cette thèse était d'étudier le degré d'hétérogénéité des lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques chez des patients immunisés en attente de transplantation rénale. Pour ce faire, une analyse en cellule unique de lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques de patients présentant différents contextes et degré d'immunisation a été réalisée, dans le but d'identifier leurs caractéristiques phénotypiques et transcriptomiques et la diversification de leur répertoire BCR.

La deuxième partie des travaux s'est concentrée sur les modalités diagnostiques du rejet de greffe rénale. Depuis quelques années, des outils de biologie moléculaire sont disponibles, permettant d'évaluer des centaines de transcrits exprimés dans le tissu de biopsie. Ces outils donnent la possibilité de décrire de nouvelles voies physiopathologiques, et potentiellement d'améliorer le diagnostic du rejet, en particulier le rejet humoral. Néanmoins, leur utilisation en pratique courante est restreinte du fait de leur faible disponibilité, des difficultés à interpréter les données produites, et de leur coût. De plus, du fait de cette sous-utilisation en pratique clinique, leur impact exact dans la prise en charge des patients n'est pas déterminé. Au cours de cette thèse, un outil de diagnostic moléculaire ayant des caractéristiques compatibles avec une utilisation en pratique clinique a été développé. Celui-ci permet de diagnostiquer le rejet et de le classer en rejet humoral ou cellulaire. Dans un second temps, cet outil a été confronté à des situations cliniques litigieuses, afin d'évaluer son intérêt en pratique courante.

A travers ces travaux, cette thèse visait d'une part à améliorer la compréhension de la réponse humorale en transplantation rénale, afin de contribuer à terme à mieux stratifier le risque immunologique en transplantation, et d'autre part à améliorer les modalités diagnostiques du rejet en aidant à la généralisation des outils de biologie moléculaire appliqués aux biopsies de greffons rénaux.

## Table des matières

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME .....	3
TABLE DES MATIERES.....	5
ABBRÉVIATIONS .....	7
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>8</b>
1.1 LA TRANSPLANTATION RENALE EN 2023 .....	8
1.2 PERTE DE GREFFON RENAL .....	9
1.3 ALLO-REACTIVITE ET TRANSPLANTATION RENALE.....	9
1.3.1 <i>Système et structure des molécules HLA</i> .....	11
1.3.2 <i>Polymorphisme HLA, CREG</i> .....	13
1.3.3 <i>Reconnaissance de l'antigène par un BCR</i> .....	14
1.3.4 <i>Mise en place d'une réponse humorale en transplantation rénale</i> .....	15
1.3.5 <i>Cellules effectrices de la réponse humorale mémoire post-centre germinatif</i> .....	18
1.3.6 <i>Influence de l'antigène sur la différenciation lymphocytaire B</i> .....	20
1.3.7 <i>Patients hyperimmunisés en transplantation rénale</i> .....	20
1.3.8 <i>Origines du répertoire anti-HLA</i> .....	21
1.3.9 <i>Hétérogénéité des anticorps anti-HLA</i> .....	22
1.3.10 <i>Hétérogénéité des cellules sécrétrices d'anticorps</i> .....	23
1.3.11 <i>Lymphocytes B mémoires en transplantation rénale</i> .....	24
1.4 LE REJET HUMORAL.....	26
1.4.1 <i>Les anticorps anti-HLA comme effecteurs du rejet humoral</i> .....	26
1.4.2 <i>Diagnostic du rejet humoral</i> .....	29
1.4.3 <i>Limites du diagnostic histologique du rejet humoral et de la classification de Banff</i> .....	32
1.4.4 <i>Le diagnostic moléculaire du rejet humoral</i> .....	34
1.4.5 <i>Applicabilité du diagnostic moléculaire en pratique clinique</i> .....	36
<b>2 OBJECTIF GENERAL .....</b>	<b>39</b>
<b>3 DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DU REJET DE GREFFE RENALE .....</b>	<b>40</b>
3.1 INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....	40
3.2 PREMIER ARTICLE: A SIMPLE MOLECULAR TOOL FOR THE ASSESSMENT OF KIDNEY TRANSPLANT BIOPSIE .....	41
3.3 DEUXIÈME ARTICLE : IMPACT OF SYSTEMATIC BIOPSY-BASED TRANSCRIPTOMICS OF KIDNEY TRANSPLANT ON THE DIAGNOSIS OF ANTIBODY-MEDIATED REJECTION IN CLINICAL PRACTICE .....	74
3.3.1 <i>Title page</i> .....	74
3.3.2 <i>Abstract</i> .....	75
3.3.3 <i>Abbreviations</i> .....	76
3.3.4 <i>Introduction</i> .....	77
3.3.5 <i>Material and methods</i> .....	78
3.3.6 <i>Results</i> .....	80
3.3.7 <i>Discussion</i> .....	83
3.3.8 <i>References</i> .....	86
3.3.9 <i>Tables</i> .....	88
3.3.10 <i>Figure legends</i> .....	95
3.3.11 <i>Figures</i> .....	97
<b>4 CARACTERISATION DES LYMPHOCYTES B MEMOIRES ALLO-REACTIFS CHEZ LES PATIENTS HYPER IMMUNISES.....</b>	<b>102</b>
4.1 INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....	102
4.2 METHODES.....	103
4.2.1 <i>Méthode de recherche des anticorps anti-HLA</i> .....	103
4.2.2 <i>Sélection des patients</i> .....	103
4.2.3 <i>Isolement cellulaire</i> .....	103

4.2.4	<i>Marquage cellulaire.....</i>	104
4.2.5	<i>Tri cellulaire .....</i>	105
4.2.6	<i>Génération des émulsions de cellules uniques.....</i>	106
4.2.7	<i>Construction des librairies .....</i>	106
4.2.8	<i>Séquençage des librairies .....</i>	107
4.3	<b>RESULTATS .....</b>	108
4.3.1	<i>Patients inclus.....</i>	108
4.3.2	<i>Caractéristiques des patients inclus.....</i>	108
4.3.3	<i>Isolement des cellules et données de cytométrie.....</i>	111
4.3.4	<i>Données de séquençage .....</i>	114
4.4	<b>DISCUSSION .....</b>	114
<b>5</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>ANNEXES .....</b>	<b>140</b>
8.1	ARTICLE “DARATUMUMAB FOR ANTIBODY-MEDIATED REJECTION: IS IT TIME TO TARGET THE REAL CURPIT?” .....	140
8.2	AUTRES ARTICLES PUBLIES PENDANT CETTE THESE, SANS RAPPORT DIRECT AVEC CELLE-CI .....	146
8.2.1	<i>Switch from calcineurin inhibitors to belatacept in kidney transplant patients with chronic-active antibody mediated rejection results in lower decline in kidney function at three years.....</i>	146
8.2.2	<i>Lesson for the clinical nephrologist: immune monitoring of human JC-polyomavirus in kidney transplantation .....</i>	147
8.2.3	<i>Kidney Transplant T Cell–Mediated Rejection Occurring After Anti-CD19 CAR T-Cell Therapy for Refractory Aggressive Burkitt-like Lymphoma With 11q Aberration: A Case Report.....</i>	148
8.2.4	<i>CD86 occupancy in belatacept-treated kidney transplant patients is not associated with clinical and infectious outcomes.....</i>	149
8.2.5	<i>Humoral response to a fourth dose of mRNA vaccine in kidney transplant recipient responders to three doses of mRNA vaccine.....</i>	150

## **Abbreviations**

ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

AMR : antibody mediated rejection

CDR : complementarity determining region

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

CREG: cross-reactive groups.

DSA : donor specific antigen

HLA : Human Leukocyte Antigen

KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like receptor

LLPC: long-lived plasma cell

MFI: median fluorescence intensity

SLPC: short-lived plasma cell

TCMR: T-cell mediated rejection

TCR: T-cell receptor

# 1 Introduction

## 1.1 La transplantation rénale en 2023

La transplantation rénale est le meilleur traitement de l'insuffisance rénale chronique terminale, que ce soit en termes d'espérance de vie ou de qualité de vie<sup>1,2</sup>. En France depuis la mise en place du registre Cristal en 1959 jusqu'au 31 décembre 2022, 100789 transplantations rénales ont été réalisées. A cette date, 42586 patients sont porteurs d'un greffon fonctionnel. L'épidémie de coronavirus a impacté la transplantation d'organes solides en France et dans le monde, entraînant un recul global du nombre de transplantations annuelles. Aussi en 2022, le nombre de nouveaux candidats inscrits sur liste d'attente active pour un greffon disponible est de 2,9 (versus 2,0 en 2017). Cette même année, 3377 greffes rénales ont été réalisées, laissant 9816 patients en liste d'attente active au 1<sup>er</sup> Janvier 2023<sup>3</sup> (**Tableau 1**).

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Malades en liste d'attente active au 1er janvier*	7722	7840	8084	8630	8952	9681	9816
Malades en liste d'attente inactive au 1er janvier**	5813	6529	7177	7577	8344	8631	9091
Nouveaux inscrits dans l'année	5386	5404	5643	4854	5516	5260	
Décédés en attente dans l'année	410	484	516	646	703	690	
Sortis de liste d'attente	360	461	538	524	545	598	
dont sortis de la liste d'attente pour aggravation	207	288	321	317	305	343	
Greffes	3782	3567	3643	2595	3252	3377	
dont greffes avec donneur vivant	611	541	510	390	502	514	
dont greffes avec donneur décédé de mort encéphalique	2936	2782	2784	1945	2353	2456	
dont greffes avec DDAC MI-II	57	31	27	10	9	0	
dont greffes avec DDAC MIII	178	213	322	250	388	407	
Greffes (pmh)	56,3	53,0	53,9	38,3	47,8	49,4	

*Tableau 1: Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe rénale. \* : Un malade est actif au 1er janvier s'il n'est pas en contre-indication temporaire au 1er janvier. \*\* : Un malade est inactif au 1er janvier s'il est en contre-indication temporaire au 1er janvier. DDAC MI-II : donneur décédé après arrêt circulatoire à la suite d'un arrêt cardiaque inopiné (catégories I et II de Maastricht). DDAC MIII : donneur décédé après arrêt circulatoire à la suite de la limitation ou de l'arrêt des thérapeutiques (catégories III de Maastricht) pmh : par million d'habitant CIT : contre-indication temporaire. Données extraites de CRISTAL.*

De nombreux progrès ont été réalisés dans la gestion globale des patients transplantés rénaux. En particulier, l'avènement d'immunosuppresseurs modernes au cours des années 1990-2000 a conduit à une drastique diminution de l'incidence du rejet précoce, principalement cellulaire (TCMR)<sup>4</sup>. Néanmoins depuis ces années, la survie greffon progresse peu avec une médiane située entre 140 et 200 mois en France selon les périodes de transplantation, et 170 mois en Europe<sup>5</sup>. En effet, la période précoce post-transplantation n'a pas connu de nouvelle avancée thérapeutique majeure, et la survie greffon après la première année de greffe progresse

principalement à la faveur de l'amélioration de la prise en charge globale des patients plutôt qu'à celle de nouveaux leviers thérapeutiques. De manière intéressante, il a été montré que cette stagnation de la vitesse d'amélioration de la survie n'est pas liée à l'âge des donneurs et des receveurs<sup>5</sup>.

## 1.2 Perte de greffon rénal

Le rejet, en particulier le rejet humoral<sup>6-8</sup>, est la principale cause d'échec de greffe, impliqué dans 25 à 50% des pertes de greffon. Classiquement, le rejet est dichotomisé en rejet cellulaire et rejet humoral (AMR), catégories elles-mêmes subdivisées en active, chronique-active et chronique-inactive selon la présence des signes histologiques d'activité et d'irréversibilité. Bien que cette division ait un rationnel diagnostique et thérapeutique, la physiopathologie de ces rejets est commune et basée sur l'allo-réactivité.

## 1.3 Allo-réactivité et transplantation rénale

Les antigènes à l'origine des réponses immunes allo-réactives peuvent être classés en deux catégories : les antigènes majeurs d'histocompatibilité, codés au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou système HLA chez l'homme, et les antigènes mineurs d'histocompatibilité qui sont eux codés hors du CMH. Historiquement, cette distinction entre antigènes majeurs et mineurs est issue de la capacité particulière des antigènes du CMH à induire une forte réponse immunitaire<sup>9</sup>. Ce n'est que secondairement que les caractéristiques soutenant cette différence ont été mises en évidence<sup>10</sup>. Celles-ci sont essentiellement liées aux mécanismes de présentation de l'antigène concerné, et à la fréquence, au sein du répertoire T, des lymphocytes capables de le reconnaître.

Deux mécanismes principaux sont décrits concernant l'allo-reconnaissance : directe et indirecte<sup>11</sup> (**Figure 1**).

La reconnaissance directe correspond à l'interaction d'un lymphocyte T du receveur avec un allo-CMH intact exprimé à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène issue du donneur. Il s'agit donc d'une reconnaissance du TCR non restreinte par le CMH autologue du receveur. La fréquence des lymphocytes T allo-réactifs est élevée<sup>12</sup> et repose sur une réactivité croisée de leur TCR contre des complexes CMH autologue/peptide (vis-à-vis desquels ils ont été sélectionnés au cours de leur ontogénie dans le thymus) et des complexes CMH allogénique/peptide. Cette capacité de reconnaissance de molécules du CMH allogéniques est

plus ou moins dépendante du peptide présenté. En cas de reconnaissance peptide-dépendante, il a été montré que les différences de séquences d'acide-aminés du sillon de présentation peptidique pourraient modifier l'orientation 3D d'un peptide du soi au sein du CMH, créant ainsi une nouvelle conformation CMH/peptide, non interprétée comme du soi, et donc génératrice d'allo réactivité<sup>13-16</sup>.

La reconnaissance indirecte, qui est une reconnaissance classique restreinte au CMH autologue du receveur, correspond à l'interaction d'un lymphocyte T du receveur avec une cellule présentatrice du receveur exprimant un complexe CMH autologue/peptide allogénique. Dans cette situation, le peptide allogénique est dérivé de l'apprêtement par la CPA d'un antigène majeur (CMH allogénique) ou d'un antigène mineur (polymorphisme peptidique de protéine non CMH) après son internalisation. Il est à noter que seuls les lymphocytes T CD4 capables de reconnaissance indirecte sont capables de coopérer avec les lymphocytes B autologues pour initier une réponse humorale vis-à-vis de molécules du CMH allogéniques (voir paragraphes suivants).

A côté de ces deux mécanismes, la reconnaissance semi-directe est aussi décrite. Elle correspond à l'acquisition par une CPA du receveur d'une molécule du CMH du donneur sous forme intacte par différents mécanismes, principalement échange au cours d'un contact cellulaire (trogocytose) et via les exosomes.

Enfin, les travaux récents de l'équipe lyonnaise ont montré l'existence d'une voie « directe inversée ». Celle-ci correspond à la reconnaissance par un lymphocyte T du donneur de molécules CMH intactes du receveur exprimées notamment par les lymphocytes B du receveur. Cette voie serait impliquée dans la période post-transplantation précoce, permettant une coopération entre lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du donneur présents au sein de l'organe transplanté et lymphocytes B du receveur et aboutissant à une réponse humorale avec production d'anticorps anti-CMH. La réponse humorale induite ne serait par contre que transitoire, d'une durée correspondant au temps de survie, chez le receveur, de ces lymphocytes T issus du donneur<sup>17</sup>.

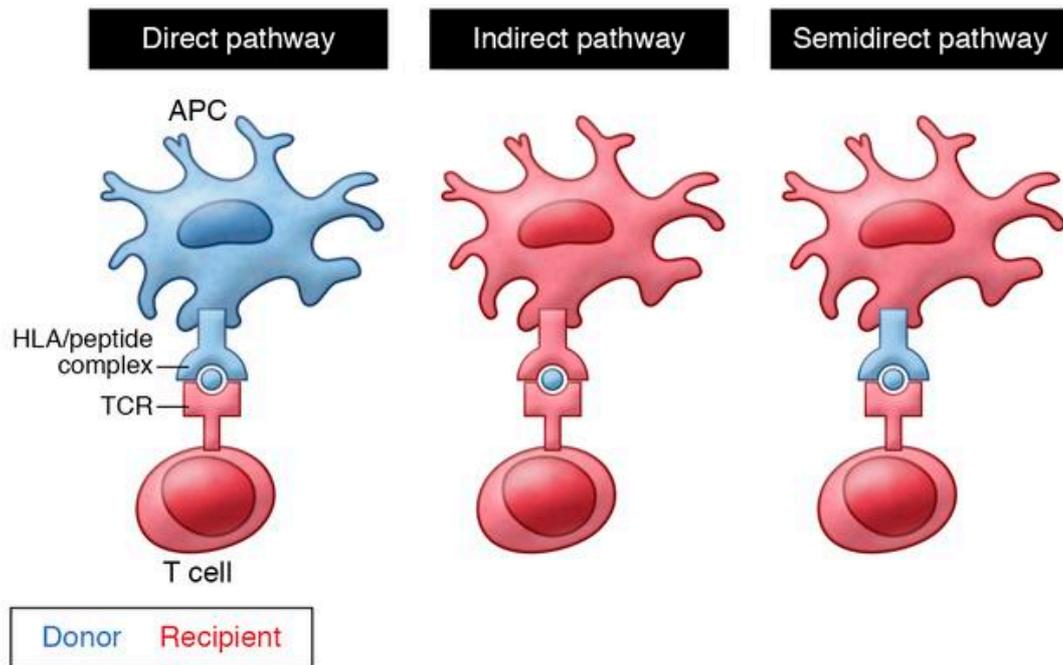


Figure 1 : Voies décrites de l'allo-réactivité. La voie "directe inversée" n'est pas représentée. Figure issue de DeWolf<sup>18</sup>.

### 1.3.1 Système et structure des molécules HLA

Les molécules du système HLA sont codées par deux régions (I et II) présentes sur le chromosome 6. Ces régions sont transmises en bloc à la descendance.

Les molécules HLA de classe 1 sont des hétérodimères transmembranaires présents à la surface de toutes les cellules nucléées et les plaquettes. Elles sont composées d'une chaîne légère faite de B2-microglobuline et d'une chaîne lourde de trois unités alpha (1, 2 et 3). Entre les chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  se situe le sillon dans lequel le peptide antigénique sera présenté aux lymphocytes T (**Figure 2**)

Les molécules HLA de classe 2 sont aussi des hétérodimères transmembranaires, composés d'une chaîne  $\alpha 1/\alpha 2$  et d'une chaîne  $\beta 1/\beta 2$ . Le sillon de présentation peptidique est situé dans l'espace délimité par les chaînes  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ . Ces molécules de classe 2 sont exprimées de manière constitutive à la surface des CPA, dont les lymphocytes B, et à la surface des cellules endothéliales sous certaines conditions, en particulier pro-inflammatoire ou à la suite d'une agression aiguë : lésions d'ischémie-reperfusion, néphrite virale...<sup>19,20</sup>.

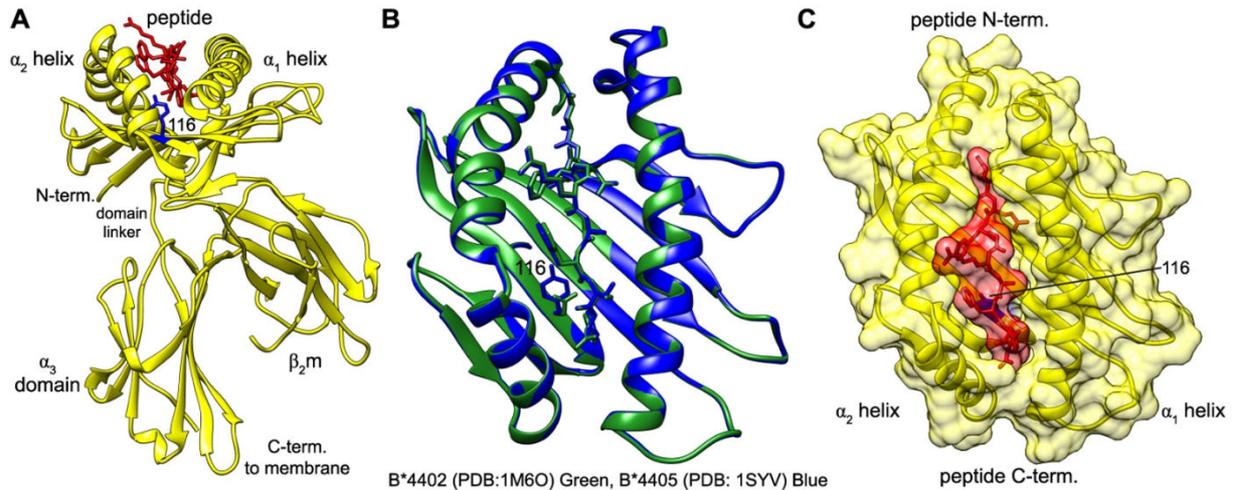


Figure 2 : structure d'une molécule HLA de classe 1. (A) Représentation en modèle ruban de la chaîne polymorphique (jaune), un peptide chargé (rouge), et un résidu polymorphique (bleu). (B) Représentation du sillon de présentation. Les couleurs vertes et bleues permettent de localiser les différences entre deux molécules HLA : B\*4402 et B\*4405. (C) Représentation de la surface d'une molécule HLA de classe 1, chargée avec un peptide antigénique. Figure issue de Bailey et al<sup>21</sup>.

En juin 2023, 37 619 allèles HLA sont recensés. Ce nombre important de polymorphismes résulte de différents mécanismes de mutations ponctuelles, conversions géniques et recombinaisons homologues, est à mettre en parallèle avec l'avantage sélectif que certains allèles ont pu permettre au cours de l'évolution<sup>22</sup>, principalement de par une capacité accrue à présenter antigène infectieux. Aussi, on comprend la relation entre l'origine géographique d'une population d'individus et les phénotypes HLA observés dans cette population. A l'opposé de ces avantages, il est aussi établi que certains phénotypes de CMH vont être un facteur de susceptibilité, voire explicatif de certaines pathologies comme le diabète de type 1, la sclérose en plaque, ou la maladie cœliaque<sup>23</sup>.

Ce polymorphisme, intense à l'échelle allélique, ne s'accompagne pas d'une telle variabilité protéique. A titre d'exemple, 7 894 allèles HLA-A sont décrites, menant à 4 618 protéines différentes. De plus, parmi les variants induisant une modification de la séquence d'acides aminés, une proportion importante concernent des zones de la poche à peptides, enfouie au sein de la molécule, permettant de moduler le répertoire de présentation peptidique.

### 1.3.2 Polymorphisme HLA, CREG

Pour que la molécule HLA du donneur soit potentiellement génératrice d'une allo-réactivité, il faut que sa structure soit différente de celle du receveur. Ceci nécessite que la différence de séquence génétique entre les deux gènes de la molécule HLA concernée induise une différence de séquence d'acides aminés, et que ces acides aminés soient accessibles au paratope de l'anticorps anti-HLA en étant exposés à la surface de la molécule HLA.

Bien que le polymorphisme HLA soit important, des séquences communes sont fréquentes entre deux molécules HLA. Aussi, une immunisation contre un de ces épitopes commun entre plusieurs molécules HLA (épitopes dits partagés ou publics) va induire une poly-réactivité anti-HLA d'un même anticorps, ciblant des molécules HLA pourtant non rencontrées par le receveur. A titre d'exemple, l'épitope 62GE est partagé entre les molécules HLA A\*02 :01, A\*02 :03, A\*02 :06, mais aussi avec les molécules A\*03 :23 et certaines molécules B\*57 et B\*58 (**Figure 3**). Ces réactivités croisées définissent des groupes CREG (cross-reactive groups). A contrario, certains épitopes sont « privés » et restreints à une seule molécule HLA.

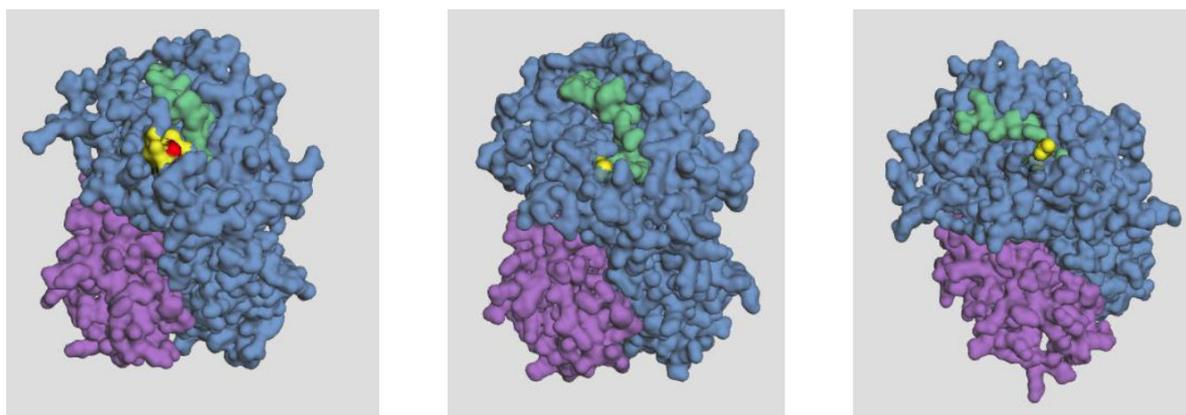


Figure 3 : Epitope partagé 62GE entre trois molécules HLA différentes : A\*02:01, A\*33:01 et B\*57:01. La chaîne alpha est colorée en bleu, la chaîne  $\beta 2$  microglobuline en violet, l'épitope 62GE en jaune.

La description des séquences d'acides aminés ainsi que les études de cristallographie 3D puis bio-informatiques de conformation 3D ont abouti à la création puis à l'enrichissement de l'algorithme HLAMatchmaker<sup>24,25</sup>. Ce dernier définit des épitopes appelés épлеты, correspondant à des triplets d'acides aminés immunogènes, en intégrant les notions de conformation 3D et d'exposition à la surface de la molécule HLA. L'ajout d'un épлет à l'algorithme HLAMatchmaker n'est fait qu'après confirmation expérimentale de l'existence d'un anticorps ciblant celui-ci.

La recherche d'anticorps anti-HLA par *Single antigen* permet d'associer une intensité de fluorescence à chaque bille coatée avec une molécule HLA. En appliquant l'outil HLAMatchmaker et ces données, il est possible de recouper les informations à un niveau épilétiq. Ainsi, devant l'identification de plusieurs anticorps anti-HLA, il est possible de dichotomiser une immunisation dirigée contre un épélet partagé ou une immunisation dirigée contre plusieurs épélets privés. Dans le cadre de la transplantation d'organe solide, il est aussi possible d'intégrer le typage HLA du receveur et du donneur, permettant ainsi d'identifier l'immunisation anti-épélet anti-donneur et l'immunisation rapportée à une « *third party* ». Dans le même esprit, des outils sont développés pour calculer la charge en nouveaux épélets que pourrait représenter un greffon chez un receveur.

Ces outils permettent une meilleure caractérisation d'une potentielle poly-immunisation mise en évidence par des techniques de dosages d'anticorps anti-HLA. Néanmoins, l'immunogénicité intrinsèque de ces *mismatches* d'épélets est difficilement évaluable. En effet, ces algorithmes n'ont une approche que structurale de la molécule HLA, ne prenant pas en compte d'autres données telles que les caractéristiques électrostatiques, la présentation antigénique indirecte ou le masquage potentiel d'un épélet par un anticorps de spécificité anti-épélet physiquement proche<sup>26</sup>. Pour ces raisons, entre autres, le bénéfice sur la survie du greffon et l'utilisation pratique de ces algorithmes sont limitées<sup>27</sup>.

### 1.3.3 Reconnaissance de l'antigène par un BCR

Pour qu'une protéine puisse être présentée au lymphocyte T, elle doit être endocytée par une CPA, clivée en courtes chainettes d'acides aminés, puis chargée dans le sillon de la molécule HLA. Ainsi, le récepteur du lymphocyte T (TCR) reconnaît une protéine dégradée dans une conformation non-native<sup>28</sup>.

A contrario, le récepteur du lymphocyte B (BCR) reconnaît un antigène soluble et non clivé. Le BCR correspond à l'isoforme transmembranaire d'une immunoglobuline (Ig), et possède donc les mêmes caractéristiques en termes de reconnaissance de l'antigène.

Cette immunoglobuline est composée de deux chaînes lourdes liées entre elles par un pont disulfure et de deux chaînes légères, chacune reliée à une chaîne lourde par un pont disulfure. Les chaînes lourdes sont composées d'un nombre variable de domaines constants (CH) selon le sous-type d'immunoglobuline et d'un domaine variable (VH). Les chaînes légères sont composées d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL). On peut définir deux

unités fonctionnelles de l'immunoglobuline : le fragment Fab (*antigen binding*) et le fragment Fc (*crystallizable*). Ces deux fragments vont respectivement jouer un rôle d'activation des mécanismes des effecteurs (e.g. recrutement du C1q) et d'interaction avec la cible antigénique (**Figure 4**).

Au sein des régions V de chaque chaîne du fragment Fab, les variations de séquences ne sont pas régulièrement réparties. En effet, la majorité des variations des acides aminés sont concentrées sur trois zones hypervariables appelée CDR (*complementarity determining region*). Chacune des chaînes du fragment Fab va être organisées en plusieurs boucles, les 6 régions CDR étant regroupées à l'extrémité extérieure de ces replis. La poche délimitée par les 6 CDR est donc sujette à une variabilité d'acides aminés importante et forme le paratope, zone d'interaction avec l'antigène. Au centre du paratope est située la région CDR 3 de la chaîne lourde (CDR-H3), région d'interaction majeure avec l'antigène, alors que les autres CDR dessinant le pourtour de cette poche joueraient principalement un rôle de stabilisation de la liaison épitope-CDR-H3. La structure du paratope conduit à une taille de surface de contact avec l'épitope d'une vingtaine d'acides aminés<sup>29</sup>.

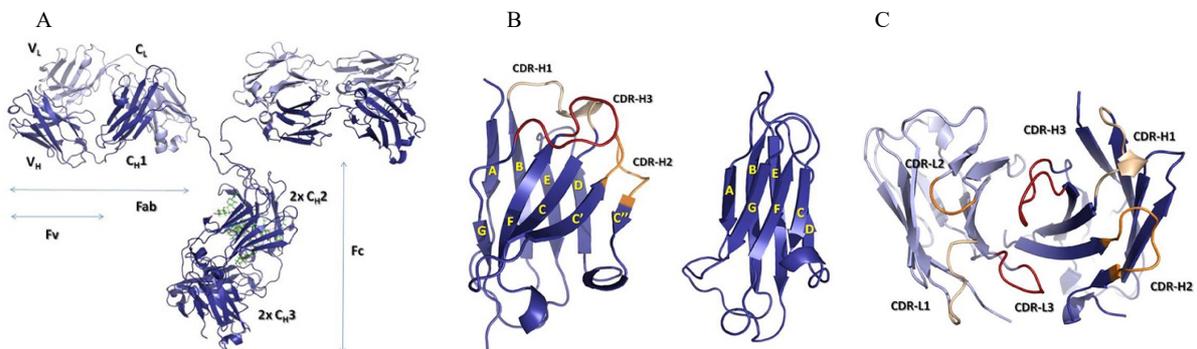


Figure 4 : structure d'une immunoglobuline (Ig). D'après Finlay<sup>30</sup>. A : chaînes lourdes et légères d'une IgG. B : représentation d'un domaine VH (gauche) et d'un domaine CH d'IgG (droite). C : représentation du fragment Fab centrée sur le site de liaison à l'antigène.

### 1.3.4 Mise en place d'une réponse humorale en transplantation rénale

La connaissance des mécanismes de mise en place d'une réponse humorale sont essentiellement issues des études en pathologie infectieuse. Aussi, il n'est pas confirmé expérimentalement que tous les mécanismes décrits ci-dessous s'appliquent dans le contexte d'une allo-immunisation anti-HLA. Après exposition à un allo-antigène HLA, un processus de maturation lymphocytaire

B va s'effectuer, aboutissant à la génération de lymphocytes B mémoires allo-réactifs responsable d'une réponse humorale prolongée<sup>31</sup>.

Lors de la première exposition à un allo-antigène HLA, celui-ci va être drainé au sein d'un organe lymphoïde secondaire (ganglion lymphatique, rate, plaque de Peyer) où il sera chargé sur une CPA : cellule folliculaire dendritique, macrophage ou cellule dendritique selon la taille de l'antigène et l'organe lymphoïde secondaire. L'architecture particulière de ces organes lymphoïdes secondaires permet de maximiser la concentration et l'exposition de l'antigène à un lymphocyte B naïf IgM<sup>+</sup> ayant un BCR de faible affinité pour l'antigène. Lorsqu'un lymphocyte B naïf ne rencontre pas d'antigène pour lequel il présente une affinité, il recircule jusqu'à un autre organe lymphoïde secondaire<sup>32,33</sup>.

La rencontre antigène/BCR va induire différents réarrangements à la membrane cellulaire (e.g dimérisation des protéines transmembranaires *Igalpha/Igbeta*) permettant la formation d'un complexe transmembranaire transduisant le signal d'activation. Cette activation lymphocytaire va induire l'expression de molécules de costimulation (e.g CD86/CD80) et d'adhésion, en plus de la transduction de gènes du cycle cellulaire. En parallèle, le complexe Ag/BCR va être internalisé afin que l'antigène soit apprêté et chargé sur une molécule HLA de classe II qui sera adressée à la membrane cellulaire, afin de présenter le peptide antigénique à un lymphocyte pré-TFH.

En premier lieu, cette interaction va permettre de délivrer au pré-TFH un ensemble de signaux (signaux de costimulation B, signal autocrine IL-21) qui, associés aux signaux issus de l'environnement cellulaires comme l'IL-6, vont aboutir à la maturation du TFH de phénotype CD40L<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>, ICOS<sup>+</sup><sup>34,35</sup>.

Ensuite, deux situations vont pouvoir se produire selon les caractéristiques de l'interaction B naïf activé/pré-TFH<sup>36,37</sup> (**Figure 5**).

Les lymphocytes B ayant la plus forte affinité pour l'antigène vont avoir une interaction accrue avec le TFH (nombre de BCR impliqués et durée du contact), et le lymphocyte suivra un processus de maturation lymphocytaire dit « extra-folliculaire » ne passant par l'étape de formation d'un centre germinatif<sup>38-40</sup>. Aussi, ces lymphocytes ne subissent classiquement pas de commutation de classe et leur immunoglobuline reste une IgM. Néanmoins, le TFH correspondant va pouvoir induire un certain degré d'hypermutation somatique<sup>41</sup>, permettant dans certains cas une amélioration de la spécificité du BCR pour l'antigène. De cette voie

peuvent aboutir deux types cellulaires : le plasmablaste extra-folliculaire à courte durée de vie, et le lymphocyte B mémoire pré-germinatif<sup>42</sup>. Le plasmablaste extrafolliculaire à courte durée de vie garde une capacité de division et sécrète des anticorps ayant une affinité pour l'antigène comparativement plus faible par rapport à celle des lymphocytes post-centre germinatif, pouvant se traduire par une certaine forme de poly-reactivité antigénique, une courte demi-vie (5 jours), et un fort pouvoir d'activation du complément. Le comportement du lymphocyte B mémoire pré-germinatif devant une restimulation antigénique n'est pas encore identifié, entre génération de plasmablaste IgM<sup>+</sup> ou possible orientation vers un processus de formation de centre germinatif.

Dans le cas d'une affinité plus faible pour l'antigène, le lymphocyte B va s'orienter avec le pré-TFH vers la génération d'un centre germinatif, où ces deux cellules sont mûrifier. Cette sélection de paratope pré-centre germinatif est une première étape de l'oligoclonalité observée post-centre germinatif<sup>43</sup>. Ce dernier se met en place en une quinzaine de jours, et comporte schématiquement deux zones : la zone sombre et la zone claire.

Au sein de la zone sombre, les lymphocytes B (phénotype CXCR4<sup>hi</sup>CD83<sup>low</sup>CD86<sup>low</sup>) vont fortement proliférer et subir une hypermutation somatique. L'hypermutation somatique est due à l'action de l'enzyme *activation-induced cytidine deaminase* (AID). Celle-ci va introduire de manière irréversible des variants dans les séquences VH et VL du gène des immunoglobulines. Ces variants aléatoires vont induire une modification du paratope, modulant ainsi son affinité. Dans un second temps, le lymphocyte B de phénotype CXCR4<sup>low</sup>CD83<sup>hi</sup>CD86<sup>high</sup> va migrer dans la zone claire du centre germinatif, où il rentre en contact avec les antigènes présentés par les cellules folliculaires dendritiques. Si l'intensité d'interaction entre ce variant de paratope et l'antigène est insuffisante, le lymphocyte B va soit retourner en zone sombre pour subir un nouveau cycle d'hypermutation somatique, soit rentrer en apoptose. Dans le cas contraire, il va pouvoir endocyter cet antigène et le présenter à un TFH. Plus le paratope sera affiné, plus il sera à même de capturer l'antigène, et d'interagir intensément avec le TFH (plus grande quantité d'antigènes présentés et plus longs temps de contact), délivrant ainsi les signaux de costimulation nécessaires à la différenciation du lymphocyte B en lymphocyte B mémoire ou en plasmablaste<sup>44-46</sup>. En plus de la maturation du paratope, le fragment Fc de l'immunoglobuline va subir une commutation de classe. Jusqu'à récemment, il était considéré que celle-ci s'effectuait au sein du centre germinatif sous l'influence des TFH. Néanmoins, des données récentes sur des modèles murins suggèrent que ce switch de classe débute dès l'interaction initiale B/T, avant la formation du centre germinatif, et pourrait donc aussi

concerner les lymphocytes B de différenciation extra-folliculaire<sup>47</sup>. Les anticorps sécrétés par des lymphocytes B ayant maturés par un centre germinatif ont donc un Fab de haute affinité pour l'antigène, ayant accumulé de nombreux variants des chaînes V, et un Fc avec des fonctions effectrices optimisées non-IgM.

D'un point de vue exploratoire, le séquençage V(D)J permet donc d'étudier le répertoire des BCR et les caractéristiques pré- ou post-centre germinatif du lymphocyte B via l'étude de la clonalité du BCR et du nombre de variants accumulés dans les séquences V<sup>48</sup>.

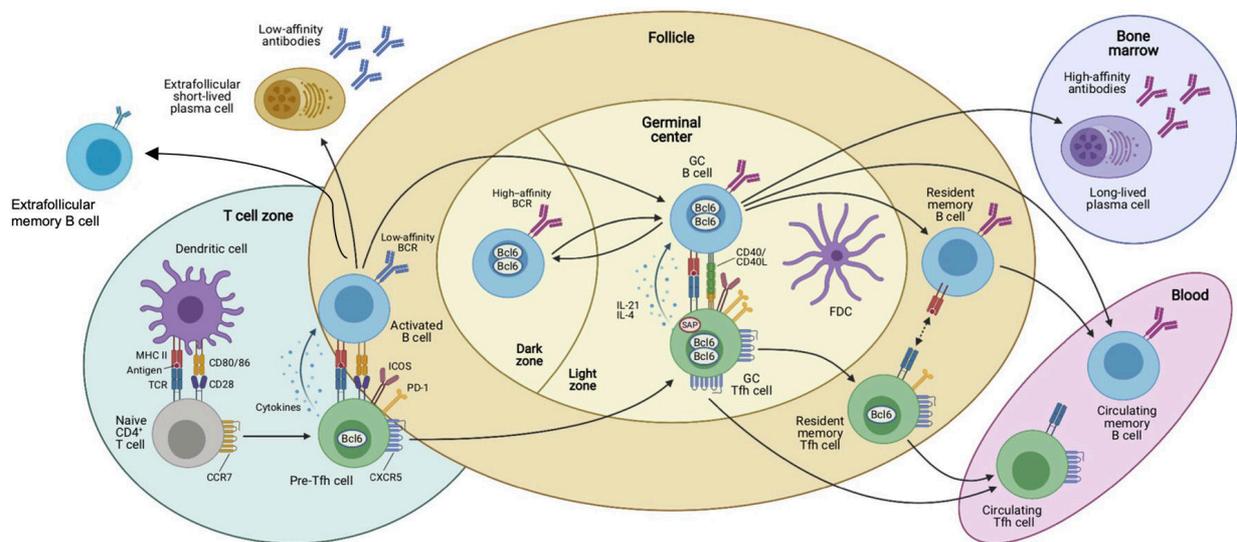


Figure 5 : mise en place de la réponse humorale. Figure d'après Baumjohan<sup>49</sup>.

### 1.3.5 Cellules effectrices de la réponse humorale mémoire post-centre germinatif

Le lymphocyte B activé ayant un BCR suffisamment affiné pour permettre une interaction forte et prolongée avec le lymphocyte TFH va quitter le centre germinatif. Deux voies de différenciation B sont alors chronologiquement rencontrées : le B mémoire et le plasmablaste.

En premier lieu, les lymphocytes B mémoires vont être générés de manière précoce par le centre germinatif<sup>50</sup>. Comparativement aux plasmablastes post-centre germinatif, ces B mémoires vont avoir un BCR moins affiné, se traduisant par un certain degré de possibilité d'adaptation face à des variants de l'antigène, comme cela a été montré en immunologie anti-infectieuse<sup>51</sup>.

Ces lymphocytes B mémoires vont représenter un *pool* de cellules qui, après restimulation antigénique ultérieure, vont pouvoir se différencier en plasmablaste puis en *short lived plasma*

*cell* (SLPC) sécréteurs d'anticorps, soit générer un nouveau centre germinatif où de nouveaux variants du BCR peuvent survenir<sup>52</sup>. Il a été montré que deux populations de B mémoires peuvent être identifiées : les IgG<sup>+</sup> qui se polariseront en SLPC, et les IgM<sup>+</sup> qui pourront former un nouveau centre germinatif<sup>53</sup>.

Plus tardivement, les lymphocytes B dont le BCR aura subi le plus de variants augmentant leur affinité vont se différencier en plasmablastes et gagner la circulation sanguine. Certains de ces plasmablastes vont s'établir dans une niche médullaire, permettant leur différenciation en *long lived plasma cell* (LLPC) de phénotype CD19<sup>low</sup>CD20<sup>-</sup>CD38<sup>high</sup> et leur survie prolongée. Ces cellules permettent le maintien à long terme d'une sécrétion d'anticorps. Il n'est néanmoins pas parfaitement établi quelle proportion de ces cellules est issue d'une survie longue de plusieurs années, et quelle proportion est régulièrement renouvelée à partir d'un *pool* de B mémoires. En outre, la durée de survie de ces cellules est elle-même sujette à plusieurs facteurs comme la nature de l'antigène et l'environnement des niches médullaire<sup>54</sup>. Leur phénotype CD20<sup>-</sup> explique leur non-sensibilité au Rituximab et leur localisation dans les niches médullaires induit un certain degré de résistance aux immunosuppresseurs. De plus, leur non-circulation les rend difficilement évaluables. En transplantation, ces cellules étant responsables d'une sécrétion durable d'anticorps anti-HLA<sup>55</sup>, elles sont ciblées par des protocoles de désensibilisation, en particulier via l'utilisation de Daratumumab<sup>56,57</sup>.

Au total, le pool de lymphocytes B mémoire va apparaître comme relativement polymorphe, composé de cellules issues de plusieurs générations de centres germinatifs et ayant des affinités de BCR variées. Le répertoire des anticorps sécrétés par les SLPC issus de ces lymphocytes B présente donc une certaine part de variabilité.

Le répertoire LLPC est lui plus restreint et potentiellement plus affiné, alimenté par des cellules à longue durée de vie générées lors du 1<sup>er</sup> contact avec l'antigène, mais aussi issues de nouveau centre germinatif généré à partir d'un B mémoire lors d'une ré-exposition à l'antigène<sup>58</sup>. En transplantation d'organes solides, situation où l'antigène persiste au long-cours, il n'est pas déterminé si les lymphocyte B mémoires vont ré-entrer dans les centres germinatifs préexistants et donc les maintenir, ou s'ils génèrent un nouveau centre germinatif. De plus, la mise en place de structures lymphoïdes dans des organes lymphoïdes dits tertiaires a été rapportée au cours du rejet humoral<sup>59,60</sup>. Il n'est pas établi si ces structures lymphoïdes sont générées à partir de lymphocytes B naïfs récemment activés ou à partir de lymphocytes B mémoires allo-réactifs venant peupler l'organe. Un début de réponse pourrait être apporté par la publication récente

d'une étude mettant en évidence, dans un modèle murin, que les lymphocytes B infiltrant le greffon lors d'un processus de rejet ont un transcriptome différent de celui des lymphocytes B issus du centre germinatif. Néanmoins ces lymphocytes B ont des capacités d'activation des TFH restreintes et la formation de centres germinatifs à proprement parler n'a pas été observée<sup>61</sup>.

### **1.3.6 Influence de l'antigène sur la différenciation lymphocytaire B**

Plusieurs facteurs influencent de la mise en place de la réponse humorale mémoire.

En immunologie anti-infectieuse, il a été décrit que la fréquence et l'affinité pour un antigène des précurseurs B influencent la capacité à générer un centre germinatif<sup>62</sup>. Concernant les caractéristiques de l'antigène, sa nature et son éventuel couplage à une protéine de la membrane bactérienne modulent la réponse humorale<sup>63</sup>. La taille de l'antigène modifie aussi les modalités de sa présentation à un lymphocyte B. En effet, les antigènes de petite taille vont diffuser librement au sein des ganglions lymphatiques où ils seront présentés directement au lymphocyte B, d'autres plus volumineux comme les complexes immuns sont captés par les macrophages et présentés au lymphocyte B par l'intermédiaire de cellules dendritiques folliculaires<sup>31</sup>. Certains PAMPS (*pathogens associated molecular patterns*) comme les motifs CpG peuvent aussi moduler la réponse humorale<sup>64</sup>. Le nombre de sites de liaison possibles sur l'antigène impacte aussi la différenciation B<sup>65</sup>.

Dans le contexte de l'immunisation HLA, de tels paramètres sont également susceptibles d'influencer la différenciation lymphocytaire B : charge antigénique variable selon l'évènement immunisant (transfusion, grossesse, transplantation), nombre de *mismatches* d'éplets entre donneur et receveur, et persistante des allo-antigènes responsable d'une stimulation antigénique chronique.

### **1.3.7 Patients hyperimmunisés en transplantation rénale**

Dans le système d'allocation des greffons en France, un patient est considéré comme hyperimmunisé lorsqu'il présente une immunisation contre plus de 85% des greffons des 5 dernières années. Aussi, le terme « hyperimmunisé » ne correspond pas ici à une définition biologique pure.

Ces patients dits hyperimmunisés sont de plus en plus fréquents sur la liste d'attente de transplantation, représentant environ 25% des patients inscrits sur liste en 2017. Ceci peut être expliqué par exemple par l'allongement de la durée de vie des patients transplantés, les exposant

au risque de nécessiter une nouvelle transplantation, ou par le développement de nouvelles thérapeutiques permettant de faire face à cette hyper-immunisation chez des patients qui jusqu'alors n'étaient pas inscrits sur la liste d'attente. Enfin, du fait d'une définition reposant sur la recherche d'anticorps anti-HLA, les techniques de dosage de ces anticorps influent sur la prévalence des patients hyperimmunisés, avec une augmentation significative de leur nombre depuis l'utilisation de tests en *Single antigen*.

Trois grands phénotypes de patients peuvent être suspectés :

- des patients immunisés contre de nombreux épitopes, interdisant progressivement de plus en plus de donneurs potentiels,
- des patients présentant une immunisation contre une molécule HLA très présente dans la population dont est issu le greffon proposé (exemple : A\*02 :01 présent chez plus de 25% de la population caucasienne)
- des patients immunisés contre un épitope partagé par de nombreuses molécules HLA.

### 1.3.8 Origines du répertoire anti-HLA

Trois situations classiques vont conduire à la mise en place d'une réponse humorale anti-HLA : la transplantation d'organe, la grossesse, et les transfusions sanguines.

A côté de ces mécanismes, la cross-réactivité semble jouer un rôle important dans l'extension du répertoire anti-HLA.

D'une part, des patients naïfs d'évènements immunisants mais présentant des anticorps anti-HLA sont décrits<sup>66</sup>. Sur une cohorte mexicaine de 424 donneurs de sang hommes sans antécédents déclarés d'évènements immunisants, des anticorps anti-classe I, anti-classe II, ou les deux étaient retrouvés dans respectivement 42%, 11% et 12% des sujets en *Single antigen*<sup>67</sup>. L'hypothèse principale pour expliquer la présence de ces anticorps est celle de la réactivité croisée, essentiellement via les analogies de motifs pouvant être retrouvés entre antigènes infectieux et molécules HLA. A titre d'exemple, les polypeptides de certaines souches de l'HSV ont une homologie de séquence élevée avec des molécules HLA-B et -Cw. D'autres sources de cross-réactivité ont été explorées concernant les antigènes environnementaux et alimentaires. En transplantation rénale, il a été montré que ces anticorps dits « naturels » sont pathogènes au même titre que les anticorps anti-HLA « classiques »<sup>68</sup>.

D'autre part, en considérant une cellule B sécrétant un anticorps à l'affinité restreinte à un seul épitope, il a été vu précédemment que des éplets peuvent être partagés entre plusieurs molécules HLA<sup>69</sup>.

De plus, la physiopathologie de mise en place d'une réponse humorale post-GC soutient l'hypothèse que le BCR d'un lymphocyte B mémoire peut présenter une affinité moins sélective, entraînant une relative poly-réactivité<sup>70,71</sup>.

Enfin, on peut noter l'existence d'anticorps dirigés contre des antigènes HLA dénaturés, exposant des éplets cryptiques non-exposés à la surface de la molécule en situation physiologique, et dont la pathogénicité en clinique n'est donc pas certaine<sup>72</sup>.

### 1.3.9 Hétérogénéité des anticorps anti-HLA

En transplantation, l'évaluation du risque de rejet humoral, que ce soit *a priori* ou après transplantation, repose principalement sur la recherche d'anticorps anti-HLA d'isotype IgG<sup>73</sup>. Pourtant, la recherche et l'interprétation de ces anticorps souffrent de nombreuses limites.

Tout d'abord, les tests d'identification des DSA anti-HLA, y compris en *Single antigen*, présentent des limites de sensibilité et de technicité : seuils de MFI (*median fluorescence intensity*) variables d'un laboratoire HLA à un autre, seuil de positivité défini par rapport au bruit de fond moyen des contrôles négatifs. Par ailleurs, plusieurs éléments peuvent moduler la fixation d'un anticorps à la bille coâtée : interférences médicamenteuses (par exemple fausse positivité après administration d'IgIV), compétition IgM/IgG et effet prozone. Enfin, les antigènes coâtés sur les billes peuvent se dénaturer ou présenter des éplets cryptiques lors de leur fixation à la bille, exposant des éplets contre lesquels un anticorps pourrait être affiné, alors que ces éplets ne seraient pas réellement exposés au receveur. De la même façon, il a été décrit des anticorps dirigés contre des cellules apoptotiques, ne revêtant pas de ce fait de caractère pathogène pour le greffon<sup>74-80</sup>.

De plus, le typage HLA du donneur peut être incomplet en termes de *loci* ou de typage sérologique ou moléculaire, ne permettant pas de classer un anticorps anti HLA comme DSA ou non. Enfin, des lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques peuvent être mis en évidence sans anticorps anti-HLA circulant détectable<sup>81</sup>.

Enfin, le *Single antigen* permet de mettre en évidence une réactivité dirigée contre un antigène, mais ne renseigne pas sur l'affinité de cette réactivité. De même, les capacités effectrices de

l'anticorps, et donc leur potentielle pathogénicité, n'est pas évaluée en pratique : sous classe d'immunoglobuline, capacité à activer le complément ou à recruter les cellules effectrices de l'immunité. De plus, devant un large répertoire de réactivité anti-HLA, il n'est aujourd'hui pas possible d'inférer le type de réponse B allo-réactive, allant aux extrêmes d'une poly-réactivité d'un nombre restreint de clones B (BCR peu mutés et potentiellement peu affins), à une mono-réactivité d'un nombre élevé de clones B (BCR sélectionnés et potentiellement plus affins). Ces profils de réactivité différentielle pourraient être liés à une mise en place de la réponse B différente et sous l'influence du niveau d'exposition antigénique et associés à une pathogénicité différentielle ultérieure.

Malgré ces limites, la stratégie d'allocation des greffons repose sur ce dosage d'anticorps anti-HLA, et impacte fortement la durée d'attente sur liste de transplantation. En effet, au sein de la cohorte Nord-Ouest de patients hyperimmunisés, chaque augmentation du pourcentage de taux de greffons incompatibles s'accompagne d'un allongement important du temps d'attente sur liste (**Figure 6**).

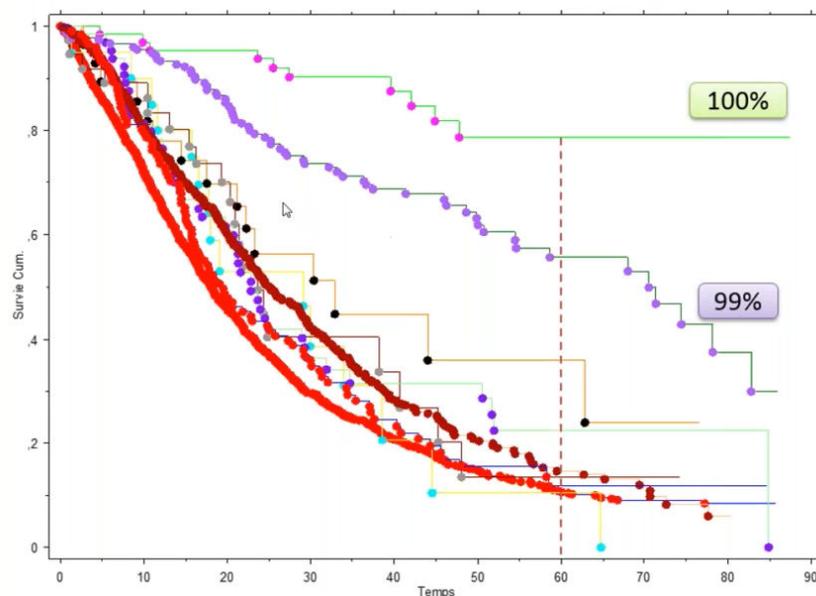


Figure 6 : temps d'attente (mois) sur liste de transplantation rénale des patients hyperimmunisés de la cohorte Nord-Ouest (Amiens, Caen, Lille, Rouen).

### 1.3.10 Hétérogénéité des cellules sécrétrices d'anticorps

L'évaluation du risque immunologique repose donc sur la recherche d'anticorps anti-HLA. Néanmoins, le lien de causalité entre mise en évidence d'un DSA et conséquences cliniques (rejet humoral, perte de greffon) est tenu<sup>82</sup>. Au-delà des limites techniques et d'interprétation décrites ci-dessus, ceci pourrait être en partie expliqué par les caractéristiques intrinsèques des

DSA en termes d'affinité et de capacités effectrices. Ces caractéristiques sont soumises à une forte hétérogénéité chez un même patient, qui n'est pas évaluée en pratique clinique.

Au cours de la réponse allo-immune, il s'avère que les cellules sécrétrices d'anticorps sont issues d'une population hétérogène de lymphocytes B : en pré-centre germinatif : SLPC et SLPC redifférenciés depuis les B mémoires pré-germinatifs, sécrétant principalement des IgM du fait d'un faible taux de switch isotypique. En post-centre germinatif : LLPC issus du centre germinatif, SLPC issus des B mémoires post-germinatif et cellules issues du centre germinatif généré à partir des B mémoires  $IgM^+CD27^+$ , sécrétant principalement des IgG de forte affinité pour l'antigène. L'ensemble de ces cellules est hétérogène en termes de phénotype, de nombre de variants accumulés dans le BCR, et d'expression génique. L'impact de ces différents contingents cellulaires sur l'incidence du rejet reste à déterminer. En effet, il apparaît que les anticorps IgM ne semblent pas avoir un impact en termes d'incidence de rejet humoral ou de survie de greffon. Ceci questionne sur leur pathogénicité en situation clinique de transplantation, mais aussi sur la fonctionnalité des cellules responsables de leur synthèse<sup>83-88</sup>.

Enfin, des lymphocytes B mémoires dits atypiques ont été décrits dans le cadre des infections chroniques, les B mémoires avec un phénotype  $CD27^+CD21^{low}$ , et les B mémoires *tissue-like*  $CD27^-CD21^{low}CD11c^{+89-91}$ . Les fonctions précises de ces cellules B mémoires atypiques ne sont pas élucidées, bien que trois d'entre elles soient déjà identifiées : caractéristiques d'épuisement, sans sécrétion d'anticorps mise en évidence *in vivo* et associée à l'expression de molécules inhibitrices, des capacités de différenciation moins sensibles à l'antigène, et des capacités de présentation antigénique.

### 1.3.11 Lymphocytes B mémoires en transplantation rénale

Malgré le rationnel physiopathologique poussant à étudier les lymphocytes B mémoire en transplantation rénale, les études dédiées à cette condition particulière sont peu nombreuses. Ceci peut être expliqué par la subtilité à mettre en évidence ce contingent cellulaire *in vivo*<sup>92</sup>, par les particularités du modèle de transplantation d'organe solide, et par la difficulté à construire des études cliniques reliant des conditions immunologiques particulières chez des patients hétérogènes en termes de caractéristiques démographiques, d'immunisation et de régime d'immunosuppresseurs, à des critères cliniques relevant : incidence du rejet et perte du greffon rénal.

Initialement, des structures lymphoïdes ont pu être mises en évidence sur des biopsies de greffon, au sein desquelles des lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> sont identifiés<sup>93</sup>.

Ensuite, une étude évaluant les lymphocytes circulants des patients transplantés rénaux et des volontaires sains sur une période de 5 ans en post-transplantation a montré que les patients transplantés présentaient un taux de lymphocytes B circulants diminué de près de 50% par rapport aux volontaires sains. Au sein de ces lymphocytes B, les lymphocytes B mémoires étaient 1,5 fois plus représentés chez les patients transplantés que chez les volontaires sains<sup>94</sup>. Des résultats comparables ont été retrouvés dans une étude ciblant spécifiquement les 6 premiers mois de la transplantation<sup>95</sup>.

Dans la circulation périphérique, plusieurs équipes ont identifié ces lymphocytes B mémoires sécréteurs d'anticorps anti-HLA. Han *et al.* ont ainsi mis en évidence après cultures cellulaires B la production d'anticorps anti-HLA, préférentiellement IgG mais aussi IgM, et que ces anticorps sont préférentiellement issues des cultures de lymphocytes B CD27<sup>+</sup> comparativement aux cultures de lymphocytes B CD27<sup>-</sup><sup>96</sup>.

Par la suite, plusieurs groupes ont réussi à identifier, à partir de sang périphérique et après cultures cellulaires, des lymphocytes B mémoire HLA-spécifiques via ELISPOT<sup>97-99</sup>. Ces lymphocytes B mémoires conduisent à la sécrétion d'anticorps anti-HLA, et leur présence est dépendante de l'évènement immunisant antérieur<sup>81</sup>.

En termes de conséquences cliniques, en utilisant l'ELISPOT, une autre équipe a évalué la présence de lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques chez des patients immunisés. Avant transplantation, les auteurs ont pu montrer que ces lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques sont présents alors même l'anticorps anti-HLA correspondant peut ne pas être mis en évidence dans le sérum. Après transplantation, les patients présentant un AMR plus sévère avaient une fréquence plus élevée de ces lymphocytes B mémoires HLA-spécifique<sup>100</sup>. Ces résultats ont été confirmés dans une étude multicentrique prospective, mettant en évidence que la détection de lymphocytes B mémoires allo-réactifs est un facteur de risque de développer un rejet humoral (Odd Ratio = 47.2 [10.0-221.3],  $p < 0.001$ ) et a un meilleur pouvoir prédictif d'incidence du rejet que la détection de DSA<sup>101</sup>. Enfin, une autre étude a réussi à mettre en évidence un lien entre les anticorps anti-HLA issus spécifiquement des lymphocytes B mémoires en pré-transplantation et l'incidence et la gravité de lésions du rejet humoral<sup>102</sup>.

Au total, il apparaît que les lymphocytes B mémoires peuvent être identifiés dans le greffon et dans la circulation périphérique, y compris d'une manière HLA-spécifique, que les

caractéristiques de l'évènement immunisant sous-tendent leur présence, et qu'ils semblent impacter l'incidence de rejet et la perte de greffon rénal. Néanmoins, alors que ces lymphocytes B mémoires sont bien décrits en immunologie anti-infectieuse, leur caractérisation précise en transplantation n'a pas été effectuée.

## 1.4 Le rejet humoral

### 1.4.1 Les anticorps anti-HLA comme effecteurs du rejet humoral

Les principaux effecteurs du rejet humoral sont les anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon (DSA). Ces anticorps, de par leur taille, ne peuvent traverser l'endothélium vasculaire sain et non perméabilisé du greffon, et interagissent donc avec leur cible à la surface de l'endothélium<sup>103</sup>. Selon les caractéristiques de ces anticorps (type d'immunoglobuline, sous classe IgG...) cette liaison va s'accompagner de différents mécanismes conduisant à la lyse de la cible cellulaire.

La fixation du fragment Fab de l'immunoglobuline à la cellule endothéliale va induire l'activation de cette cellule, se traduisant par des modifications de phénotype et de fonction : vasoconstriction, état pro-coagulant et pro-inflammatoire, expression de molécule HLA de classe II à leur surface<sup>104</sup>.

La fraction constante de l'immunoglobuline va elle être impliquée dans deux autres mécanismes (**Figure 7**).

D'une part, le fragment Fc va permettre le recrutement des cellules de l'immunité innée via leur récepteur FcγR. Les différences d'expression de ces FcγR à la surface de la cellule ainsi que leur sous-type (FcγRIIA, IIIB, etc.) modulant leur capacité à interagir avec l'immunoglobuline fixée à sa cible explique une pathogénicité variable de ce mécanisme<sup>105</sup>. Les cellules de l'immunité innée recrutées et recevant un signal activateur via leur FcγR vont contribuer à l'ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). L'afflux de ces cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, lymphocytes NK) dans la microcirculation vont définir les lésions d'inflammation microvasculaire.

D'autre part, le recrutement du C1q à la fraction constante de l'immunoglobuline va induire l'activation de la cascade du complément, aboutissant *in fine* à la perforation de la membrane cellulaire endothéliale par le complexe d'attaque membranaire. En transplantation rénale, le lien entre les capacités variables de recruter le C1q selon la sous-classe IgG et la survie du

greffon a été démontré<sup>106</sup>. Le témoin histologique de cette activation est le dépôt de C4d au niveau des capillaires péritubulaires.

Ces agressions endothéliales sont évaluées par l'identification histologique des lésions de glomérulite, de capillarite péritubulaire, d'artérite, et de dépôts de C4d. Une fois la membrane basale glomérulaire lésée, le processus de régénération va conduire à un aspect multi-lamellé de la membrane basale visualisable en microscopie électronique, puis à des lésions dites en doubles contours visualisable en microscopie optique (score de Banff cg). Ces lésions sont irréversibles et catégorisent le rejet humoral en chronique.

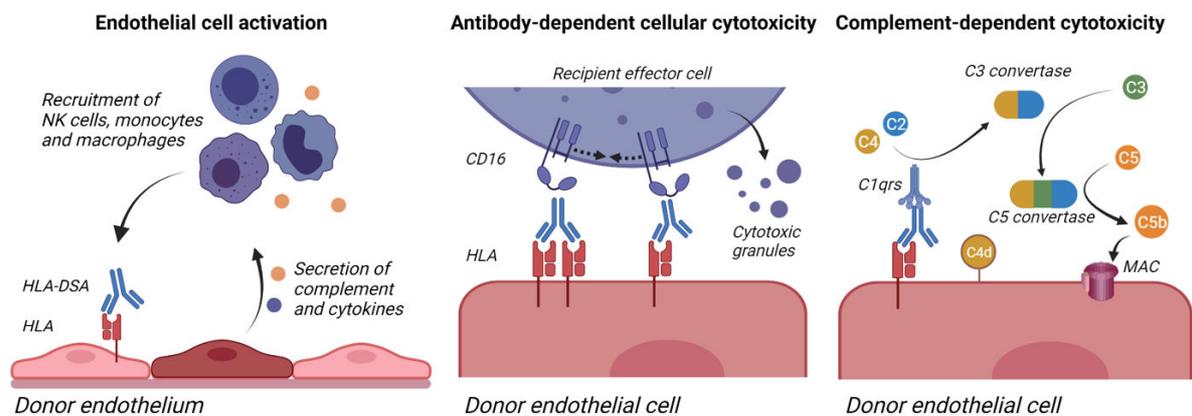


Figure 7 : mécanismes de pathogénicité d'un anticorps anti-HLA au cours du rejet humoral. Figure d'après Callemeyn<sup>107</sup>.

A côté de ce tableau typique de rejet humoral, d'autres situations ont été décrites *in vitro* et *in vivo*.

En 2013, l'entité AMR sans dépôts de C4d a été reconnue par les recommandations de Banff<sup>108</sup>. Ces biopsies présentent des lésions d'inflammation microvasculaire associées à la présence de DSA. Les arguments en faveur du rejet humoral sont, entre autres, des lésions de dédoublements membranaires rattachées à une étiologie humorale du fait de leur association à la présence de DSA, sans autres causes de lésions cg, et sans dépôts de C4d<sup>109</sup>, et une signature transcriptomique équivalente entre biopsies AMR C4d+ et C4d-, suggérant des processus physiopathologiques similaires<sup>110</sup>. Par ailleurs, il apparaît que la relation entre ces dépôts de C4d et la survie de greffon est modeste<sup>111</sup>, plaidant en faveur d'une spécificité faible des dépôts de C4d pour le diagnostic d'AMR. Au-delà des limites techniques limitant la sensibilité et la

spécificité du marquage C4d, la capacité variable des immunoglobulines IgG à fixer le C1q explique ces AMR C4d-<sup>106</sup>.

Les rejets sans DSA sont aussi identifiés par les recommandations de Banff depuis 2015<sup>112</sup>. Il s'agit d'une situation fréquente pouvant représenter jusqu'à 50% des cas d'une cohorte, se traduisant le plus souvent par des lésions d'inflammation microvasculaire (MVI) sans DSA.

Plusieurs situations peuvent être décrites pour expliquer ce phénotype (**Figure 8**) :

Comme précédemment décrit, les tests d'identification des DSA anti-HLA présentent des limites.

Deuxièmement, dans la plupart des centres, seuls les anticorps anti-HLA sont recherchés en pratique clinique, alors que le rôle des anticorps dirigés contre des antigènes mineurs sont de plus en plus décrits<sup>113</sup>. Certains de ces antigènes font l'objet d'études régulières, parfois contradictoires, comme les anticorps anti-récepteur de type 1 de l'angiotensine II ou encore les anticorps anti-récepteur de l'endothéline A. Néanmoins deux messages peuvent être dégagés : le nombre de polymorphismes nucléotidiques intéressant des protéines transmembranaires ou sécrétées est corrélé au risque de rejet, indépendamment d'un *mismatch* HLA<sup>114,115</sup>, et la réalisation de *crossmatches* endothéliaux utilisant des lignées cellulaires glomérulaires dépourvues de molécules HLA a permis de mettre en évidence une réactivité anti-endothéliale chez des receveurs présentant des épisodes de rejet sans DSA anti-HLA<sup>116</sup>.

Troisièmement, l'implication des lymphocytes Naturel Killer (NK) dans l'AMR est en train d'être mieux définie<sup>117-119</sup>. D'une part, les lymphocytes NK sont recrutés via leur récepteur FcγR lors de la fixation d'une IgG sur l'endothélium du greffon, conduisant à leur activation. D'autre part, l'activation de ces lymphocytes par la perte de signal inhibiteur est de plus en plus décrite. En effet, l'équipe lyonnaise a montré que leurs cohortes de patients MVI+ DSA+ et MVI+ DSA- présentent une survie greffon similaire. Au sein du groupe MVI+ DSA-, des anticorps dirigés contre des antigènes mineurs ne sont identifiés que chez peu de patients, écartant cette hypothèse. Toujours au sein de ce groupe, il a pu être montré que la différence de répertoire KIR inhibiteurs (*Killer-cell Immunoglobulin-like receptor*) entre donneur et receveur des lymphocytes NK était corrélée à l'incidence de lésions MVI<sup>120</sup>. En s'appuyant sur différents modèles murins, cette équipe a pu montrer que cette différence de répertoire KIR entre donneur et receveur implique une absence d'allo-reconnaissance molécules HLA de classe I du par les KIR du receveur. Ce « *missing-self* » induit la perte d'inhibition des lymphocytes NK du

receveur<sup>121</sup>, conduisant à des lésions endothéliales de rejet humoral. Ces résultats sont en cours de validation *in vivo*.

A ce jour, il n'y a que peu d'études dichotomisant ces situations et permettant d'étudier leur influence précise sur les caractéristiques diagnostiques et pronostiques du rejet humoral. Néanmoins, au sein de la cohorte de Louvain récemment publiée, le tableau histologique global des AMR DSA- semble être proche de celui des AMR DSA+ hormis une intensité des dépôts de C4d moindre<sup>122</sup>. Le pronostic global de ces AMR DSA- est variable selon les études, en gardant à l'esprit que cette catégorie diagnostique englobe différents phénotypes aux voies physiopathologiques et à l'évolution diverses.

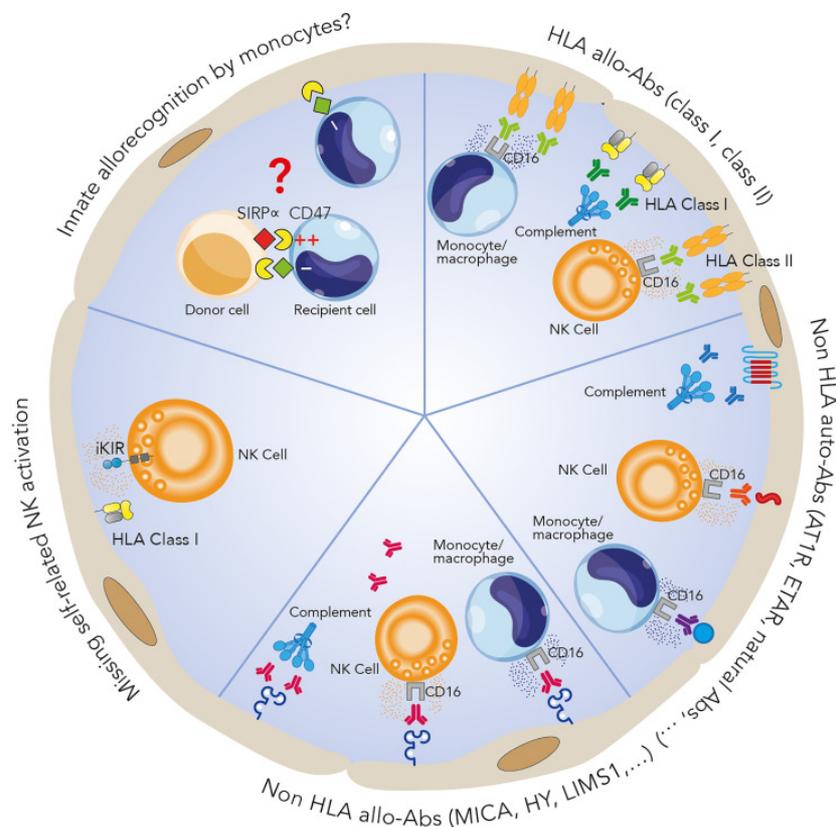


Figure 8 : mécanismes pouvant expliquer les lésions d'inflammation microvasculaire. Figure d'après Lebraud<sup>123</sup>.

#### 1.4.2 Diagnostic du rejet humoral

Le gold-standard actuel pour le diagnostic du rejet reste l'évaluation anatomopathologie de la biopsie du greffon associées à la recherche de DSA. Cette évaluation du parenchyme rénal permet d'établir un diagnostic et d'apporter des informations quant au pronostic<sup>124</sup> de ces lésions.

La définition de ces lésions et de ces catégories a été progressive. En effet, depuis 1991, un ensemble d'anatomopathologistes, de cliniciens et d'immunologistes se réunit tous les 2 ans afin de résumer les avancées récentes en néphrologie de la transplantation et de les intégrer au sein des recommandations de Banff. A l'origine, ces recommandations avaient pour but de standardiser la nomenclature et les critères diagnostiques du rejet afin d'homogénéiser les pratiques internationales, de faciliter les essais cliniques multicentrique et donc d'améliorer la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients.

A ce jour, les recommandations de Banff reconnaissent 15 types de lésions parenchymateuses scorée de manière semi-quantitative de 0 à 3, et plusieurs paramètres additionnels tels que la microangiopathie thrombotique, la nécrose tubulaire aiguë, ou les inclusions virales<sup>125</sup>.

Une fois ces lésions et paramètres évalués, ils sont interprétés selon les recommandations de Banff<sup>126</sup> et intégrés en catégories diagnostiques, actuellement au nombre 6 : 1-biopsies normales ou changements aspécifiques, 2- changements humoraux, 3- borderline pour un rejet cellulaire, 4- rejet cellulaire, 5- néphropathie à BK virus, 6- autre<sup>127</sup>.

A ce jour, et en l'attente de la publication des recommandations de Banff 2022, les critères du rejet humoral les suivants (**Tableau 2**) :

**TABLE 4** Updates of 2019 Banff classification for ABMR, borderline changes, TCMR, and polyomavirus nephropathy. All updates in boldface type<sup>a</sup>

<b>Category 1: Normal biopsy or nonspecific changes</b>
<b>Category 2: Antibody-mediated changes</b>
Active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis
1. Histologic evidence of acute tissue injury, including 1 or more of the following: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Microvascular inflammation (<math>g &gt; 0</math> and/or <math>ptc &gt; 0</math>), in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, <math>ptc \geq 1</math> alone is not sufficient and <math>g</math> must be <math>\geq 1</math></li> <li>• Intimal or transmural arteritis (<math>v &gt; 0</math>)<sup>b</sup></li> <li>• Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause</li> <li>• Acute tubular injury, in the absence of any other apparent cause</li> </ul>
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including 1 or more of the following: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linear C4d staining in peritubular capillaries or medullary vasa recta (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d &gt; 0 by IHC on paraffin sections)</li> <li>• At least moderate microvascular inflammation (<math>[g + ptc] \geq 2</math>) in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, <math>ptc \geq 2</math> alone is not sufficient and <math>g</math> must be <math>\geq 1</math></li> <li>• Increased expression of gene transcripts/classifiers in the biopsy tissue strongly associated with ABMR, if thoroughly validated</li> </ul>
3. Serologic evidence of circulating donor-specific antibodies (DSA to HLA or other antigens). C4d staining or expression of validated transcripts/classifiers as noted above in criterion 2 may substitute for DSA; however thorough DSA testing, including testing for non-HLA antibodies if HLA antibody testing is negative, is strongly advised whenever criteria 1 and 2 are met
Chronic active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis
1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including 1 or more of the following: <p>Transplant glomerulopathy (<math>cg &gt; 0</math>) if no evidence of chronic TMA or chronic recurrent/de novo glomerulonephritis; includes changes evident by electron microscopy (EM) alone (<math>cg1a</math>)</p> <p>Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (<math>ptcm1</math>; requires EM)</p> <p>Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes; leukocytes within the sclerotic intima favor chronic ABMR if there is no prior history of TCMR, but are not required</p>
2. Identical to criterion 2 for active ABMR, above
3. Identical to criterion 3 for active ABMR, above, including strong recommendation for DSA testing whenever criteria 1 and 2 are met. <b>Biopsies meeting criterion 1 but not criterion 2 with current or prior evidence of DSA (posttransplant) may be stated as showing chronic ABMR, however remote DSA should not be considered for diagnosis of chronic active or active ABMR</b>
Chronic (inactive) ABMR
1. $cg > 0$ and/or severe $ptcm1$ ( $ptcm1$ )
2. Absence of criterion 2 of current/recent antibody interaction with the endothelium
3. Prior documented diagnosis of active or chronic active ABMR and/or documented prior evidence of DSA

**TABLE 4** (Continued)

C4d staining without evidence of rejection; all 4 features must be present for diagnosis <sup>c</sup>
1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections)
2. Criterion 1 for active or chronic active ABMR not met
3. No molecular evidence for ABMR as in criterion 2 for active and chronic active ABMR
4. No acute or chronic active TCMR, or borderline changes
<b>Category 3: Borderline (Suspicious) for acute TCMR</b>
Foci of tubulitis (t1, t2, or t3) with <b>mild interstitial inflammation (i1)</b> , or mild (t1) tubulitis with moderate-severe interstitial inflammation (i2 or i3)
No intimal or transmural arteritis ( $v = 0$ )
<b>Category 4: TCMR</b>
Acute TCMR
Grade IA: Interstitial inflammation involving >25% of non-sclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with moderate tubulitis (t2) involving 1 or more tubules, not including tubules that are severely atrophic <sup>d</sup>
Grade IB: Interstitial inflammation involving >25% of non-sclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with severe tubulitis (t3) involving 1 or more tubules, not including tubules that are severely atrophic <sup>d</sup>
Grade IIA: Mild to moderate intimal arteritis (v1), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Grade IIB: Severe intimal arteritis (v2), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Grade III: Transmural arteritis and/or arterial fibrinoid necrosis involving medial smooth muscle with accompanying mononuclear cell intimal arteritis (v3), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Chronic active TCMR <sup>e</sup>
Grade IA: Interstitial inflammation involving >25% of sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA2 or i-IFTA3) <b>AND</b> > 25% of total cortical parenchyma (ti2 or ti3) with moderate tubulitis (t2 or <b>t-IFTA2</b> ) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules <sup>d</sup> ; other known causes of i-IFTA should be ruled out
Grade IB: Interstitial inflammation involving >25% of sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA2 or i-IFTA3) <b>AND</b> > 25% of total cortical parenchyma (ti2 or ti3) with severe tubulitis (t3 or <b>t-IFTA3</b> ) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules <sup>d</sup> ; other known causes of i-IFTA should be ruled out
Grade II: Chronic allograft arteriopathy (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell inflammation in fibrosis and formation of neointima). This may also be a manifestation of chronic active or chronic ABMR or mixed ABMR/TCMR
<b>Category 5: polyomavirus nephropathy<sup>f</sup></b>
<b>PVN Class 1</b>
<b>pvl 1 and ci 0-1</b>
<b>PVN Class 2</b>
<b>pvl 1 and ci 2-3 OR</b>
<b>pvl 2 and ci 0-3 OR</b>
<b>pvl 3 and ci 0-1</b>
<b>PVN Class 3</b>
<b>pvl 3 and ci 2-3</b>

Tableau 2 : Catégories diagnostiques d'après les recommandations de Banff 2019. Figure issue de la publication<sup>127</sup>.

### 1.4.3 Limites du diagnostic histologique du rejet humoral et de la classification de Banff

Comme tout examen, l'évaluation histologique souffre de limites reconnues.

Une première catégorie de ces limites comporte les aspects techniques de la biopsie : biais d'échantillonnage, impossibilité d'effectuer sur un même niveau de coupe différentes colorations ou encore hétérogénéité tissulaire (cortex/médulla).

Ensuite, l'évaluation des lésions est exposée à plusieurs problématiques. Tout d'abord, Furness *et al.* ont montré que certains évaluateurs vont systématiquement sur- ou sous-coter une lésion par rapport à un panel d'expert de référence et qu'il existe une variabilité intra-individuelle de notation de lésion sur une même lame évaluée plusieurs fois dans le temps, ainsi qu'une forte variabilité inter-individuelle<sup>128,129</sup>. Ensuite, certaines lésions sont peu spécifiques, pouvant être partagées entre plusieurs étiologies parfois opposées (par exemple des lésions d'artérites pouvant être observées en cas de rejet humoral ou cellulaire, et des lésions de tubulite en cas de néphropathie virale ou de rejet cellulaire)<sup>130</sup>. De plus, le *scoring* semi-quantitatif ne reflète qu'imparfaitement le caractère graduel des lésions observées.

Un autre pan de ces limites concerne la classification de Banff en elle-même. Depuis 1991, 30 réunions ont eu lieu, aboutissant à 9 changements de la classification de Banff, dont 3 changements mineurs. Alors que les recommandations visent à simplifier la prise en charge diagnostique de ces patients, ces changements itératifs peuvent être critiqués du fait de l'inconstance qu'ils induisent (changement de catégorie d'une même biopsie selon l'année de la classification utilisée), en particulier pour les essais thérapeutiques, et de la difficulté à les appréhender par un utilisateur.

Concernant le premier point, dans le cadre du rejet humoral, plusieurs changements ont eu lieu depuis 2001, en particulier en 2013 et 2017 avec l'intégration des données moléculaires et la suppression de la catégorie « suspicion de rejet humoral » (**Tableau 3**).

	2003	2013	2017
<b>Critère 1 :</b> lésions histologiques aiguës	- capillarite péritubulaire > 0 ou glomérulite > 0 - artérite définie par des lésions v = 3 - Microangiopathie thrombotique - Nécrose tubulaire aiguë	- pour être validé, le critère de glomérulite doit être présent en l'absence de récurrence de glomérulopathie - abaissement du seuil d'artérite v > 0	- pour être validé, le critère de capillarite péritubulaire doit être présent sans lésions de rejet cellulaire ou borderline ou d'infection
<b>Critère 2 :</b> Preuve d'une interaction récente avec l'endothélium	- dépôts de C4d	- Abaissement du seuil de positivité du C4d - Introduction du score d'inflammation microvasculaire g + cpt - Introduction des transcrits endothéliaux	- élargissement à tous les transcrits associés au rejet
<b>Critère 3 :</b> Présence d'un anticorps dirigé contre le greffon	- présence d'un DSA		- dépôts de C4d peuvent se substituer à ce critère - biologie moléculaire peut se substituer à ce critère
<b>Particularité de la classification</b>	- En cas de positivité de 2 critères sur 3, la biopsie est classée « suspicion de rejet humoral »	- Introduction des AMR sans dépôts de C4d	- Suppression de la catégorie suspicion de rejet humoral - Introduction des AMR sans DSA.

Tableau 3 : évolution des critères de Banff pour le diagnostic de rejet humoral. La colonne 2003 reprend les critères diagnostics nécessaires. Les colonnes 2013 et 2017 ne reprennent que les modifications par rapport à la recommandation antérieure. AMR : antibody mediated rejection. DSA : donor-specific antibody.

Une étude de Callemeyn *et al.* a évalué l'impact de ces modifications sur le diagnostic du rejet humoral<sup>131</sup>. Au-delà du nombre de biopsies changeant de catégorie diagnostique entre rejet humoral, suspicion de rejet humoral, ou absence de rejet, les auteurs pointaient les différences de pouvoir discriminant et de pronostic de ces différentes classifications. Ainsi, la classification de 2017, proche de celle de 2019, a augmenté le nombre de rejet humoraux diagnostiqués, mais ceux-ci sont associées à un moindre risque (hazard ratio) de perte de greffon.

Ces modifications des recommandations s'accompagnent aussi de difficultés d'utilisation par les cliniciens et peuvent être une source d'erreur. A titre d'exemple, dans une étude récente visant à mettre en place une intégration automatisée des lésions histologiques dans des catégories diagnostiques du Banff, les auteurs montraient qu'une proportion importante des biopsies de greffon était mal classée, et que cette erreur de classification et donc *in fine* de

diagnostic, était due à une mauvaise interprétation des recommandations par l'évaluateur dans 29% des cas et à une non-tenue à jour des changements de la classification dans 23% des cas<sup>132</sup>. Enfin, il faut souligner que les recommandations de Banff s'appuient sur des examens dont l'accessibilité peut être limitée (microscopie électronique, DSA non-HLA, biologie moléculaire). Les recommandations ne décrivant pas différents arbres diagnostiques selon la disponibilité ou non de ces examens dans un centre, le diagnostic final peut être erroné faute d'évaluation complète et systématique de la biopsie.

#### **1.4.4 Le diagnostic moléculaire du rejet humoral**

Les outils de diagnostic moléculaire en transplantation rénale se développent depuis les années 2000. Ces outils technologiques donnent accès à une nouvelle strate d'informations pouvant être appliquée à la transplantation. En tête de file se placent les publications du groupe d'Alberta, s'appuyant sur des puces à ADN, et ayant conduit à la commercialisation d'un kit MMDx par l'entreprise Affymetrix (désormais ThermoFisher). Dans un second temps, les outils basés sur le dosage direct des ARNm sans étape d'amplification ont été développés par l'entreprise NanoString.

Ces outils permettent de s'affranchir d'une partie des limites de l'évaluation histologique mentionnées précédemment. En effet, ces tests calibrés sont moins sujets à des variations intra- ou inter-manipulateur, aux biais d'échantillonnage<sup>133</sup> et peuvent permettre une évaluation précoce du tissu avant l'installation de lésions potentiellement irréversibles. Par ailleurs, les recommandations de Banff sont régulièrement réactualisées. Ceci peut mener à un changement de catégorie diagnostique d'une même biopsie au cours du temps, impactant ainsi la validité d'un essai clinique. Comparativement, les résultats bruts d'une évaluation moléculaire d'une biopsie restent inchangés.

Faute d'autre gold-standard diagnostique, le phénotypage moléculaire est basé sur les catégories diagnostiques décrites par les recommandations de Banff. Un premier niveau de ce phénotypage a permis de décrire les grandes polarisations moléculaires de ces biopsies (**Figure 9**).

Concernant le rejet humoral, et en lien avec la physiopathologie précédemment décrite, les principales signatures moléculaires retrouvées sont celles de transcrits endothéliaux de la microcirculation rénale (ROBO4, PECAM...) et des lymphocytes NK (KLRD1...). On retrouve aussi les molécules en lien avec l'ADCC : granulysine et perforine, et des transcrits inductibles par l'interféron gamma. A noter qu'au sein du tissu rénal, les transcrits associés aux

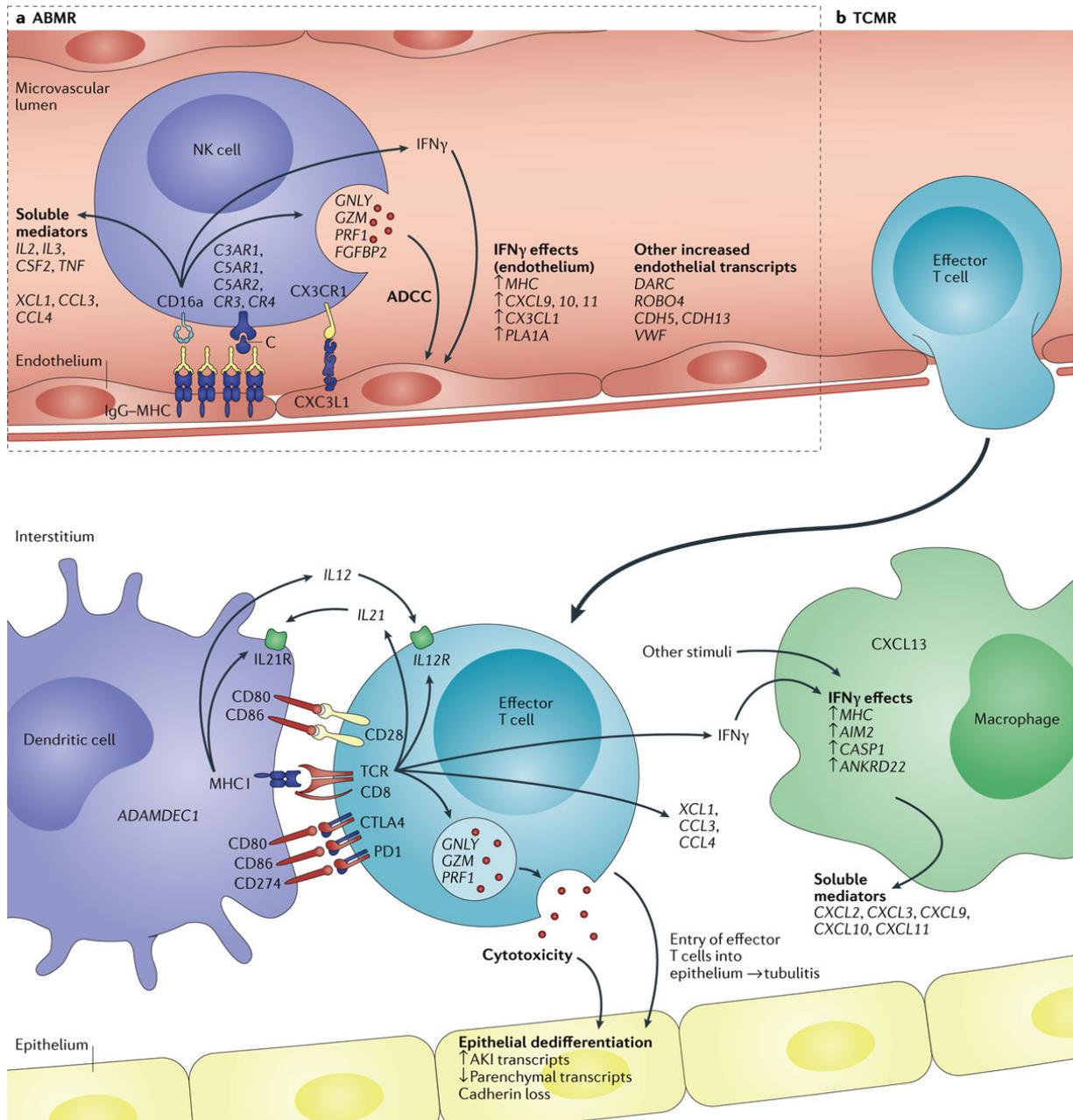
lymphocytes B sont peu discriminants pour le rejet et sa classification entre humoral et cellulaire<sup>134</sup>.

Dans le cadre du rejet cellulaire, les principaux transcrits sur-exprimés sont ceux de molécules associées aux cellules présentatrices d'antigènes (ADAMDEC1, CD68...), des molécules exprimées par des lymphocytes T effecteurs activés, ainsi que des marqueurs de cytotoxicité (PRF1...), et des molécules de costimulation (CTLA4...). Dans le cadre du rejet cellulaire, les marqueurs généraux de l'inflammation (CXCL11...) sont aussi plus exprimés comparativement au rejet humoral<sup>135</sup>.

Enfin, une certaine proportion de transcrits vont être exprimés au cours d'un épisode de rejet, sans être spécifique d'un rejet humoral ou cellulaire. De plus, aucun gène n'a été encore identifié avec une sensibilité et spécificité suffisante pour permettre à lui seul de diagnostiquer et classer le rejet. Aussi, il apparaît que dans l'optique de mettre en place un test moléculaire diagnostique du rejet, le recours à un panel de gènes est nécessaire<sup>136</sup>.

Après avoir identifié ces phénotypes, le diagnostic moléculaire a pu être appliqué à différentes situations du rejet humoral, aidant progressivement à mieux définir les entités du rejet<sup>137</sup>.

En effet, en se limitant au rejet humoral, il a pu être mis en évidence des clusters moléculaires différents entre les rejets humoraux actifs et chronique-actifs<sup>138</sup>. De plus, il a été montré que le signal moléculaire de rejet humoral n'était pas corrélé à la présence de dépôt de C4d<sup>139,140</sup>. Plus récemment, Callemeyn *et al.* ont montré que la signature moléculaire du rejet humoral était indépendante de la présence d'un DSA anti-HLA<sup>141</sup>. Ces études plaident en faveur d'une signature moléculaire potentiellement universelle du rejet humoral liée aux lésions tissulaires elles-mêmes, et non à leurs effecteurs.



Nature Reviews | Nephrology

Figure 9 : signatures moléculaires des rejets humoraux et cellulaires. Figure d'après Halloran<sup>142</sup>.

### 1.4.5 Applicabilité du diagnostic moléculaire en pratique clinique

A ce jour, deux principaux tests sont disponibles.

Le premier est le MMDx system, commercialisé par ThermoFisher. Il repose sur l'utilisation de puces à ADN permettant l'évaluation d'un panel de 19 462 gènes élaboré à partir des publications du groupe de PF Halloran. En pratique, ce test nécessite l'envoi de l'échantillon dans un laboratoire dédié pour une exploration et analyse centralisée.

Le second, plus récent, est basé sur le dosage quantitatif de l'ARNm, basé sur une technologie déployée par Nanostring. Conjointement avec le groupe de travail du diagnostic moléculaire du Banff « diagnostic moléculaire », un panel de 770 gènes a été identifiés et commercialisé : le B-HOT panel<sup>143</sup>.

Malgré la disponibilité de ces deux outils, la littérature abondante sur le sujet, et l'intégration du diagnostic moléculaire dans les recommandations de Banff depuis 2013, celui reste peu usité en pratique clinique. En effet, moins de 10% des centres de transplantation rénale dans le monde ont recours au diagnostic moléculaire pour le diagnostic de rejet humoral<sup>144</sup>. Plusieurs éléments freinent cette diffusion.

Sur un plan technique, les équipements médicaux requis sont coûteux et peu disponibles sur le territoire. Concernant le MMDx, le coût estimé par échantillon s'élève à plus de \$1000 et nécessite l'envoi de l'échantillon au laboratoire de référence. Pour le B-HOT panel, au-delà des coûts engendrés par l'acquisition et l'entretien de ce matériel (environ 150 000€ HT pour un nCounter Nanostring), le prix par échantillon analysé n'est pas compatible avec la pratique courante. Pour le B-HOT panel du Nanostring, le coût théorique par échantillon est de 290€, mais uniquement des plaques de 12 puits sont actuellement commercialisées au prix d'environ 3550€.

Concernant l'interprétation des données, ces deux tests fournissent des résultats pour plus de 770 transcrits. Pour une biopsie donnée, le MMDx fournit un compte-rendu reprenant de manière systématique les catégories diagnostiques prédéfinies par le fournisseur. Pour chacune de ces catégories, la probabilité que la biopsie y corresponde est fournie (**Figure 10**).

# THE MMDx-KIDNEY REPORT

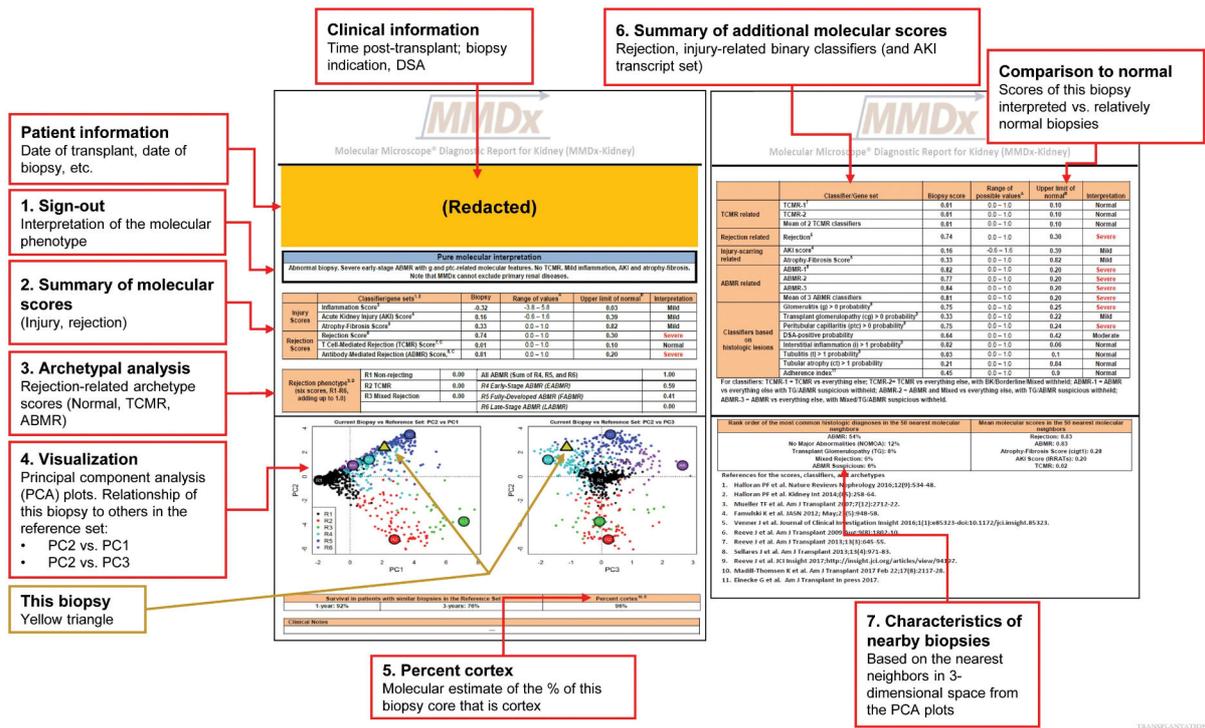


Figure 10 : compte-rendu fourni par le MMDx. Figure d'après Halloran<sup>137</sup>.

Pour le B-HOT panel, qui est recommandé actuellement par le Banff afin de faciliter les collaborations internationales, il n'y a pas à ce jour de guide quant à son interprétation. Aussi, les examens basés sur la technologie Nanostring nécessitent une expertise, non seulement de gestion des données, mais aussi d'interprétation.

Quelle que soit la technologie, un panel plus restreint de gènes serait associé à un moindre coût. Néanmoins, le nombre exact de gènes requis au sein d'un panel pour permettre d'obtenir des performances diagnostiques ayant une significativité clinique est encore inconnu.

Enfin, bien que de larges cohortes aient été explorées via ces outils moléculaires, permettant de définir des phénotypes moléculaires associés à des diagnostics histologiques, la place précise de ces outils en pratique clinique est encore inconnue. Ceci soulève plusieurs questions : quelles sont les indications cliniques à réaliser un examen moléculaire ? Combien de patients sont concernés par ces indications ? Quel est l'impact d'un examen moléculaire sur la prise en diagnostic (reclassification de biopsies) ou sur la prise en charge thérapeutique du patient (décision ou non de traitement, type de traitement) ? Comment interpréter les cas où l'examen histologique et l'examen moléculaire sont discordants ?

## 2 Objectif général

En transplantation rénale, la principale étiologie de perte de greffon est le rejet humoral.

L'évaluation principale du risque de rejet humoral repose sur la mise en évidence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon. Or, la valeur prédictive de ces anticorps pour l'incidence et le pronostic du rejet est faible, du fait d'une pathogénicité variable de ceux-ci. Ceci pourrait être expliqué par les caractéristiques des cellules les sécrétant. En effet en pathologies infectieuses, il a été montré que les lymphocytes B mémoires, cellules responsables du maintien du *pool* de cellules sécrétrices d'anticorps, sont hétérogènes en termes de phénotypes et de fonctions. Cette hétérogénéité pourrait être un facteur explicatif de la pathogénicité variable des anticorps sécrétés. Aussi, l'objectif de cette première partie de thèse était de caractériser l'hétérogénéité des lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques en transplantation rénale.

Le diagnostic du rejet de greffe rénale repose sur l'évaluation histologique du tissu rénal. Ce gold-standard souffre pourtant de nombreuses limites, auxquelles le diagnostic moléculaire pourrait palier. Pourtant, l'outil moléculaire est sous-utilisé en pratique clinique. L'objectif de la deuxième partie de cette thèse était de développer et valider un test moléculaire revêtant des caractéristiques compatibles à une implémentation en pratique clinique.

L'objectif général de cette thèse était donc d'une part d'améliorer la connaissance des lymphocytes B mémoires allo-réactifs, ce qui pourrait participer à une meilleure stratification du risque de rejet de greffe, et d'autre part à améliorer les modalités diagnostiques du rejet de greffe, en particulier le rejet humoral.

Chronologiquement, le début de la période de thèse (2020-2022) a été dédié au diagnostic moléculaire du rejet de greffe et à la préparation de l'étude des lymphocytes B mémoires HLA-spécifique, dont les manipulations ont été effectuées en deuxième partie de thèse (2022-2023). Du fait du délai nécessaire à l'analyse bio-informatique des données générées, les résultats finaux de cette partie de thèse ne sont pas encore disponibles.

### **3 Diagnostic moléculaire du rejet de greffe rénale**

#### **3.1 Introduction et objectifs**

L'objectif de cette partie de thèse était de développer et valider un test moléculaire revêtant des caractéristiques compatibles à une implémentation en pratique clinique.

Le premier article de cette thèse est consacré au développement d'un tel test à l'aide d'une technique simple, reproductible et peu onéreuse.

Un panel restreint de gènes permettant de diagnostiquer le rejet et le classer entre rejet cellulaire et rejet humoral a été mis au point et validé dans une cohorte de 220 biopsies. Un modèle de classification a été développé et validé, permettant une interprétation automatisée des résultats.

Cet outil moléculaire ensuite a été appliqué à d'autres situations cliniques afin d'évaluer sa pertinence et sa validité externe.

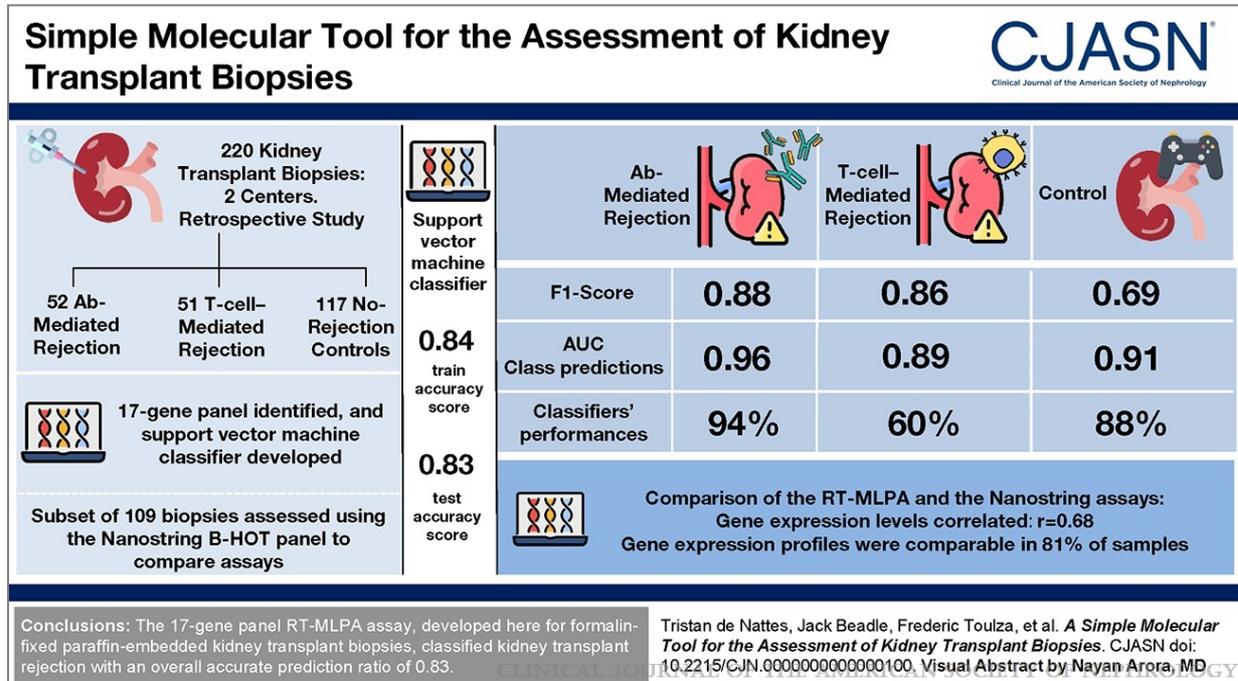
Le deuxième article de cette thèse est donc consacré à l'application de cet outil aux biopsies présentant un tableau incomplet de rejet humoral. Ces biopsies ne présentaient pas les critères histologiques d'un rejet humoral et donc n'ont pas été diagnostiquées en tant que tel. Néanmoins, leur évaluation était incomplète puisque l'outil moléculaire recommandé par le Banff n'était pas disponible. L'étude réalisée réévalue ces biopsies à la faveur des recommandations de Banff 2019 et de l'outil de diagnostic moléculaire précédemment développé.

Enfin, une illustration d'utilisation de cet outil chez une patiente à haut risque immunologique chez qui il aurait permis un diagnostic précoce du rejet est proposée en annexe.

### 3.2 Premier article: A Simple Molecular Tool for the Assessment of Kidney Transplant Biopsie

Cet article a été récompensé par le prix « *CJASN Trainee of the year 2023, 2<sup>nd</sup> place* »

Graphical abstract:



# A Simple Molecular Tool for the Assessment of Kidney Transplant Biopsies

Tristan de Nattes,<sup>1,2,3</sup> Jack Beadle,<sup>3</sup> Frederic Toulza,<sup>3</sup> Edvin Candon,<sup>1</sup> Philippe Ruminy,<sup>4</sup> Arnaud François,<sup>5</sup> Dominique Bertrand,<sup>1</sup> Dominique Guerrot,<sup>1</sup> Fanny Drieux,<sup>4,5</sup> Candice Roufosse,<sup>3</sup> and Sophie Candon<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background** The Banff Classification for Allograft Pathology recommendations for the diagnosis of kidney transplant rejection includes molecular assessment of the transplant biopsy. However, implementation of molecular tools in clinical practice is still limited, partly due to the required expertise and financial investment. The reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) assay is a simple, rapid, and inexpensive assay that permits simultaneous evaluation of a restricted gene panel using paraffin-embedded tissue blocks. The aim of this study was to develop and validate a RT-MLPA assay for diagnosis and classification of rejection.

**Methods** A retrospective cohort of 220 kidney transplant biopsies from two centers, which included 52 antibody-mediated rejection, 51 T-cell-mediated rejection, and 117 no-rejection controls, was assessed. A 17-gene panel was identified on the basis of relevant pathophysiological pathways. A support vector machine classifier was developed. A subset of 109 biopsies was also assessed using the Nanostring Banff Human Organ Transplant panel to compare the two assays.

**Results** The support vector machine classifier train and test accuracy scores were 0.84 and 0.83, respectively. In the test cohort, the F1 score for antibody-mediated rejection, T-cell-mediated rejection, and control were 0.88, 0.86, and 0.69, respectively. Using receiver-operating characteristic curves, the area under the curve for class predictions was 0.96, 0.89, and 0.91, respectively, with a weighted average at 0.94. Classifiers' performances were highest for antibody-mediated rejection diagnosis with 94% correct predictions, compared with 88% correct predictions for control biopsies and 60% for T-cell-mediated rejection biopsies. Gene expression levels assessed by RT-MLPA and Nanostring were correlated:  $r = 0.68$ ,  $P < 0.001$ . Equivalent gene expression profiles were obtained with both assays in 81% of the samples.

**Conclusions** The 17-gene panel RT-MLPA assay, developed here for formalin-fixed paraffin-embedded kidney transplant biopsies, classified kidney transplant rejection with an overall accurate prediction ratio of 0.83.

CJASN 18: 499–509, 2023. doi: <https://doi.org/10.2215/CJN.000000000000100>

## Introduction

Kidney transplantation rejection is a major cause of allograft dysfunction and graft loss.<sup>1</sup> To diagnose rejection, histological assessment of a kidney transplant biopsy according to Banff guidelines remains the standard of care. However, it suffers from several limitations, such as high interobserver variability, sample bias in the case of focal disease, lack of sensitivity and/or specificity of some criteria (*e.g.*, arteritis), and semiquantitative scoring.<sup>2</sup>

In addition to the histological assessment of kidney transplant biopsies, molecular phenotyping has emerged, providing a better understanding of the pathophysiological process responsible for rejection.<sup>3,4</sup> Progressively, molecular tools, essentially microarray<sup>5</sup> (Affymetrix) and mRNA quantification<sup>6,7</sup> (Nanostring), have been refined to be used in clinical practice. The Banff consortium has identified genes of interest for molecular testing and recognized the validity of these

molecular tools<sup>8–10</sup> as an adjunct to histological diagnosis. A validated gene expression signature can now fulfill the second criterion of antibody-mediated rejection—“evidence of current/ recent antibody interaction with vascular endothelium”<sup>9</sup>—or substitute the presence of donor-specific antibodies (DSAs) in the third criterion of antibody-mediated rejection.

Despite the clear interest of these molecular tools, their implementation in clinical practice is still limited, which can be explained by several factors.<sup>11</sup> First, the proposed technologies require a financial investment, both because of equipment-related expenses and reagents required for sample processing: around \$275 per sample for the 770-gene Nanostring Banff Human Organ Transplant (B-HOT) panel and around \$2000 per sample for DNA microarrays.<sup>10</sup> Second, these technologies are based on the simultaneous analysis of several hundred genes, which requires expertise for data processing and interpretation. Third, although

<sup>1</sup>Nephrology – Kidney Transplant Unit, Rouen University Hospital, Rouen, France

<sup>2</sup>Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, Rouen, France

<sup>3</sup>Department of Immunology and Inflammation, Centre for Inflammatory Diseases, Imperial College, London, United Kingdom

<sup>4</sup>Univ Rouen Normandie, INSERM U1245, Centre Henri Becquerel, Rouen, France

<sup>5</sup>Pathology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France

## Correspondence:

Dr. Tristan de Nattes, Nephrology – Kidney Transplant Unit, Rouen University Hospital, 1 Rue de Germont, 76031 Rouen, France. Email: [tristan.de-nattes@chu-rouen.fr](mailto:tristan.de-nattes@chu-rouen.fr)

Downloaded from <https://www.cjasn.org/> by WITZ-DaCC-PrReqsSivEXxvhs9p3sNkIKSh001009wHwB9Wub  
6K3FFH1yPLvmyGw0ialitUD3BcC1YD+weIPfP99COXy1QAxnXfHrJHfHvsaYv0wIOAClUuA43K7TYS8AKUJUR0VPC897YCoC  
HqYCoqpdImicSfrGdUge7eUgTUKA== on 04/10/2023

lists of genes of interest have been identified, there are, to date, no guidelines for conducting and interpreting these molecular tests.

Considering these limitations, the aim of this study was to develop and validate a molecular assay that could be easily implemented in kidney transplant centers for diagnosis and classification of rejection. We used a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) assay, which enables the simultaneous evaluation of a panel of approximately 20 genes. This simple, rapid, and inexpensive (reagent-related expenses estimated at 15–20€) assay requires a capillary sequencer for fragment-size analysis and can be performed with the same formalin-fixed paraffin-embedded tissue block used for light microscopy examination. We selected and validated a gene panel and proposed an open access online tool enabling automatized interpretation of results.

## Methods

### Study Population

Kidney transplant biopsies were randomly selected among the Rouen University Hospital pathology database and from biopsies from the Imperial College Healthcare National Health Service Trust database with previous RNA extraction.<sup>7,12,13</sup> These databases included biopsies performed between 2010 and 2020. Biopsies were classified according to the Banff 2019 classification without considering the molecular biology criterion.<sup>9</sup> For the diagnosis of active antibody-mediated rejection, these three criteria were required: (1) histologic evidence of acute tissue injury, defined by microvascular inflammation ( $g > 0$  and/or  $ptc > 0$ ) in the absence of glomerulonephritis or arteritis or acute thrombotic microangiopathy in the absence of any other cause; (2) linear C4d staining  $> 1$  by immunofluorescence or  $> 0$  by immunohistochemistry or microvascular inflammation defined by  $[g + ptc] \geq 2$ ; and (3) serologic evidence of DSA or C4d staining. For the diagnosis of chronic active antibody-mediated rejection, criterion 1 was replaced by transplant glomerulopathy ( $cg > 0$ ) with no evidence of chronic thrombotic microangiopathy or glomerulonephritis, with the same criteria as active antibody-mediated rejection for criteria 2 and 3. Acute T-cell-mediated rejection was defined by interstitial inflammation involving  $> 25\%$  of nonsclerotic cortical parenchyma ( $i > 1$ ) with tubulitis ( $t > 1$ ) or arteritis ( $v \geq 1$ ). Other no-rejection biopsies were defined as controls, including protocol and indication biopsies with decreased graft function, to avoid limited challenge bias. The exclusion criteria were as follows: unknown DSA status, biopsies from ABO incompatible kidney transplant, biopsies classified as C4d without evidence of rejection, borderline for T-cell-mediated rejection, or mixed rejection. Considering the shared phenotype between BK virus nephropathy and T-cell-mediated rejection, biopsies with an intrarenal polyomavirus load level of  $> 0\%$  were also excluded.

### Data Collection

Clinical and biological data were retrospectively collected. In both centers, DSA was monitored once a year and at the time of biopsy, if required, with Labscreen mixed beads as

the screening test and Labscreen single antigen beads for identification (One Lambda, CA). The threshold for positivity was a mean fluorescence intensity more than 500.

### RNA Extraction

In both centers, kidney transplant biopsies were collected with an 18-gauge spring-loaded needle. Paraffin blocks were stored at room temperature according to local practices. For each biopsy, four to six consecutive 20- $\mu\text{m}$  sections were cut and stored at room temperature until RNA extraction. Manual extraction was performed using deparaffinization (#19093) and a RNeasy formalin-fixed paraffin-embedded (#73504) kit from Qiagen (Hilden, Germany), according to the supplier protocol. RNA concentration and quality were assessed with the NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Extracted RNA was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the RT-MLPA assay.

For the French samples, 84 paraffin blocks were selected and successfully extracted. Mean RNA concentration was  $41.4 \pm 37.1$  ng/ $\mu\text{l}$  with a 260/280 ratio =  $1.9 \pm 0.3$ . The molecular assessment failed in six of 84 samples (7%). One hundred fifty-six UK samples were selected, with a mean RNA concentration of  $54.1 \pm 40.5$  ng/ $\mu\text{l}$  and a 260/280 ratio =  $2.0 \pm 0.1$ . The RT-MLPA assay succeeded in 142 (91%) of them.

### RT-MLPA Assay

To develop the RT-MLPA assay, only the French biopsies were used. Probes against genes of interest were designed across exon-exon boundaries to avoid any unwanted amplifications of genomic DNA. All 5' gene-probes, complementary to the first exon of interest, included at their 5' end a sequence complementary to a universal primer U1 (GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA) followed by a gene-specific sequence. All 3' gene-probes, complementary to the second exon of interest, included a phosphorylated 5' end allowing ligation to the corresponding 5' probe, then a gene-specific sequence, and a sequence complementary to a universal primer U2 (TCCAACCCTTAGGGAACCC) at their 3' end. Between universal and gene-specific sequences, spacers (repeated TAC sequences) were inserted to allow separation and identification of PCR products according to their size. All probes were obtained from Eurogentec (Seraing, Belgium). Sequences of the probes used in the 17-gene panel are reported in Supplemental Table 1.

The RT-MLPA is a multiplex semiquantitative assay. The protocol for RT-MLPA, adapted from Mareschal *et al.*,<sup>13</sup> is described in Supplemental Methods. To minimize RNA quantity bias, all expression values are divided by the mean of all genes measured in the sample, and the base 2 logarithms of these ratios plus 1 are used as normalized expression values.<sup>13,14</sup> A Z-score normalization (mean 0 and variance 1) was also applied to all datasets to enable gene expression comparison. Free web interfaces were developed to facilitate data processing (<http://92.222.23.215/RTMLPA/index.php?p=signin>) and interpretation (<https://kidney-transplant-classifier.herokuapp.com/>). This software also provides graphical representation of gene expression from the raw fragment analyzer files (.fsa).

### Nanostring Assay

In addition to RT-MLPA, RNA from 109 of the UK biopsies was also assessed using Nanostring nCounter (NanoString Technologies, Seattle, WA) with the Banff Human Organ Transplant panel (B-HOT panel),<sup>10</sup> which contains 758 literature-derived genes of interest,<sup>6,12,13,16</sup> 12 internal reference genes, and 14 synthetic positive and negative controls. RNA was extracted according to the methods described above. The protocol for the Nanostring assay is described in [Supplemental Methods](#).

Absolute expression levels of genes used in the RT-MLPA 17-gene panel were extracted from the Nanostring data. To enable Nanostring to RT-MLPA data comparison, absolute expression values were normalized using the same method described above.

### Biopsy Classifier

To assign each biopsy into one of the three diagnosis categories, a support vector machine classifier was developed. The cohort was split between a training cohort (70% of the cohort) and a validation cohort (30%) with a stratification on the diagnosis category. Random oversampling was performed to compensate minority classes. To report classifier's performances, the following scores were used: the precision score, which is the ratio of correctly predicted samples (true positive) to all predicted samples (true and false positives); the recall score (*i.e.*, sensitivity), which is the ratio of correctly predicted samples (true positive) to all samples in the class (true positive and false negative); and the specificity score, which is the ratio of true negative to true negative and false positive. F1 score, which is the harmonic mean of precision and recall scores, and accuracy, defined as the ratio of accurate predictions, were also used. Weighted average scores were calculated by taking into account the proportion of each diagnosis class.

### Statistical Analyses

Quantitative data are presented with median [25th–75th percentiles] or mean  $\pm$  SD according to their distribution. Qualitative data are presented with number of patients and percentages. The Student test, Mann–Whitney *U* test, and Kruskal–Wallis test were used for continuous variables. Fisher or chi-square tests were used for categorical variables, depending on sample sizes. Correlations were tested with the Spearman rank correlation test. A two-sided *P* value of  $<0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism version 6.04, GraphPad Software, La Jolla, CA, and Python programming language with SciPy, NumPy, and Pandas libraries.

### Ethical Considerations

The clinical and research activities being reported are consistent with the principles of the Declaration of Istanbul as outlined in the Declaration of Istanbul on Organ Trafficking and Transplant Tourism. Biopsies collected during the routine care of patients were used for secondary research. Informed written consent for such secondary use was obtained from all patients before biopsy. The study was approved by the local institutional review board (notice No. 474).

## Results

### Cohort Characteristics

We analyzed the kidney biopsies from 220 kidney transplant recipients ([Supplemental Figure 1](#)), including 117 of 220 (53%) control biopsies, 52 of 220 (24%) antibody-mediated rejection biopsies, and 51 of 220 (23%) T-cell-mediated rejection biopsies. Control samples consisted of protocol and indication biopsies with a wide spectrum of diagnosis: 51 of 117 (44%) were considered as normal or with acute tubular necrosis, 38 of 117 (33%) biopsies showed tubulointerstitial fibrosis, 12 of 117 (10%) showed glomerulonephritis, 11 of 117 (9%) showed other features, and five of 117 (4%) showed microvascular inflammation ([Supplemental Table 2](#)). Clinical, biological, and pathological characteristics of the whole cohort and according to the diagnosis are reported in [Table 1](#). Owing to the multicentric nature of the cohort, some differences in clinical, biological, or histological features were observed within each diagnosis group according to their geographic origin ([Supplemental Table 3](#)).

### Gene Panel

The RT-MLPA assay allows the simultaneous evaluation of a panel up to 20 genes. On the basis of the knowledge of pathways involved in the pathophysiology of rejection and previously published data about molecular diagnosis in kidney transplantation using Affymetrix and Nanostring, 30 genes of interest were selected.<sup>3,4,7,8,17–19</sup> Six successive gene panels were tested on the French samples to select the most discriminant genes to identify antibody-mediated rejection, T-cell-mediated rejection, or control biopsies. Finally, a 17-gene panel was identified, including genes significantly associated with at least one of these diagnoses ([Table 2](#)). This panel included several pathophysiological pathways: monocytes/macrophages-associated genes (ADAMDEC1, CCL18, CD68), endothelial-associated genes (CAV1, PECAM, PLA1A, ROBO4), T-cell-associated transcripts (CTLA4, IFNG, PRF1), NK-cell-associated transcripts (CCL4, FCGR3, GNLY, KLRD1), B-cell-related transcripts (CD72), and inflammation-related transcripts (CARD16, CXCL11).

### Biopsy Classification

Unsupervised hierarchical analysis of gene expression levels is shown in [Supplemental Figure 2](#). Normalized principal components analysis (PCA) representation in 3D showing variance scores of 28%, 14%, and 11% is represented in [Figure 1](#).

Considering the effect of DSA for the diagnosis of antibody-mediated rejection and to provide a molecular tool that reflects daily clinical practice, support vector machine classifiers were based on gene expression values and DSA presence or absence on the closest serum to the biopsy. Support vector machine classifiers were randomly generated on the basis of a 70%/30% split of the entire cohort. Among these classifiers, one was randomly selected. Its train score accuracy was 0.84, and its test score accuracy was 0.83. To assess the influence of the initial 70%/30% split on the selected classifier, 500 random splits were performed to recalculate train/test scores. Scores of this selected classifier according to these random splits followed a Gaussian distribution ([Supplemental Figure 3](#)).

**Table 1. Characteristics of selected kidney transplant patients whose kidney biopsies were analyzed at Rouen University Hospital (Rouen, France) or Imperial College Healthcare National Health Service Trust (London, United Kingdom)**

Characteristics	All Patients N=220	AMR, N=52	TCMR, N=51	No Rejection, N=117
Age at biopsy, yr	52 [40–61]	47 [42–57]	54 [42–61]	52 [40–62]
Female, n (%)	61 (28)	16 (31)	31 (61)	14 (12)
<b>Cause of kidney failure, n (%)</b>				
Diabetes	43 (20)	5 (10)	12 (23)	26 (22)
Other glomerulonephritis	51 (23)	15 (29)	10 (20)	26 (22)
Nephrosclerosis	13 (6)	8 (15)	3 (6)	2 (2)
Cystic kidney disease	24 (11)	5 (10)	5 (10)	14 (12)
Tubulointerstitial or uropathy	25 (11)	9 (17)	6 (12)	10 (9)
Other	10 (5)	0	1 (2)	9 (8)
Unknown	54 (25)	10 (19)	14 (27)	30 (26)
Prior solid organ transplantation, n (%)	34 (15)	12 (23)	10 (20)	12 (10)
Living donor, n (%)	53 (24)	12 (23)	10 (20)	31 (27)
<b>Mismatch HLA</b>				
A	1.2±0.7	1.2±0.7	1.2±0.7	1.2±0.7
B	1.3±0.7	1.4±0.7	1.5±0.6	1.2±0.7
DR	1.1±0.7	1.2±0.8	1.2±0.7	1.0±0.7
<b>DSA at transplant</b>				
Class I	23 (11)	10 (19)	5 (10)	8 (7)
MFI of immunodominant anti-class I	1820±3030	4900±6223	640±156	950±218
Class II	23 (11)	13 (25)	5 (10)	5 (4)
MFI of immunodominant anti-class II	2748±4402	6675±6333	620±84	1010±173
<b>Induction therapy, n (%)</b>				
Antithymocyte globulin	28 (13)	15 (29)	10 (20)	3 (3)
Basiliximab	57 (26)	14 (27)	15 (29)	28 (24)
Alemtuzumab	135 (61)	23 (44)	26 (51)	86 (74)
<b>Maintenance immunosuppressive therapy, n (%)</b>				
Belatacept and antiproliferative	9 (4)	2 (4)	6 (12)	1 (1)
Belatacept alone	1 (0.5)	0	1 (2)	0
CNI and antiproliferative	107 (49)	36 (69)	27 (53)	44 (38)
CNI alone	86 (39)	13 (25)	17 (33)	56 (48)
CNI and mTORi	13 (6)	1 (2)	0	12 (10)
mTORi and antiproliferative	4 (2)	0	0	4 (3)
Corticosteroids	152 (69)	36 (69)	33 (65)	83 (71)
Time from kidney transplantation to biopsy, mo	13 [2–55]	40 [7–113]	9 [4–16]	11 [1–61]
Indication biopsy	212 (96)	52 (100)	50 (98)	110 (94)
<b>Donor-specific antibodies at biopsy</b>				
Class I, n (%)	20 (9)	14 (27)	2 (4)	4 (3)
MFI of immunodominant anti-class I	4474±4368	4234±4323	4000±4808	5550±5495
Class II, n (%)	49 (22)	37 (71)	4 (8)	8 (7)
MFI of immunodominant anti-class II	7159±5794	8352±5950	3668±4475	3388±2961
Plasma creatinine at biopsy, mg/dl, μmol/L	2.7±2.0	2.1±1.0	4.0±3.0	2.3±1.4
Proteinuria at biopsy, g/g of creatininuria	0.8±1.3	1.0±1.6	0.7±0.7	0.7±1.4
<b>Banff score</b>				
cg	0.4±0.9	1.2±1.3	0.1±0.2	0.1±0.5
ci	1.0±0.9	1.2±0.8	0.8±0.8	1.0±1.0
ct	1.0±0.9	1.1±0.8	1.0±0.8	1.0±0.9
cv	1.3±1.0	1.3±0.9	1.1±0.9	1.3±1.0
ptc	0.6±0.9	1.4±0.8	0.3±0.6	0.1±0.3
t	0.7±1.1	0.2±0.5	2.3±0.7	0.1±0.4
i	0.7±1.1	0.3±0.7	2.1±0.6	0.0±0.1
g	0.5±0.9	1.8±0.9	0.1±0.4	0.1±0.3
ah	0.9±1.1	1.2±1.3	0.4±0.6	1.0±1.2
v	0.1±0.4	0.1±0.4	0.3±0.7	0.0±0.0
ti	0.9±1.0	0.9±0.9	2.1±0.7	0.5±0.7
iIFTA	0.9±1.1	1.0±1.1	1.6±1.2	0.1±0.4
g+ptc	1.0±1.5	3.1±1.3	0.5±0.7	0.2±0.5
i+t	1.2±2.0	0.5±0.9	4.3±1.4	0.1±0.5
ci+ct	2.0±1.7	2.3±1.6	1.6±1.5	2.0±1.8
cv+ah	2.1±1.7	2.4±1.5	1.3±1.2	2.3±1.7
C4d	0.4±0.8	1.3±1.0	0.2±0.5	0.0±0.0

Results are expressed by mean ± SD or median [25th–75th percentiles]. *P* values refer to *t* tests performed between the three diagnostic categories. Among antibody-mediated rejection samples, mean [i+t] Banff score was 0.5 +/- 0.9. Indeed, 15/52 (29%) samples presented an isolated i or isolated t lesion, not reaching criteria for T-cell mediated or borderline for T-cell rejection. Among T-cell-mediated rejection samples, 17 of 51 (33%) presented a positive [g+ptc] score without reaching antibody-mediated rejection criteria. AMR, antibody-mediated rejection; TCMR, T-cell-mediated rejection; DSA, donor-specific antibody; MFI, mean fluorescence intensity; CNI, calcineurin inhibitors; mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitors.

**Table 2. Relative gene expression values assessed by the RT-MLPA assay according to diagnosis group in the French samples**

Gene	AMR (N=27)	TCMR (N=20)	Control (N=31)	<i>P</i> Value, Kruskal–Wallis <i>t</i> test	<i>P</i> Value, AMR versus TCMR	<i>P</i> Value, AMR versus Control	<i>P</i> Value, TCMR versus Control
CARD16	0.53±0.48	0.77±0.77	1.13±0.80	0.1	1.0	0.01 <sup>a</sup>	0.3
CD72	0.74±0.32	0.85±0.40	0.72±0.32	0.2	0.4	1.0	0.4
CD68	1.33±0.28	1.50±0.41	1.87±0.34	<0.001 <sup>a</sup>	0.6	<0.001 <sup>a</sup>	0.002 <sup>a</sup>
CCL4	1.35±0.27	1.30±0.28	1.03±0.26	<0.001 <sup>a</sup>	1.0	<0.001 <sup>a</sup>	0.003 <sup>a</sup>
CTLA4	0.20±0.16	0.42±0.34	0.15±0.16	0.01 <sup>a</sup>	0.3	0.7	0.01 <sup>a</sup>
PLA1A	1.50±0.24	0.95±0.22	1.38±0.34	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>	0.5	<0.001 <sup>a</sup>
ROBO4	0.78±0.31	0.37±0.25	0.79±0.47	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>	1.0	0.002 <sup>a</sup>
KLRD1	0.95±0.28	0.99±0.27	0.79±0.38	0.03 <sup>a</sup>	1.0	0.1	0.07
FCGR3	1.12±0.37	1.47±0.39	1.04±0.41	0.004 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	1.0	0.005 <sup>a</sup>
GNLY	0.97±0.43	0.74±0.25	0.64±0.38	0.009 <sup>a</sup>	0.3	0.007 <sup>a</sup>	0.7
CXCL11	0.82±0.42	0.82±0.48	0.45±0.34	0.002 <sup>a</sup>	1.0	0.004 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>
CCL18	0.39±0.30	1.03±0.65	0.35±0.32	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>	1.0	<0.001 <sup>a</sup>
CAV1	1.10±0.26	0.63±0.34	1.02±0.38	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>	1.0	<0.001 <sup>a</sup>
PECAM	1.87±0.24	1.27±0.35	1.94±0.41	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>	1.0	<0.001 <sup>a</sup>
PRF1	1.16±0.28	1.25±0.35	0.87±0.32	<0.001 <sup>a</sup>	1.0	0.006 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>
ADAMDEC1	0.13±0.15	0.58±0.49	0.09±0.13	<0.001 <sup>a</sup>	0.003 <sup>a</sup>	1.0	<0.001 <sup>a</sup>
IFNG	0.18±0.12	0.34±0.26	0.09±0.10	<0.001 <sup>a</sup>	0.4	0.04 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>

RT-MLPA, reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification; AMR, antibody-mediated rejection; TCMR, T-cell-mediated rejection.  
<sup>a</sup>Values *P* < 0.05.

with mean train and test scores at  $0.88 \pm 0.02$  and  $0.77 \pm 0.05$ , respectively. To assess the generalization of this model, a 15-fold cross-validation was performed (Supplemental Figure 4): mean F1 score =  $0.75 \pm 0.18$ , precision score =  $0.78 \pm 0.17$ , and recall score =  $0.76 \pm 0.20$ . In the test cohort, the F1 scores for antibody-mediated rejection, T-cell-mediated rejection, and control were 0.88, 0.69, and 0.86, respectively. Altogether, the weighted F1 score of the test cohort was 0.83 (Figure 2).

Receiver-operating characteristic (ROC) curves were also constructed to determine the area under the curve (AUC) for each specific class versus the two others. AUC for antibody-mediated rejection, T-cell-mediated rejection, and control predictions were 0.96, 0.89, and 0.91, respectively, with a weighted average at 0.94 (Supplemental Figure 5).

In the test cohort, 60% of T-cell-mediated rejection biopsies were correctly predicted, 33% as control, and 7% as antibody-mediated rejection. Among control biopsies, 88% were correctly predicted as control, 6% as antibody-mediated rejection, and 6% as T-cell-mediated rejection. For antibody-mediated rejection class prediction, performances were higher: 94% of biopsies were correctly predicted and 6% were predicted as control. Support vector machine features' importance for each diagnosis is depicted in Supplemental Figure 6. Twenty samples were used to test the influence of analytical variations between the two centers on diagnosis prediction: All samples were assigned to the same class in both centers (Supplemental Table 4).

### Nanostring

Gene expression levels from the RT-MLPA assay were compared with those from the Nanostring B-HOT panel. Molecular profiles assessed by Nanostring were available for 109 UK samples. Comparisons of clinical and biological data of samples assessed or not by the Nanostring B-HOT

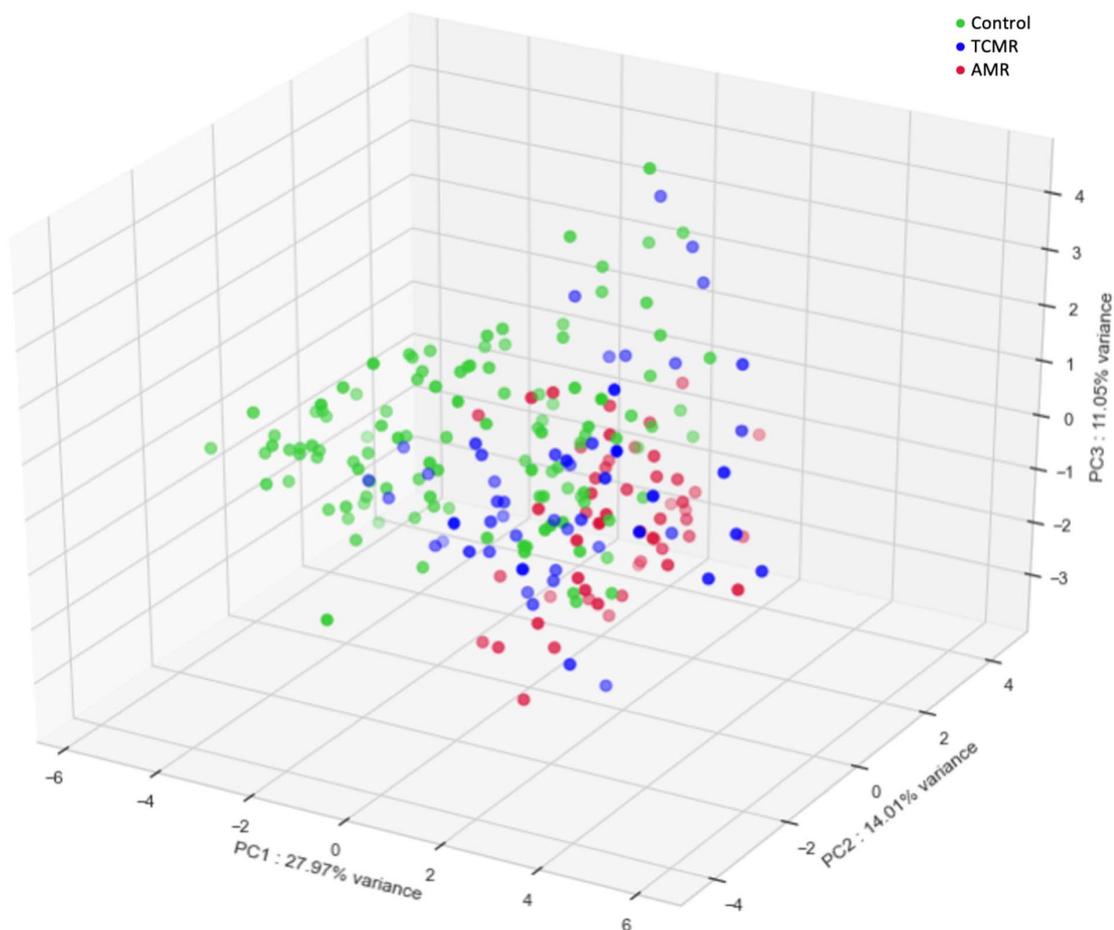
panel are reported in Supplemental Table 5. All 17 genes of our panel assessed by Nanostring, but one (CCL4), were differentially expressed in a statistically significant manner between diagnostic groups (Table 3). The normalization process used for RT-MLPA data was also applied to the Nanostring data, which showed that relative gene expression levels were also statistically different between diagnosis groups (Supplemental Table 6).

Finally, gene expression levels assessed by these two assays were compared. Nanostring-normalized gene expression profiles were comparable with those obtained with the RT-MLPA assay (Figure 3). Normalized gene expression levels correlated with an *r* coefficient of 0.68 ( $P < 0.001$ , Figure 4). Comparisons for each gene are presented in Supplemental Table 7: A significant correlation was observed for 11 of the 17 genes. Importantly, in 81% of the 109 samples, a correlation in gene expression levels was observed with a *P* value of  $<0.05$  (Supplemental Figure 7). Although no Nanostring-based classifier was built here, this suggests that both techniques can be used with comparable results.

### Discussion

In this study, we analyzed gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded kidney transplant biopsies using the RT-MLPA assay. We identified a 17-gene panel for the diagnosis and classification of rejection and validated a classifier. We also provided an open access tool for data processing and interpretation, allowing for replication of this assay in other kidney transplantation centers. Finally, we compared these results to data obtained using the Nanostring B-HOT panel.

The interest of the RT-MLPA assay has already been shown in several fields, such as hemato-oncology and inflammatory bowel diseases as well as molecular diagnosis of rejection in heart transplantation.<sup>20–23</sup> It is a simple



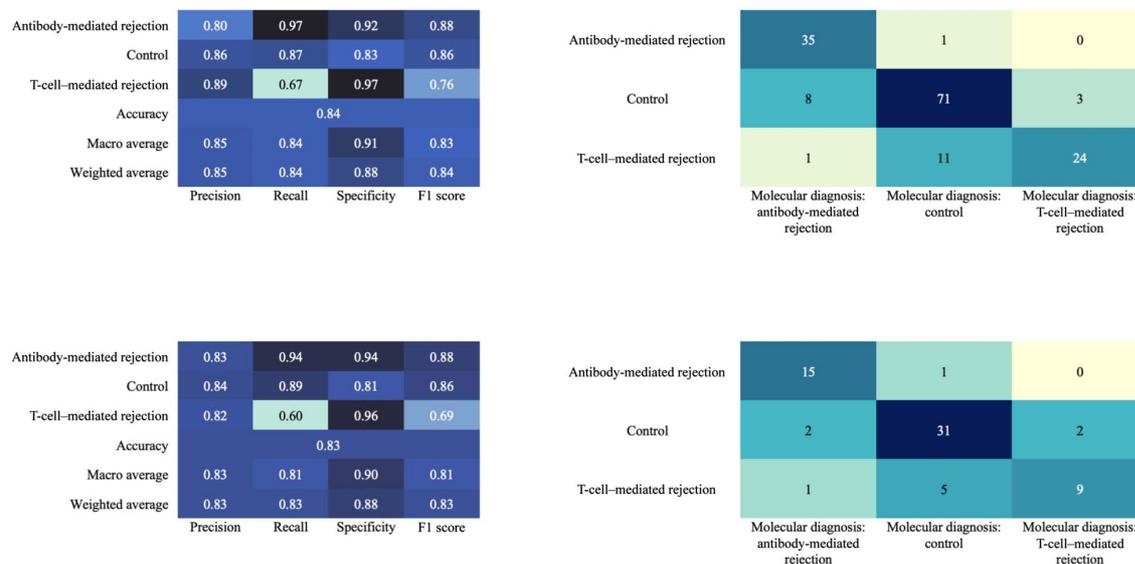
**Figure 1.** Principal component analysis shows variance scores of 28%, 14%, and 11% (PC1, PC2, and PC3, respectively). AMR, antibody-mediated rejection; TCMR, T-cell-mediated rejection.

assay on the basis of fragment-size analysis, requiring a capillary sequencer, available in a large majority of kidney transplantation centers. As probes hybridize on a small length of DNA (20–40 base pairs), the RT-MLPA assay allows testing samples conserved in fixative solutions known to induce some level of RNA degradation. We were thus able to use formalin-fixed paraffin-embedded blocks in our study, without the need for an extra kidney transplant biopsy core.<sup>24</sup> Moreover, interpretation of the results from our restricted gene panel did not require specific bioinformatic expertise, and reagent-related expenses were low, estimated at 15–20€ per sample. Finally, the whole procedure from RNA extraction to results reporting could be performed in <24 hours. Altogether, this assay seems appropriate for its implementation in routine practice, providing clinicians with an apprehensible molecular tool.

The gene panel was chosen according to pathophysiological data and previously published studies with PCR, Affymetrix, or Nanostring.<sup>3,4</sup> Several successive gene panels were evaluated until the final 17-gene panel on the basis of its ability to discriminate antibody-mediated rejection, T-cell-mediated rejection, and no-rejection controls.

Because these genes were also present in the Nanostring B-HOT panel,<sup>10</sup> it was possible to compare the RT-MLPA semiquantitative results to quantitative Nanostring counts in a subcohort of patients. Although this subcohort showed slight differences in Banff scores as compared with the rest of the cohort, analyses on the basis of absolute quantification of gene expression confirmed that the chosen gene panel was discriminant using the two techniques. Molecular profiles obtained with RT-MLPA or after normalization of Nanostring data were also comparable, supporting the relative quantification approach with RT-MLPA. However, no Nanostring-based classifier was built here because Nanostring results were not available for the 220 samples of the entire cohort. This 17-gene panel could certainly be optimized with additional and/or more discriminant genes identified during ongoing large multicentric molecular studies.<sup>10</sup> As data from RT-MLPA and Nanostring were comparable here, one could expect that the final recommended panel may be assessed by RT-MLPA with reliable results. Of note, the RT-MLPA assay can process one sample at a time, whereas the Nanostring assay is designed for 12-sample runs. On the whole, a kidney transplantation

SVC classification report



**Figure 2. Support vector classifier (SVC) report and confusion matrix in train (upper panel) and test (lower panel) cohorts.** The cohort was randomly split into a training set (70% of the cohort) and validation set (30%), keeping identical proportions of each diagnosis category. For each diagnosis, precision score is the ratio of correctly predicted samples (true positive) to all predicted samples (true and false positives). Recall score (*i.e.*, sensitivity) is the ratio of correctly predicted samples (true positive) to all samples in the class (true positive and false negative). Specificity score is the ratio of true negative to true negative and false positive. F1 score is the harmonic mean of precision and recall scores. Accuracy is the ratio of accurate predictions. Weighted average scores were calculated by taking into account the proportion of each diagnosis class. In the test cohort, performances for TCMR were lower; however, 89% of control biopsies and 94% of antibody-mediated rejection biopsies were correctly predicted. Altogether, the weighted F1 score of the test cohort was 0.83 and accuracy was 0.84. In the confusion matrices, rows are true diagnoses and columns are diagnoses predicted by the classifier.

center could acquire one of these techniques depending on the available local facilities and number of biopsies and molecular tests performed per year.

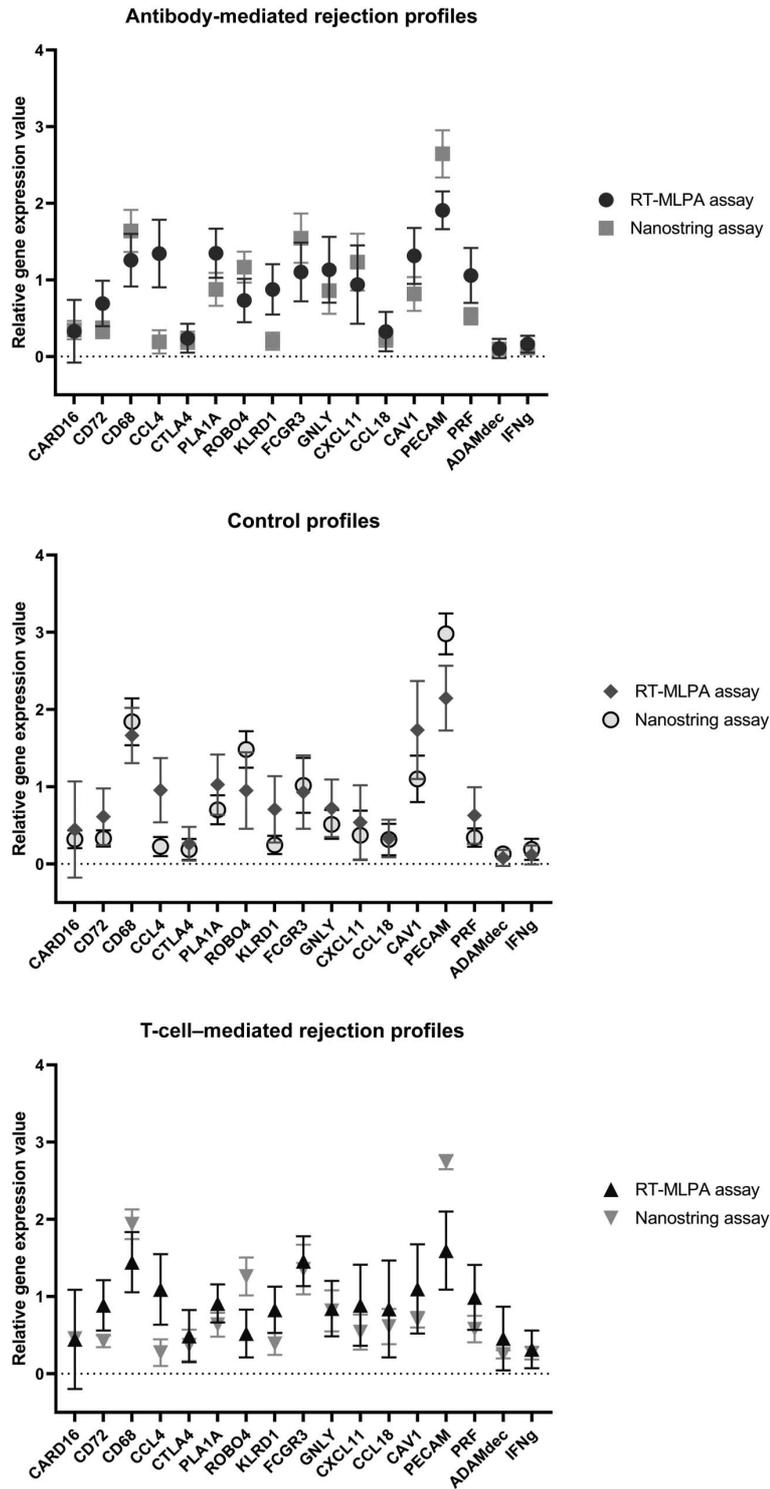
On the basis of a restricted 17-gene panel, we were able to build a classifier with a weighted average F1 score at 0.83 and a misclassified biopsy rate at 17% in the test cohort. The

**Table 3. Absolute gene expression values assessed by the Nanostring B-HOT panel according to diagnosis group in the UK samples**

Gene	AMR (N=24)	TCMR (N=6)	Control (N=79)	P Value, Kruskal–Wallis <i>t</i> test	P Value, AMR versus TCMR	P Value, AMR versus Control	P Value, TCMR versus Control
CARD16	79±40	67±21	43±21	<0.001 <sup>a</sup>	0.99	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>
CD72	80±41	58±14	44±31	<0.001 <sup>a</sup>	0.99	<0.001 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>
CD68	578±264	462±84	414±223	<0.001 <sup>a</sup>	0.99	<0.001 <sup>a</sup>	0.2
CCL4	51±51	38±21	29±22	0.1	0.99	0.2	0.7
CTLA4	49±33	60±40	26±26	<0.001 <sup>a</sup>	0.99	<0.001 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>
PLA1A	244±119	78±28	97±43	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>	0.99
ROBO4	341±107	207±41	273±69	<0.001 <sup>a</sup>	0.001 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.06
KLRD1	47±34	46±19	30±17	0.03 <sup>a</sup>	0.99	0.2	0.2
FCGR3	571±381	314±167	181±202	<0.001 <sup>a</sup>	0.6	<0.001 <sup>a</sup>	0.06
GNLY	255±123	123±50	78±46	<0.001 <sup>a</sup>	0.3	<0.001 <sup>a</sup>	0.2
CXCL11	434±478	70±39	75±251	<0.001 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	<0.001 <sup>a</sup>	0.6
CCL18	55±32	109±63	42±38	0.001 <sup>a</sup>	0.3	0.06	0.006 <sup>a</sup>
CAV1	228±112	165±158	177±83	0.04 <sup>a</sup>	0.08	0.2	0.6
PECAM	1464±424	1184±683	1059±237	<0.001 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.001 <sup>a</sup>	0.99
PRF1	119±43	83±22	46±29	<0.001 <sup>a</sup>	0.99	<0.001 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>
ADAMDEC1	22±15	33±11	15±12	0.001 <sup>a</sup>	0.1	0.1	0.003 <sup>a</sup>
IFNG	27±20	36±12	21±19	0.007 <sup>a</sup>	0.2	0.3	0.01 <sup>a</sup>

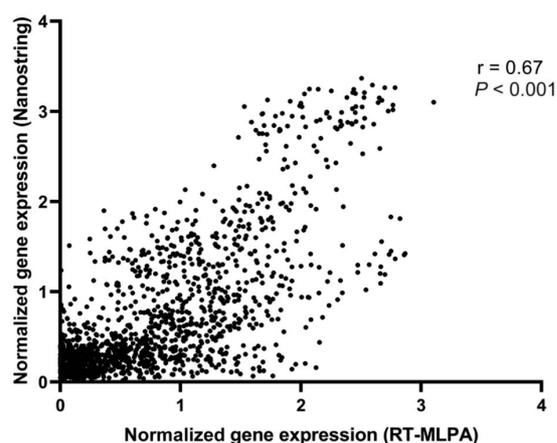
B-HOT, Banff Human Organ Transplant; AMR, antibody-mediated rejection; TCMR, T-cell-mediated rejection.  
<sup>a</sup>Values *P* < 0.05.

Downloaded from https://www.ajph.org/ by guest on 04/10/2023



**Figure 3. Gene expression profiles obtained with the RT-MLPA and Nanostring assays were comparable.** Results are expressed for each gene as the mean (symbols) and SD (whiskers) of relative gene expression value in each diagnosis category after data normalization. Profiles obtained using these two assays were comparable for most of the genes, leading to consistent molecular profiles. RT-MLPA, reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification.

Downloaded from <http://journals.lww.com/cjasn> by WITZ+DACCOP+P+RaqS/SkS/EAxvhs9t1pb3NAJk/Sb0100c9w/HwB7/WLub  
 6K3FFH1yP+LvmvG/W01atLlUD3BCc1YD+VclP+P+69COXb1QAxnVXFrnhJHrVsaUyBvIOACMUA43K7T93S9AKUJURNOV/P+CS87Y/COC  
 HqYCoqpdDmItcSjRfGtUge7eUgtUkA== on 04/10/2023



**Figure 4. Normalized gene expression levels assessed by the RT-MLPA and Nanostring assays are correlated.** Using the Spearman rank test,  $r$  value was 0.68 with  $P < 0.001$ .

highest performances were observed for the antibody-mediated rejection category. Indeed, in the test cohort, 94% of antibody-mediated rejection biopsies were correctly classified, and only 6% of control biopsies and 7% of T-cell-mediated rejection biopsies were misclassified into the antibody-mediated rejection category. Importantly, graft function was similar in the antibody-mediated rejection and control groups as control biopsies were predominantly for-cause biopsies with altered graft function and histology, which reflects the real-life situations and emphasizes the potential clinical applicability of this molecular tool. Consequently, the assay could be considered as a helpful tool in antibody-mediated rejection with an incomplete phenotype or to substitute the Banff criterion 2 or 3 for antibody-mediated rejection. By contrast, classifier performances for T-cell-mediated rejection were lower, with a high rate of T-cell-mediated rejection biopsies misclassified as no rejection, exposing to the risk of not treating a T-cell-mediated rejection. However, this should be tempered by the fact that the classifier does not consider clinical data or graft function. Indeed, T-cell-mediated rejection often occurs in a particular clinical setting, for example, decreased immunosuppression or treatment switch likely associated with AKI, which affects interpretation of pathological and molecular data. This underlines that the molecular tool should be considered as a help rather than a substitute to pathological tools.

Our study has some limitations. First, mixed rejections were excluded. Indeed, because this category is not individualized in the Banff classification and there is to date no clear molecular phenotype of mixed rejection,<sup>25–27</sup> we selected only well-defined outcomes to build the classifier. BK virus nephropathy was also excluded because recent works showed that the overlap of immune-related genes between T-cell-mediated rejection and BK virus nephropathy hampers their concomitant evaluation.<sup>28</sup> Moreover, although biopsies were selected in two different centers to develop and validate the classifier on the basis of a random-split strategy, our results could be strengthened by a higher

number of samples and a real-life prospective evaluation of the model predictive performances.<sup>29</sup> However, some level of heterogeneity in our cohort, linked to the two-center recruitment and likely reflecting the known variability in histopathological evaluation,<sup>2,24</sup> did not impair the generalization of the selected model. At last, this study was not designed to analyze the effect of molecular diagnosis on patient management and graft survival. Indeed, further studies are needed to evaluate whether this assay could afford early diagnosis of rejection and risk stratification and assist clinicians in the treatment strategy, for example, in patients with *de novo* DSA.

We developed a simple molecular tool on the basis of a restricted gene panel that can be used on formalin-fixed paraffin-embedded kidney transplant blocks in a routine-compatible strategy. Moreover, we have provided an automated classifier, which enables rapid adoption of this tool by other transplantation centers. Finally, we compared the results obtained by the RT-MLPA assay with those obtained with the Nanostring assay and showed that a gene panel can be adapted from one of these techniques to the other.

#### Disclosures

S. Candon reports research funding from CSL Behring and honoraria from GILEAD. C. Roufosse reports consultancy agreements with Achillion, Rigel Pharmaceutical, and UCB. All remaining authors have nothing to disclose.

#### Funding

The study was supported by the Association pour le développement des recherches sur le rein artificiel en Normandie (Grant No. 2020-1234-001). This research project was also supported by the NIHR Imperial Biomedical Research Centre (BRC). Dr. Roufosse's research activity is made possible with generous support from Sidharth and Indira Burman. Some of the human samples used in this research project were obtained from the Imperial College Healthcare Tissue Bank (ICHTB). ICHTB is supported by the National Institute for Health Research (NIHR) Biomedical Research Centre based at Imperial College Healthcare NHS Trust and Imperial College London. ICHTB is approved by Wales REC3 to release human material for research (17/WA/0161).

#### Acknowledgments

The views expressed are those of the author(s) and not necessarily those of the NIHR or the Department of Health and Social Care. The authors are thankful to the French Society of Transplantation; the French Society of Nephrology, Dialysis and Transplantation; and the Charles Nicolle's Foundation for the financial support of the first author.

#### Author Contributions

**Conceptualization:** Dominique Bertrand, Edvin Candon, Sophie Candon, Fanny Drieux, Tristan de Nattes

**Data curation:** Jack Beadle, Fanny Drieux, Arnaud François, Tristan de Nattes, Candice Roufosse, Frederic Toulza.

**Formal analysis:** Tristan de Nattes.

**Funding acquisition:** Dominique Bertrand, Sophie Candon, Dominique Guerrot, Tristan de Nattes, Candice Roufosse.

**Investigation:** Jack Beadle, Edvin Candon, Arnaud François, Tristan de Nattes, Candice Roufosse, Frederic Toulza.

**Methodology:** Sophie Candon, Fanny Drieux, Tristan de Nattes, Philippe Ruminy.

**Project administration:** Sophie Candon.

**Software:** Edvin Candon, Tristan de Nattes.

**Supervision:** Sophie Candon.

**Visualization:** Tristan de Nattes.

**Writing – original draft:** Tristan de Nattes.

**Writing – review & editing:** Jack Beadle, Dominique Bertrand, Edvin Candon, Sophie Candon, Fanny Drieux, Arnaud François, Dominique Guerrot, Tristan de Nattes, Candice Roufosse, Philippe Ruminy, Frederic Toulza.

#### Data Sharing Statement

Data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on request.

#### Supplemental Material

This article contains the following supplemental material online at <http://links.lww.com/CJN/B637>.

**Supplemental Methods.** RT-MLPA and Nanostring assays.

**Supplemental Table 1.** Probes sequences used in the RT-MLPA 17-gene panel.

**Supplemental Table 2.** Spread of diagnoses in controls groups.

**Supplemental Table 3.** Clinical and biological characteristics of samples.

**Supplemental Table 4.** Inter-laboratory reproducibility.

**Supplemental Table 5.** Clinical and biological characteristics of samples assessed or not by the Nanostring B-HOT panel.

**Supplemental Table 6.** Relative gene expression values assessed by the Nanostring B-HOT panel.

**Supplemental Table 7.** Correlation analyses of relative gene expression levels obtained by the RT-MLPA or the Nanostring assay.

**Supplemental Figure 1.** Flow chart of samples selection.

**Supplemental Figure 2.** Heat map of unsupervised hierarchical analysis of gene expression levels assessed by the RT-MLPA assay.

**Supplemental Figure 3.** Influence of the initial random 70/30 split on train and test scores.

**Supplemental Figure 4.** Fifteen-fold cross-validation of the selected model.

**Supplemental Figure 5.** Performances of the classifier assessed by ROC analyses.

**Supplemental Figure 6.** Relative importance of support vector classifier features for each diagnosis category.

**Supplemental Figure 7.** Normalized gene expression levels assessed by RT-MLPA and Nanostring assays in matched samples.

#### References

- Sellarés J, de Freitas D, 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(2):388–399. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x
- Furness PN, Taub N; Convergence of European Renal Transplant Pathology Assessment Procedures (CERTPAP) Project. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project1. *Kidney Int.* 2001; 60(5):1998–2012. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00030.x
- Halloran PF, Famulski KS, Reeve J. Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(9):534–548. doi:10.1038/nrneph.2016.85
- Halloran PF, Venner JM, Madill-Thomsen KS, et al. Review: the transcripts associated with organ allograft rejection. *Am J Transplant.* 2018;18(4):785–795. doi:10.1111/ajt.14600
- Halloran PF, Reeve J, Akalin E, et al. Real time central assessment of kidney transplant indication biopsies by microarrays: the INTERCOMEX Study. *Am J Transplant.* 2017;17(11):2851–2862. doi:10.1111/ajt.14329
- Adam B, Afzali B, Dominy KM, et al. Multiplexed color-coded probe-based gene expression assessment for clinical molecular diagnostics in formalin-fixed paraffin-embedded human renal allograft tissue. *Clin Transplant.* 2016;30(3):295–305. doi:10.1111/ctr.12689
- Dominy KM, Willicombe M, Al Johani T, et al. Molecular assessment of C4d-positive renal transplant biopsies without evidence of rejection. *Kidney Int Rep.* 2019;4(1):148–158. doi:10.1016/j.ekir.2018.09.005
- Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant.* 2018;18(2):293–307. doi:10.1111/ajt.14625
- Roufosse C, Haas M, Loupy A, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2021; 21(5):1689–1690. doi:10.1111/ajt.16419
- Mengel M, Loupy A, Haas M, et al. Banff 2019 Meeting Report: molecular diagnostics in solid organ transplantation - consensus for the Banff Human Organ Transplant (B-HOT) gene panel and open source multicenter validation. *Am J Transplant.* 2020;20(9): 2305–2317. doi:10.1111/ajt.16059
- Schinstock CA, Sapir-Pichhadze R, Naesens M, et al. Banff survey on antibody-mediated rejection clinical practices in kidney transplantation: diagnostic misinterpretation has potential therapeutic implications. *Am J Transplant.* 2019;19(1):123–131. doi:10.1111/ajt.14979
- Toulza F, Dominy K, Cook T, et al. Technical considerations when designing a gene expression panel for renal transplant diagnosis. *Sci Rep.* 2020;10(1):17909. doi:10.1038/s41598-020-74794-3
- Toulza F, Dominy K, Willicombe M, et al. Diagnostic application of transcripts associated with antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies. *Nephrol Dial Transplant.* 2022;37(8): 1576–1584. doi:10.1093/ndt/gfab231
- Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, et al. Accurate classification of germinal center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like diffuse large B-cell lymphoma using a simple and rapid reverse transcriptase-multiplex ligation-dependent probe amplification assay: a CALYM Study. *J Mol Diagn.* 2015;17(3):273–283. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.01.007
- Eldering E, Spek CA, Abernethy HL, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(23): e153. doi:10.1093/nar/gng153
- Dominy KM, Roufosse C, De Kort H, et al. Use of quantitative real time polymerase chain reaction to assess gene transcripts associated with antibody-mediated rejection of kidney transplants. *Transplantation.* 2015;99(9):1981–1988. doi:10.1097/TP.0000000000000621.
- Reeve J, Sellarés J, Mengel M, et al. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant.* 2013;13(3):645–655. doi:10.1111/ajt.12079
- Halloran PF, Venner JM, Famulski KS. Comprehensive analysis of transcript changes associated with allograft rejection: combining universal and selective features. *Am J Transplant.* 2017;17(7): 1754–1769. doi:10.1111/ajt.14200
- Aubert O, Loupy A, Hidalgo L, et al. Antibody-mediated rejection due to preexisting versus de novo donor-specific antibodies in kidney allograft recipients. *J Am Soc Nephrol.* 1912–19232017; 28(6):1912–1923. doi:10.1681/ASN.2016070797
- Gologan S, Iacob R, Iancu D, et al. Inflammatory gene expression profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis: a comparative analysis using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification protocol. *J Crohns Colitis* 2013; 7(8):622–630. doi:10.1016/j.crohns.2012.08.015
- Bobée V, Ruminy P, Marchand V, et al. Determination of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification classifier: a CALYM Study. *J Mol Diagn.* 2017;19(6):892–904. doi:10.1016/j.jmoldx.2017.07.007
- Adam N, Coutance G, Drieux F, et al. RT-MLPA as a new tool for the molecular diagnosis of allograft rejection in formalin paraffin-embedded endomyocardial biopsies. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37(4):S79. doi:10.1016/j.healun.2018.01.179
- Drieux F, Ruminy P, Abdel-Sater A, et al. Defining the signatures of peripheral T-cell lymphoma, with a targeted 20-markers gene expression profiling assay (RT-MLPA). *Haematologica.*

- 2020;105(6):1582–1592. doi:[10.3324/haematol.2019.226647](https://doi.org/10.3324/haematol.2019.226647)
24. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One*. 2007;2(12):e1261. doi:[10.1371/journal.pone.0001261](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001261)
  25. Madill-Thomsen K, Perkowska-Ptasińska A, Böhmig GA, et al. Discrepancy analysis comparing molecular and histology diagnoses in kidney transplant biopsies. *Am J Transplant*. 2020;20(5):1341–1350. doi:[10.1111/ajt.15752](https://doi.org/10.1111/ajt.15752)
  26. Vaulet T, Divard C, Thaunat O, et al. Data-driven derivation and validation of novel phenotypes for acute kidney transplant rejection using semi-supervised clustering. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(5):1084–1096. doi:[10.1681/ASN.2020101418](https://doi.org/10.1681/ASN.2020101418)
  27. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thaunat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int*. 2022;101(4):692–710. doi:[10.1016/j.kint.2021.11.029](https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.11.029)
  28. Adam BA, Kikic Z, Wagner S, et al. Intragraft gene expression in native kidney BK virus nephropathy versus T cell-mediated rejection: prospects for molecular diagnosis and risk prediction. *Am J Transplant*. 2020;20(12):3486–3501. doi:[10.1111/ajt.15980](https://doi.org/10.1111/ajt.15980)
  29. Collins GS, Dhiman P, Andaur Navarro CL, et al. Protocol for development of a reporting guideline (TRIPOD-AI) and risk of bias tool (PROBAST-AI) for diagnostic and prognostic prediction model studies based on artificial intelligence. *BMJ Open*. 2021;11(7):e048008. doi:[10.1136/bmjopen-2020-048008](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-048008)

**Received:** August 26, 2022 **Accepted:** January 17, 2023

Published online ahead of print. Publication date available at [www.cjasn.org](http://www.cjasn.org).

## Supplemental material

### Table of content

Supplemental material	1
Table of content	1
Supplemental method	2
Supplemental table 1	5
Supplemental table 2	7
Supplemental table 3	8
Supplemental table 4	9
Supplemental table 5	10
Supplemental table 6	11
Supplemental table 7	12
Supplemental figure legends	13
Supplemental figure 1	13
Supplemental figure 2	13
Supplemental figure 3	13
Supplemental figure 4	13
Supplemental figure 5	13
Supplemental figure 6	13
Supplemental figure 7	13
Supplemental figures	14
Supplemental figure 1	15
Supplemental figure 2	16
Supplemental figure 3	17
Supplemental figure 4	18
Supplemental figure 5	19
Supplemental figure 6	20
Supplemental figure 7	21

## Supplemental method

### Gene panel:

To prepare the mixed probes stock solution of the 17-gene panel, 2  $\mu\text{L}$  of each probe (or probe + competitor) ( $n = 34$ ) at 10  $\mu\text{mol/L}$  were mixed then half-diluted with 1x TE buffer. The working solution was obtained by diluting  $0.4 \mu\text{L} \times 34 = 13.6 \mu\text{L}$  of the stock solution with 500  $\mu\text{L}$  of RNA free water and completed with 1x TE buffer until 1000  $\mu\text{L}$ .

Two genes (CD68 and FcgR3) had a higher level of expression as compared to other genes in the panel, saturating the fluorescent signal in the capillary sequencer. To normalise these signals, competitor probes identical to 5' probes, but without the universal primers, were added. For FcgR3, a 2:3 ratio was used for the probe and its competitor. For CD68, a 1:3 ratio was used.

### RT-MLPA assay protocol:

For the reverse transcription step, 2  $\mu\text{L}$  of RNA were incubated with 1  $\mu\text{L}$  of 50  $\mu\text{M}$  random hexamers and 1  $\mu\text{L}$  of 10 mM dNTP, and heated at 65  $^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. Then 1.25  $\mu\text{L}$  of 5X RT-MMLV Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and 0.5  $\mu\text{L}$  of 0.1 M DTT were added and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 2 minutes to allow hybridisation of random hexamers. Finally, 0.5  $\mu\text{L}$  of 200 U/ $\mu\text{L}$  RT-MMLV was added, and samples were incubated at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes, 37  $^{\circ}\text{C}$  for 50 minutes then inactivated at 70  $^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes.

For the hybridisation step, 1.5  $\mu\text{L}$  of MLPA buffer (MRC Holland, Amsterdam, Netherland) and 1.5  $\mu\text{L}$  of probe mix were added to the 6.25  $\mu\text{L}$  solution obtained at the RT step, heated at 95  $^{\circ}\text{C}$  for 2 minutes, hybridised at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 1 hour then stored at 54  $^{\circ}\text{C}$ .

For the ligation step, a ligation mix was prepared with 25  $\mu\text{L}$  of RNA-free water, 6  $\mu\text{L}$  of ligase 65-buffer, and 1  $\mu\text{L}$  of Ligase 65 (MRC Holland, Amsterdam, Netherland). Importantly, due to the instability of hybridisation, adjunction of the ligation mix to the hybridisation product was performed at 54  $^{\circ}\text{C}$ . Incubation lasted 15 minutes at 54  $^{\circ}\text{C}$ , then ligase was inactivated at 98  $^{\circ}\text{C}$  for two minutes and the ligation product stored at 4  $^{\circ}\text{C}$ .

For the PCR amplification, 4  $\mu\text{L}$  of ligation product was added to 6  $\mu\text{L}$  of PCR mix, composed by 0.2  $\mu\text{L}$  of 10 mM dNTP, 0.5  $\mu\text{L}$  of 10  $\mu\text{M}$  primer U1, 0.5  $\mu\text{L}$  of 10  $\mu\text{M}$  FAM-labeled primer U2, 0.7  $\mu\text{L}$  of RNA-free water, 2  $\mu\text{L}$  of 5X Q5 buffer, 2  $\mu\text{L}$  of 5X Q5 High GC Enhancer and 0.1  $\mu\text{L}$  of Q5 High Fidelity (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA). The amplification was performed with an initial denaturation at 98  $^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds, then 36 cycles (98  $^{\circ}\text{C}$  for 10 seconds, 58  $^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds and 72  $^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds), and a final extension at 72  $^{\circ}\text{C}$  for 2 minutes before storage at 4  $^{\circ}\text{C}$ .

For amplicons analysis, 1.5  $\mu\text{L}$  of PCR product was mixed to 19  $\mu\text{L}$  of formamide and 0.5  $\mu\text{L}$  of Gene Scan 400HD ROX size standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and incubated at 95  $^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. Finally, this product was loaded on a 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Capillary electrophoresis settings were: Pre-Run Voltage 15 kV; Pre-Run Time 18 seconds; Injection Voltage 1 kV; Injection Time 10 seconds, Run Voltage 10 kV, Run Time 900 seconds.

# MLPA assay

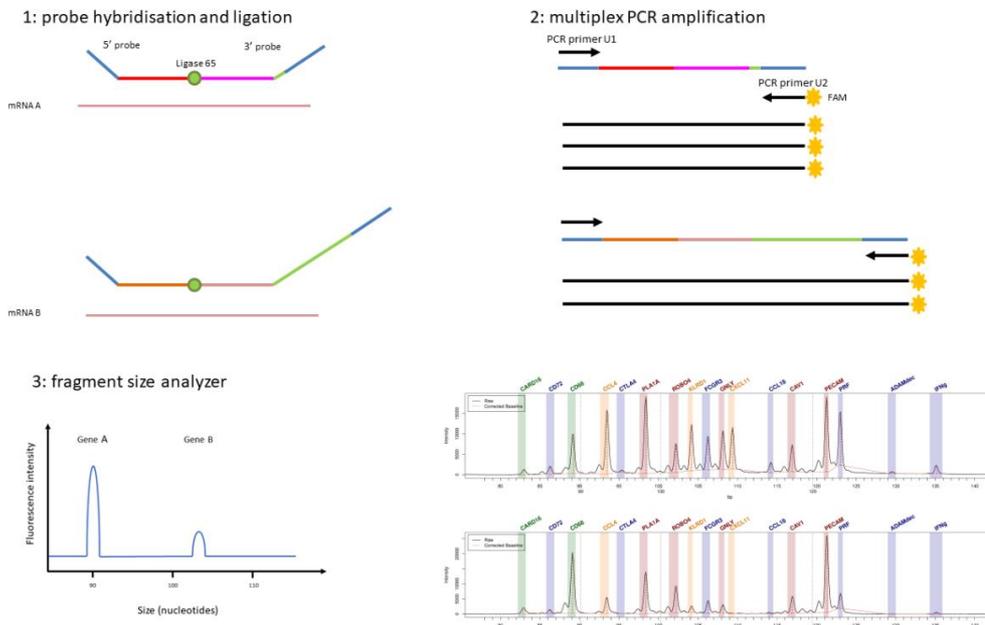


Illustration of the MLPA assay: the universal primer sequence U1 and U2 of the 5' and 3' probes respectively are depicted in blue. Exon-specific sequences are in red and orange (5' probes) and in pink and brown (3' probes). Spacer sequences are represented in green. Black arrows represent the PCR primer U1 and FAM-labelled primer U2. Amplicons obtained after multiplex PCR are loaded on a capillary sequencer and fluorescent amplicons are identified according to their size (left panel 3). Data analysis software provides a representation of the intensity of each amplicon according to their size. The right panel 3 provides examples of molecular profiles: antibody mediated rejection (upper side) and no-rejection control (lower side).

## Nanostring assay protocol:

A minimum of 100ng RNA was hybridised to capture and reporter probes for 18h at 65°C. Hybridisation complexes were purified, immobilized and counted using the nCounter Sprint Profiler (NanoString Technologies, United States). Quality control and normalisation of the raw gene expression counts was performed with nSolver Analysis Software version 4.0 (NanoString Technologies) with default parameters for quality control flagging. Each sample was normalised to the geometric mean of the positive controls followed by normalization to the geometric means of the 12 internal reference genes. Background subtraction was performed for each sample using the geometric mean of the negative controls.

Supplemental tables

Supplemental table 1

Gene	Probe	Sequence	Size
CARD16	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGAGGTAGGAGAGAAAGCCATGGCCG	90
	3'	ACAAGGTCTGAAGGGAAGAGAAAGCCATGGCCG	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGAGGTAGGAGAGAAAGCCATGGCCG	
CD72	3'	CGGTCAAGTGGAGCAGCCATCCAAACCCTTAGGGAACCC	92
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACACAACCCAGGTGGAGGAGAG	
	3'	GCTTGGGGCATCTGTACTGAAACCCATCCAAACCCTTAGGGAACCC	
CD68	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACACAACCCAGGTGGAGGAGAG	95
	3'	ACACAACCCAGGGTGGAGGAGAG	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
CCL4	3'	TGGGCTCAGACCCCTCCACCTACTACTATCCAAACCCTTAGGGAACCC	100
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAICCTCACAGCTGTCTTTGAGCAAAATG	
	3'	CTAAAGAAAAGAGCCCTTTACAACAGTTCCAAACCCTTAGGGAACCC	
PLA1A	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	104
	3'	ATTTGGTATTCGGATTCCCGTTGTACTACTATCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
ROBO4	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	108
	3'	GAACAGGCTCTCTCCCATGCCAAGTACTACTTCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
KLRD1	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	110
	3'	ACTCTGACTGTCTTCTTGGCAAGTACTACTACTTCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
FCGR3A	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	112
	3'	GTTTGGCAGTGTCAACCATCTCATCTACTATCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	TACTTCAGAGACTGTGAAACATCACCATCAGTCAAG	
GNLY	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	114
	3'	AGAAAGTGTCTCCAAATGCTGGACCTACTACTACTTCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
CXCL11	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	116
	3'	TATTACCCCTGAAGAATAAAGGACACCGATGCTCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
CCL18	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	120
	3'	CCTCCTAACCAAGAGAGGGCCGGCTACTACTACTTCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
CAV1	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	122
	3'	ATTGACTTGAAGATGTGATTCGAGAACCTACTACTACTATCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
PECAM1	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	126
	3'	GAGTGCCTCAGTCCAGGGTACTACTACTACTTCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
PRF1	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	128
	3'	TTTCCATGTGTACACACTCCCTCCCTACTACTACTACTATCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
ADAMDEC1	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	134
	3'	GAGTGTACCAATCTGTGTGAATACTACTACTACTTCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	
IFNG	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	140
	3'	GTAACCTGACTTGAATGTCCAACCCAAAGCACTACTACTACTATCCAAACCCTTAGGGAACCC	
	5'	GTGCCAGCAAGATCCAAATCTAGATAACTACTACAGGGCTTCACGACCAA	

*Supplemental table 1: Probes sequences used in the RT-MLPA 17-gene panel. Blue sequences are complementary sequence of universal primers U1 for 5' probes, and complementary sequence of universal primer U2 for 3' probes. Green sequences are spacer (repeated T-A-C). Exon-specific sequences are in pink (5' probes) and red (3' probes). All 3' probes include a phosphorylated 5' extremity to allow ligation to their corresponding 5' probe. Two genes (CD68 and FcgR3) had a higher level of expression as compared to other genes in the panel, saturating the fluorescent signal in the capillary sequencer. To normalize these signals, competitor probes identical to 5' probes, but without the primers, were added. For FcgR3, a 2:3 ratio was used for the probe and its competitor. For CD68, a 1:3 ratio was used.*

**Supplemental table 2**

	French samples (N = 31)	UK samples (N = 86)	p-value
Indication biopsies, n (%)	24 (77)	86 (100)	< 0.001
Plasma creatinine at biopsy, $\mu\text{mol/L}$	165 $\pm$ 88	247 $\pm$ 221	0.02
Diagnosis, n (%)			
- Glomerulonephritis	5 (16)	7 (8)	< 0.001
- Microvascular inflammation	5 (16)	0	
- Normal or acute tubular necrosis	13 (42)	38 (44)	
- Tubulointerstitial fibrosis	1 (3)	37 (43)	
- Other	7 (23)	4 (5)	

*Supplemental table 2: Spread of diagnoses in controls group.*

**Supplemental table 3**

	Antibody mediated rejection		p-value	T-cell mediated rejection		p-value	No rejection		p-value
	French samples (N = 27)	UK samples (N = 25)		French samples (N = 20)	UK samples (N = 31)		French samples (N = 31)	UK samples (N = 86)	
Time from kidney transplant to biopsy, months	40 [7-113]	46 [4-111]	0.9	12 [5-16]	8 [4-17]	0.7	12 [3-122]	18 [2-60]	0.5
Indication biopsy	27 (100)	25 (100)	1.0	20 (100)	30 (97)	0.4	24 (77)	86 (100)	< <b>0.001</b>
Donor-specific antibodies at biopsy	6 (22)	8 (32)	0.4	0	2 (7)	0.2	0	4 (5)	0.2
Class I, n (%)	5792 ± 2189	3065 ± 3244	0.3		4000 ± 4808			5550 ± 5495	
MFI of immunodominant anti-class I									
Class II, n (%)	19 (70)	18 (60)	0.9	2 (10)	2 (7)	0.6	2 (7)	6 (7)	0.9
MFI of immunodominant anti-class II	6432 ± 5560	10378 ± 5812	0.053	5535 ± 6696	1800 ± 1131	1	2500 ± 283	3683 ± 3441	0.9
Plasma creatinine at biopsy, µmol/L	186 ± 60	179 ± 116	0.1	570 ± 281	267 ± 268	< <b>0.001</b>	165 ± 88	247 ± 221	<b>0.02</b>
Proteinuria at biopsy, g/g of creatininuria	0.5 ± 0.6	1.5 ± 2.1	0.1	0.8 ± 0.5	0.6 ± 0.8	0.08	0.6 ± 0.6	0.7 ± 1.6	0.2
Banff score									
cg	1.1 ± 1.2	1.2 ± 1.4	1.0	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.3	1	0.3 ± 0.9	0.1 ± 0.4	0.4
ci	1.4 ± 0.8	1.0 ± 0.8	0.1	0.7 ± 0.7	0.8 ± 0.8	0.5	0.9 ± 0.8	1.0 ± 1.0	0.9
ct	1.1 ± 0.8	1.1 ± 0.7	0.7	1.0 ± 1.0	1.0 ± 0.7	0.7	0.6 ± 0.7	1.1 ± 0.9	<b>0.04</b>
cv	1.4 ± 0.9	1.2 ± 0.9	0.4	1.1 ± 1.0	1.1 ± 0.9	1	1.2 ± 1.0	1.4 ± 1.0	0.6
ptc	1.3 ± 0.8	1.6 ± 0.9	0.2	0.7 ± 0.7	0.1 ± 0.4	< <b>0.001</b>	0.3 ± 0.7	0.0 ± 0.2	<b>0.004</b>
t	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.7	<b>0.001</b>	2.3 ± 0.8	2.4 ± 0.6	0.9	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.4	0.9
i	0.0 ± 0.2	0.6 ± 0.9	<b>0.001</b>	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.7	0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.2	1
g	1.8 ± 0.8	1.7 ± 0.9	0.6	0.3 ± 0.6	0.1 ± 0.2	0.2	0.4 ± 0.7	0.0 ± 0.1	< <b>0.001</b>
ah	1.5 ± 1.3	0.8 ± 1.1	<b>0.03</b>	0.7 ± 0.7	0.2 ± 0.5	<b>0.006</b>	1.0 ± 1.2	1.0 ± 1.1	0.9
v	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.6	0.5	0.6 ± 1.0	0.1 ± 0.4	<b>0.04</b>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1
ti	0.8 ± 0.9	1.0 ± 1.0	0.5	2.1 ± 0.8	2.1 ± 0.6	0.9	0.4 ± 0.5	0.5 ± 0.7	0.9
iIFTA	0.9 ± 1.1	1.3 ± 1.3	0.5	1.2 ± 1.6	1.8 ± 1.0	0.5	0.1 ± 0.4	0.2 ± 0.6	0.5
g + ptc	3.1 ± 1.2	3.2 ± 1.4	0.9	1.0 ± 0.8	0.1 ± 0.4	< <b>0.001</b>	0.7 ± 1.1	0.0 ± 0.2	< <b>0.001</b>
i + t	0.0 ± 0.2	1.0 ± 1.1	< <b>0.001</b>	4.6 ± 1.2	4.2 ± 1.6	0.4	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.5	0.9
ci + ct	2.4 ± 1.6	2.0 ± 1.6	0.3	1.6 ± 1.6	1.7 ± 1.5	0.7	1.5 ± 1.4	2.1 ± 1.9	0.4
cv + ah	2.9 ± 1.4	1.9 ± 1.6	<b>0.01</b>	1.5 ± 1.3	1.2 ± 1.2	0.5	2.2 ± 1.8	2.3 ± 1.7	0.8
C4d	1.3 ± 1.0	1.4 ± 1.1	0.8	0.5 ± 0.7	0.1 ± 0.3	<b>0.007</b>	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.05

Supplemental table 3: Clinical and biological characteristics of samples. MFI: mean fluorescence intensity.

**Supplemental table 4**

Sample identification	Profile's coefficient of variation between centres (%)	Predicted class in France	Predicted class in the UK
1	10.0	TCMR	TCMR
2	11.0	AMR	AMR
3	7.5	Control	Control
4	14.2	TCMR	TCMR
5	14.2	Control	Control
6	11.5	Control	Control
7	15.3	Control	Control
8	21.0	TCMR	TCMR
9	19.2	Control	Control
10	19.5	Control	Control
11	18.7	Control	Control
12	7.9	AMR	AMR
13	10.5	TCMR	TCMR
14	16.1	AMR	AMR
15	14.9	TCMR	TCMR
16	13.0	Control	Control
17	14.1	Control	Control
18	32.3	Control	Control
19	15.3	Control	Control
20	11.4	AMR	AMR

*Supplemental table 4: Inter-laboratory reproducibility is shown for 20 samples tested independently in the two centres. An average coefficient of variation (CV) was calculated for each sample as the mean CV (100\*standard deviation/mean) of normalized values observed for each gene in each centre. CV for analytical repeatability was 13.2%, measured on 4 samples analysed 3 or 4 times. CV for inter-laboratory reproducibility was 14.9%. The average percentage of change in normalized gene expression values between laboratories was 35.4% ± 41.3% (mean, SD), with an average fold variation at 1.35 ± 0.41.*

**Supplemental table 5**

	AMR samples assessed by the B-HOT panel N = 26	AMR samples not assessed by the B-HOT panel N = 26	AMR samples assessed by the B-HOT panel N = 26	AMR samples not assessed by the B-HOT panel N = 26	p-value	TCMR samples assessed by the B-HOT panel N = 6	TCMR samples not assessed by the B-HOT panel N = 45	p-value	Control samples assessed by the B-HOT panel N = 77	Control samples not assessed by the B-HOT panel N = 40	p-value
Time from kidney transplant to biopsy, months	46 [4-112]	33 [10-138]	0.9	18 [9-22]	9 [4-88]	0.1	13 [1-57]	4 [0-68]	0.4		
Donor-specific antibodies at biopsy Class I, n (%)	8	6	0.5	0	2	0.6	4	0	0.1		
MFI of immunodominant anti-class I	3065 ± 3244	5792 ± 5363	0.3		4000 ± 4808		5550 ± 5495				
Class II, n (%)	18	19	0.8	1	3	0.4	5	3	0.8		
MFI of immunodominant anti-class II	10378 ± 5812	6432 ± 5560	0.05	2600 ± 0	4023 ± 5411		4080 ± 3690	2233 ± 503	0.8		
Plasma creatinine at biopsy, µmol/L	179 ± 116	186 ± 60	0.1	226 ± 59	372 ± 276	0.6	213 ± 133	167 ± 80	0.02		
Proteinuria at biopsy, g/g of creatininuria	1.5 ± 2.1	0.5 ± 0.6	0.1	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.7	0.1	0.8 ± 1.7	0.6 ± 0.7	0.5		
Banff score											
cg	1.2 ± 1.4	1.1 ± 1.2	0.9	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.9	0.1 ± 0.4	0.2 ± 0.8	0.7		
ci	1.0 ± 0.8	1.3 ± 0.8	0.1	0.6 ± 0.5	0.8 ± 0.8	0.8	1.0 ± 1.0	1.0 ± 0.9	0.8		
ct	1.1 ± 0.7	1.1 ± 0.8	0.7	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.9	0.6	1.1 ± 0.9	0.9 ± 0.8	0.3		
cv	1.2 ± 0.9	1.4 ± 0.9	0.4	1.4 ± 0.5	1.0 ± 1.0	0.3	1.4 ± 1.0	1.1 ± 1.0	0.3		
ptc	1.6 ± 0.9	1.3 ± 0.8	0.2	0.4 ± 0.9	0.3 ± 0.6	0.9	0.0 ± 0.2	0.2 ± 0.6	0.03		
t	0.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.001	2.8 ± 0.4	2.3 ± 0.7	0.2	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.6	0.5		
i	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.001	2.2 ± 0.4	2.1 ± 0.7	0.9	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.9		
g	1.7 ± 0.9	1.8 ± 0.8	0.6	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.4	0.6	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.6	<0.001		
ah	0.8 ± 1.1	1.5 ± 1.3	0.03	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.7	0.3	1.0 ± 1.2	0.9 ± 1.2	0.7		
v	0.1 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.5	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.7	0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.9		
ti	1.0 ± 1.0	0.8 ± 0.9	0.5	2.2 ± 0.4	2.1 ± 0.7	0.9	0.4 ± 0.6	0.5 ± 0.7	0.4		
iiFTA	1.3 ± 1.3	0.9 ± 1.1	0.5	0.6 ± 0.5	1.6 ± 1.2	0.1	0.1 ± 0.5	0.3 ± 0.7	0.08		
g + ptc	3.2 ± 1.4	3.1 ± 1.2	0.9	0.4 ± 0.9	0.5 ± 0.7	0.8	0.0 ± 0.2	0.5 ± 0.9	<0.001		
i + t	1.0 ± 1.1	0.0 ± 0.2	<0.001	5.0 ± 0.7	4.2 ± 1.5	0.2	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.8	0.5		
ci + ct	2.0 ± 1.6	2.4 ± 1.6	0.3	1.6 ± 0.5	1.7 ± 1.6	0.8	2.0 ± 1.9	1.8 ± 1.6	0.8		
cv + ah	1.9 ± 1.6	2.9 ± 1.0	0.01	1.4 ± 0.5	1.3 ± 1.3	0.5	2.4 ± 1.4	2.0 ± 1.9	0.3		
C4d	1.3 ± 1.1	1.3 ± 1.0	0.8	0 ± 0	0.2 ± 0.5	0.6	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.08		

*Supplemental table 5: clinical and biological characteristics of samples assessed or not by the Nanostring B-HOT panel according to their diagnostic group. AMR: antibody mediated rejection, TCMR: T-cell mediated rejection, MFI: mean fluorescence intensity.*

**Supplemental table 6**

Gene	Antibody mediated rejection (N = 24)	T-cell mediated rejection (N = 6)	Control (N = 79)	p-value, Kruskal-Wallis t-test	p-value, AMR Versus TCMR	p-value, AMR Versus Control	p-value, TCMR Versus Control
CARD16	0.37 ± 0.15	0.45 ± 0.03	0.35 ± 0.12	<b>0.03</b>	<b>0.048</b>	0.99	<b>0.02</b>
CD72	0.37 ± 0.12	0.41 ± 0.08	0.34 ± 0.10	0.2	0.99	0.99	0.4
CD68	1.63 ± 0.28	1.85 ± 0.29	1.83 ± 0.29	<b>0.006</b>	0.2	<b>0.006</b>	0.99
CCL4	0.25 ± 0.24	0.27 ± 0.15	0.24 ± 0.13	0.3	0.7	0.5	0.99
CTLA4	0.24 ± 0.15	0.38 ± 0.18	0.21 ± 0.13	<b>0.02</b>	0.09	0.99	<b>0.02</b>
PLA1A	0.91 ± 0.18	0.55 ± 0.24	0.70 ± 0.18	< <b>0.001</b>	<b>0.003</b>	< <b>0.001</b>	0.8
ROBO4	1.19 ± 0.20	1.14 ± 0.36	1.48 ± 0.22	< <b>0.001</b>	0.99	< <b>0.001</b>	<b>0.04</b>
KLRD1	0.28 ± 0.17	0.34 ± 0.17	0.25 ± 0.12	0.1	0.1	0.5	0.5
FCGR3	1.53 ± 0.32	1.37 ± 0.29	1.02 ± 0.33	< <b>0.001</b>	0.99	< <b>0.01</b>	0.06
GNLY	0.93 ± 0.27	0.75 ± 0.28	0.56 ± 0.20	< <b>0.001</b>	0.7	< <b>0.001</b>	0.3
CXCL11	1.19 ± 0.39	0.48 ± 0.25	0.40 ± 0.29	< <b>0.001</b>	<b>0.01</b>	< <b>0.001</b>	0.99
CCL18	0.27 ± 0.15	0.63 ± 0.21	0.32 ± 0.19	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>	0.8	<b>0.008</b>
CAV1	0.86 ± 0.25	0.81 ± 0.29	1.08 ± 0.31	<b>0.001</b>	0.99	<b>0.004</b>	0.08
PECAM	2.68 ± 0.26	2.82 ± 0.21	2.98 ± 0.24	< <b>0.001</b>	0.99	< <b>0.001</b>	0.1
PRF1	0.53 ± 0.11	0.56 ± 0.16	0.36 ± 0.13	< <b>0.001</b>	0.99	< <b>0.001</b>	<b>0.02</b>
ADAMDEC1	0.11 ± 0.07	0.24 ± 0.05	0.13 ± 0.08	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>	0.9	<b>0.005</b>
IFNG	0.13 ± 0.07	0.26 ± 0.07	0.18 ± 0.13	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	0.3	0.1

*Supplemental table 6: Relative gene expression values assessed by the Nanostring B-HOT panel according to diagnosis group in the UK samples. To obtain relative expression values, absolute data were normalised as in the RT-MLPA assay: all expression values are divided by the mean of values of all genes measured in the sample, and the base 2 logarithms of these ratios plus 1 are used as normalized expression values. AMR: antibody mediated rejection. TCMR: T-cell mediated rejection.*

**Supplemental table 7**

	All samples	All samples
	r value	p value
CARD16	0.06	0.5
CD72	0.18	0.06
CD68	0.46	< 0.001
CCL4	0.22	0.03
CTLA4	0.20	0.04
PLA1A	0.43	< 0.001
ROBO4	0.27	0.005
KLRD1	0.06	0.5
FCGR3	0.39	< 0.001
GNLY	0.59	< 0.001
CXCL11	0.38	< 0.001
CCL18	0.18	0.07
CAV1	0.61	< 0.001
PECAM	0.44	< 0.001
PRF1	0.60	<0.001
ADAMDEC1	-0.14	0.2
IFNG	-0.18	0.06
Overall	0.68	< 0.001

*Supplemental table 7: correlation analyses of relative gene expression levels obtained by the RT-MLPA or the Nanostring assay.*

## Supplemental figure legends

### Supplemental figure 1

Flow-chart. Of note, several exclusion criteria may be present in a single biopsy (eg: ABOincompatible transplantation and C4d WER). AMR: antibody mediated rejection. C4d WER: C4d staining without evidence of rejection. TCMR: T-cell mediated rejection

### Supplemental figure 2

Heatmap of unsupervised hierarchical analysis of gene expression levels assessed by the RT-MLPA assay by Euclidian distance using Ward's method. AMR: antibody mediated rejection. TCMR: T-cell mediated rejection

### Supplemental figure 3

Influence of the initial random 70/30 split on train and test scores of the selected classifier. An initial random 70/30 split was performed to generate classifiers. One of these classifiers was randomly selected. To assess if performances of this classifier were due to a bias in the initial split, 500 other random splits were performed to recalculate classifier train and test scores. Resulting train and test scores showed a gaussian distribution with a mean accuracy score at  $0.88 \pm 0.02$  and  $0.77 \pm 0.05$ , respectively.

### Supplemental figure 4

15-fold cross validation of the selected model. K-fold mean F1 score was  $0.75 \pm 0.18$ , mean precision score was  $0.78 \pm 0.17$  and mean recall score was  $0.76 \pm 0.20$ .

### Supplemental figure 5

Performances of the classifier assessed by receiver operating characteristic curves and areas under curve for the diagnosis of AMR, control and TCMR. Each reported area under curve corresponds to one diagnosis versus the two others. ROC: receiver operating characteristic. TCMR: T-cell mediated rejection. AMR: antibody mediated rejection.

### Supplemental figure 6

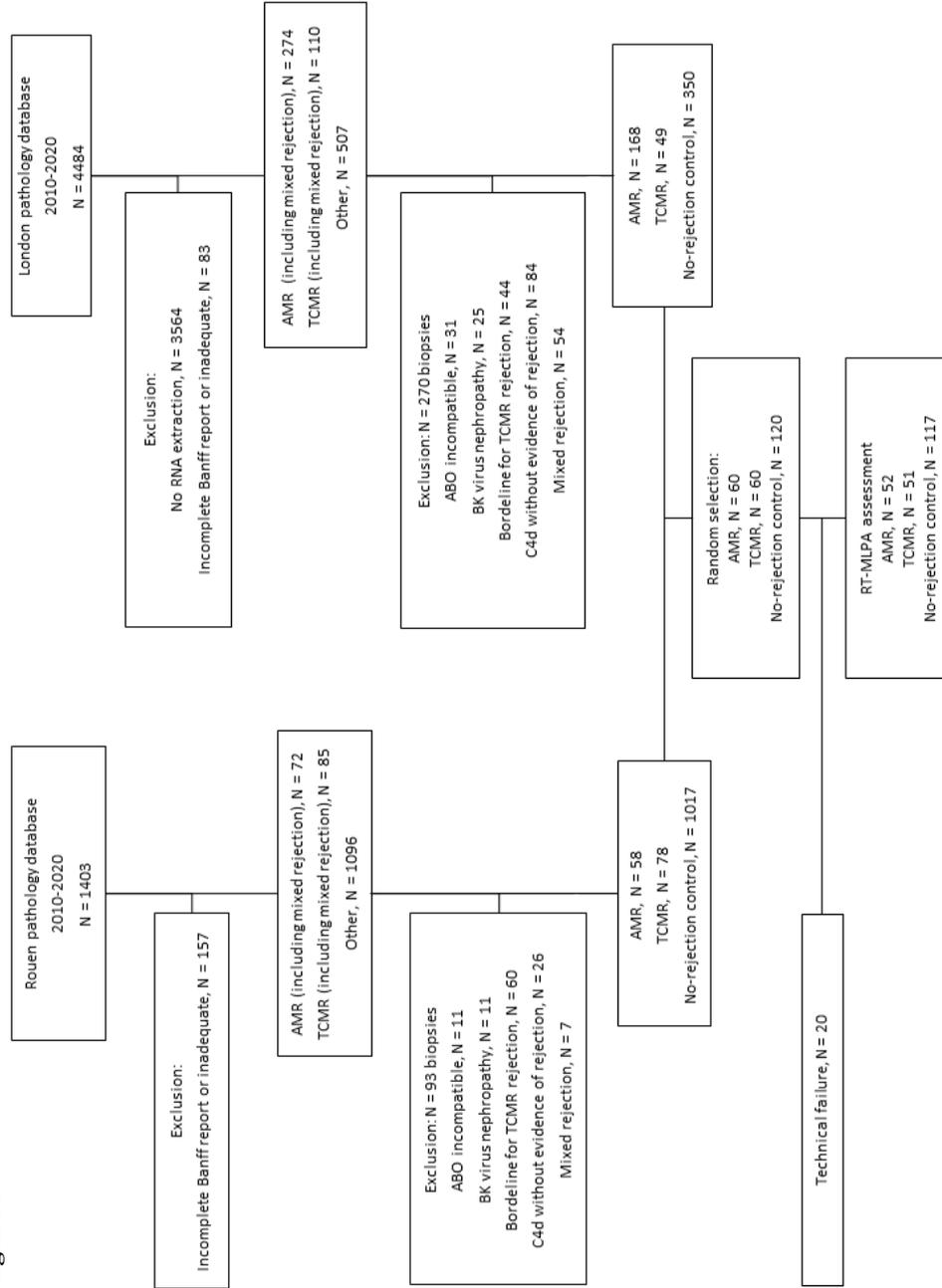
Support vector classifier feature relative importance for each diagnosis category. These values represent coordinates of orthogonal vectors defining the separating hyperplane between two diagnosis classes. AMR: antibody mediated rejection. TCMR: T-cell mediated rejection.

### Supplemental figure 7

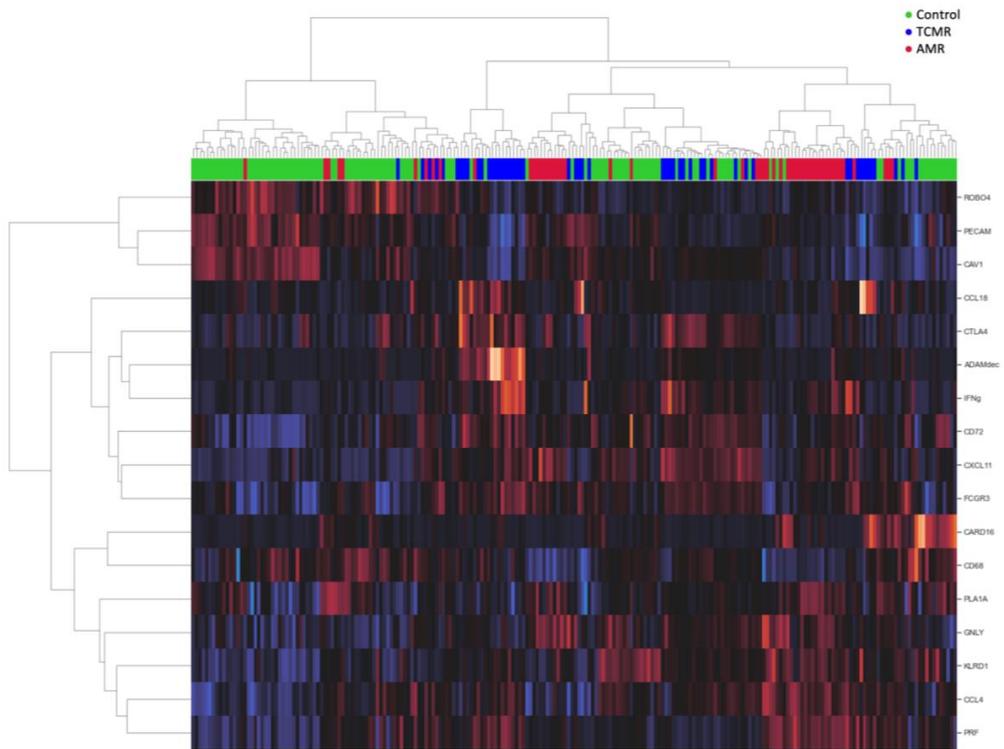
Normalised gene expression levels assessed by RT-MLPA and Nanostring in matched samples. Each row represents a gene, and each column represents a sample. Each column is double, with a dark blue box at the top of the column indicating gene expression assessed by Nanostring and a light blue box indicating the corresponding RT-MLPA assay. To represent individual correlations, samples are ordered from left to right and top to bottom according to their Spearman's rank test  $r$  value. The  $p$  values of Spearman rank test are represented along the horizontal axe: green for  $p \leq 0.05$  and red for  $p > 0.05$ . Gene expression levels assessed by RT-MLPA and Nanostring were correlated in 87% of samples.

Supplemental figures

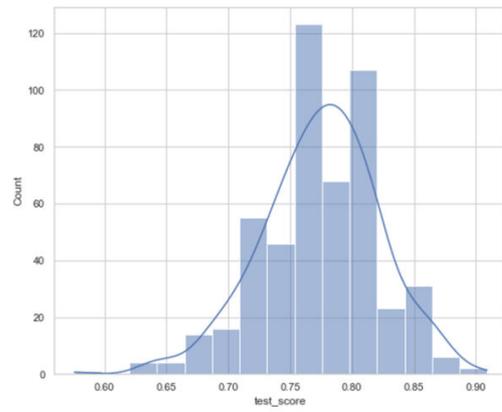
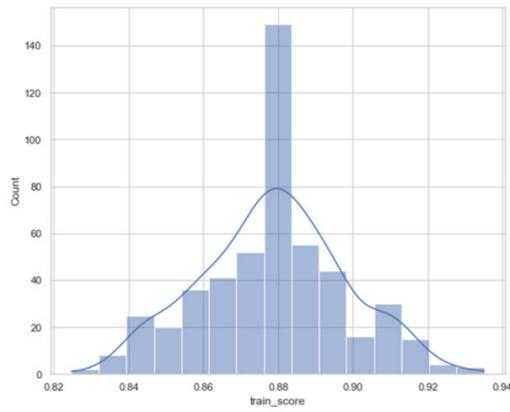
Supplemental figure 1



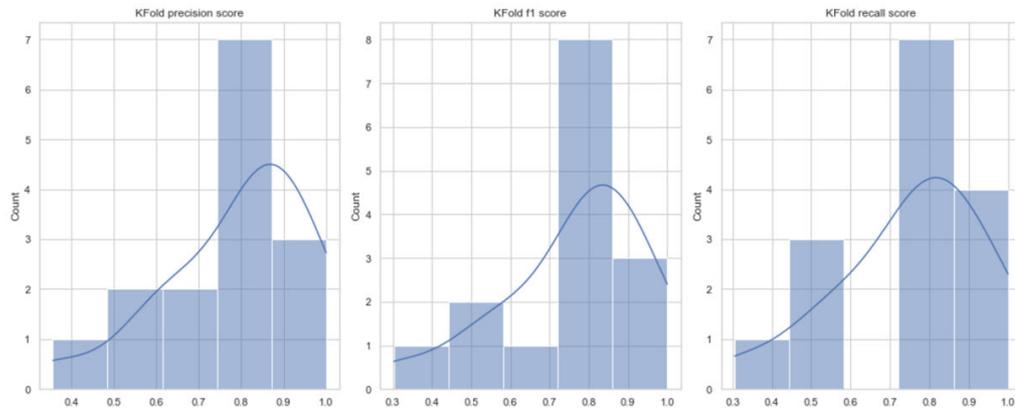
Supplemental figure 2



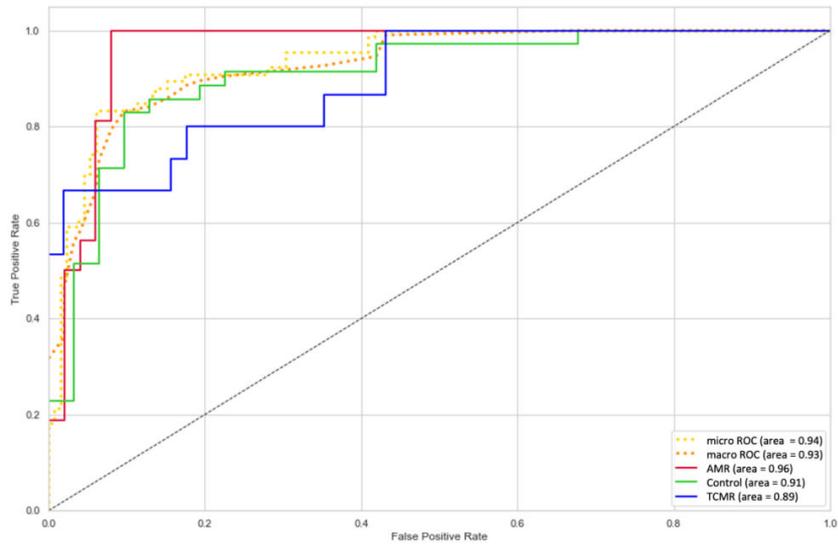
### Supplemental figure 3



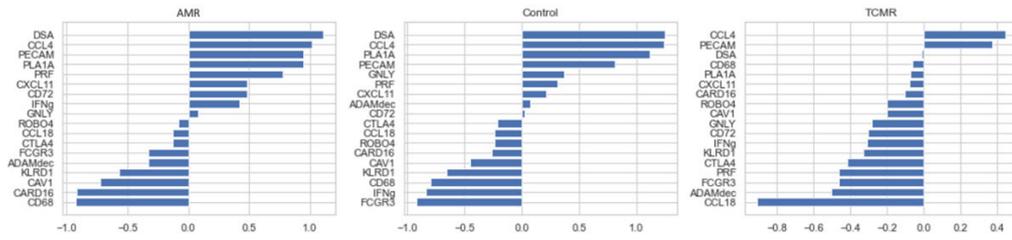
## Supplemental figure 4



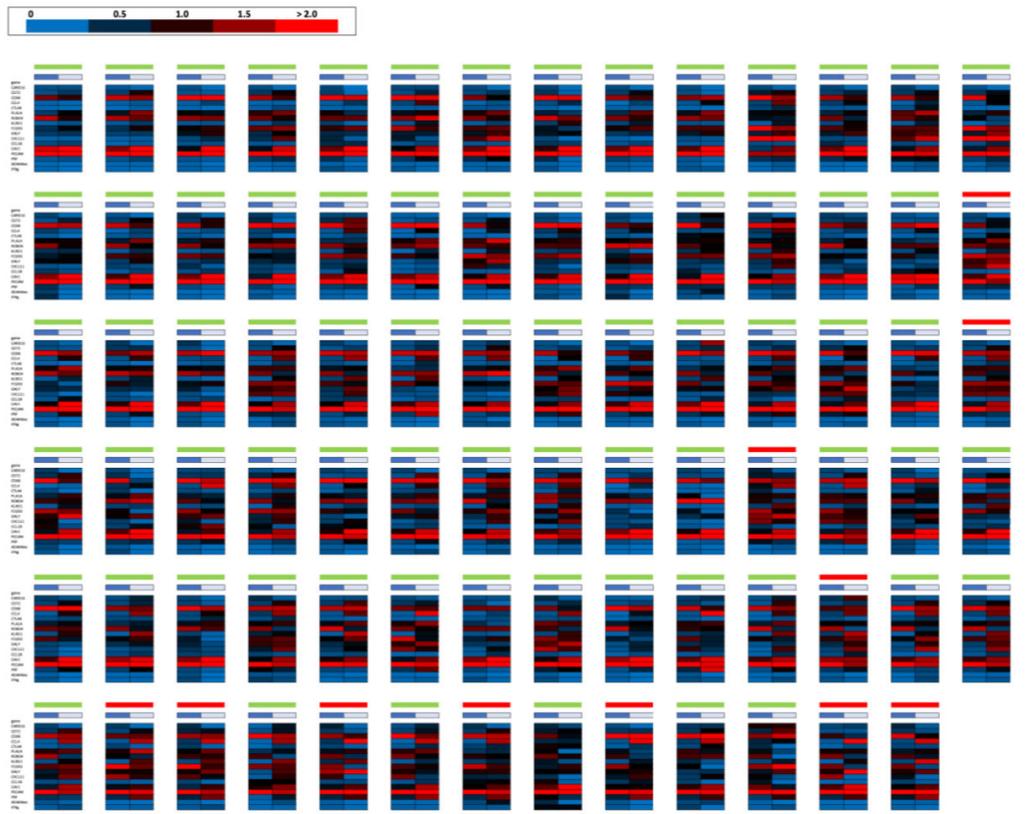
Supplemental figure 5



Supplemental figure 6



### Supplemental figure 7



### **3.3 Deuxième article : Impact of systematic biopsy-based transcriptomics of kidney transplant on the diagnosis of antibody-mediated rejection in clinical practice**

#### **3.3.1 Title page**

##### **Title**

Impact of systematic biopsy-based transcriptomics of kidney transplant on the diagnosis of antibody-mediated rejection in clinical practice

##### **Running head**

Biopsy-based transcriptomics of kidney transplant biopsies for antibody mediated rejection

##### **Authorship**

Tristan de Nattes<sup>1</sup>, Jeanne Dandonneau<sup>2</sup>, Arnaud François<sup>3</sup>, Dominique Bertrand<sup>4</sup>, Sophie Candon<sup>5</sup>.

1: Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, CHU Rouen, Service de Néphrologie, F-76000 Rouen, France

2: Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, F-76000 Rouen, France

3: CHU Rouen, Service d'anatomopathologie, F-76000 Rouen, France

4: CHU Rouen, Service de néphrologie, F-76000 Rouen, France

5: Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, CHU Rouen, Service d'immunologie et de biothérapies, F-76000 Rouen, France

##### **Corresponding author**

Tristan de Nattes, M.D,

ORCID: 0000-0002-3714-8768

Nephrology – Kidney Transplant Unit, Rouen University Hospital, 1 rue de Germont, 76031, Rouen, France.

[tristan.de-nattes@chu-rouen.fr](mailto:tristan.de-nattes@chu-rouen.fr)

##### **Keywords**

Kidney transplant, antibody-mediated rejection, molecular diagnosis.

##### **Word count**

Words: 3019

Tables: 4

Figures: 4

### 3.3.2 Abstract

#### **Introduction**

To diagnose kidney transplant antibody-mediated rejection (AMR), biopsy-based transcriptomics can substitute for some histological criteria according to the Banff recommendations. However, clinical accessibility of these assays is still limited. Here, we aimed to evaluate the impact of integrating a routine-compatible molecular assay for the diagnosis of AMR in clinical practice.

#### **Methods**

All biopsies performed in our centre between 2013 and 2017 were retrospectively included. These biopsies were classified into three groups. “AMR biopsies” displayed the full Banff criteria of AMR independently of biopsy-based transcriptomics. “Undetermined for AMR” biopsies did not meet AMR histological criteria, but would have been considered as AMR if biopsy-based transcriptomics had been positive. Control biopsies showed no features of rejection.

#### **Results**

Within the inclusion period, 342 biopsies had a complete Banff scoring. Thirty-six of them already met AMR criteria, and 43/306 (14.1%) were considered as “undetermined for AMR”. Among these biopsies, 24/43 (55.8%) had a molecular signature of AMR, reclassifying them into the “AMR” category. Five-year death-censored survival of these biopsies was unfavourable and statistically equivalent to that of the AMR category,  $p = 0.09$ , with 15/24 (62.5%) graft loss. These biopsies also exhibited a trend towards shorter rejection-free survival.

#### **Conclusion**

A significant proportion of biopsies could benefit from a biopsy-based transcriptomics for AMR diagnosis according to the Banff recommendations. Using a routine-compatible molecular tool, more than the half of these biopsies were reclassified as AMR and associated with unfavourable allograft survival. These results highlight the pressing need for a prospective evaluation of the role of biopsy-based transcriptomics patient management, to determine its impact on KT survival.

### **3.3.3 Abbreviations**

AMR: antibody-mediated rejection

DSA: donor-specific antibody

FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded

KT: kidney transplant

MB: molecular biology

MVI: microvascular inflammation

RT-MLPA : reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification

SD: standard deviation

TCMR: T-cell mediated rejection

## Manuscript

### 3.3.4 Introduction

Despite advances in the pathophysiological knowledge in kidney transplantation (KT) immunology, KT rejection remains the major cause of allograft loss<sup>8</sup>. The current gold standard for rejection diagnosis is the histological assessment of KT biopsy with donor-specific antibody (DSA) testing. Interpretation of these information is then guided by the Banff recommendations, allowing for a histological-based diagnosis<sup>152</sup>. Nevertheless, pathological evaluation suffers from known limitations, such as sampling bias, interobserver variability and limited sensitivity and/or specificity for several lesions<sup>128,153</sup>.

Molecular phenotyping of KT biopsies has been the subject of numerous studies, providing the transplant community with new pathophysiological knowledge about transplant immunology and a better characterisation of rejection<sup>141,142,154</sup>. Progressively, molecular phenotyping has been applied to clinical care, leading to its introduction in the 2013 Banff classification<sup>108</sup>. Its indication and modalities have been progressively extended up to the current 2019 Banff guidelines<sup>152</sup>. In these guidelines, the expression of previously validated gene transcripts or classifier associated with antibody-mediated rejection (AMR) can substitute for microvascular inflammation (MVI), C4d and DSA criteria.

Despite its integration in the Banff guidelines, routine use of biopsy-based transcriptomics as currently proposed, is still restricted<sup>144</sup>. The limited availability of molecular tools is a major reason for their sparse use, primarily due to factors like equipment accessibility, financial considerations, and the challenge of interpreting data from hundreds of transcripts without clear guidelines, particularly when using tools like MMDx or the B-HOT panel from Nanostring. Recently, several teams have been working to facilitate the molecular diagnostic use in clinical practice, through centralised assessment of biopsy with generation of a report<sup>137</sup>, development of a restricted panel of genes assessed by easy-to-use assays such as RT-PCR<sup>155</sup>, or through identification of the most discriminant genes from a large panel<sup>156</sup>.

In addition to the limited accessibility of molecular tools, their place and impact in clinical practice is yet unclear. Indeed, most of molecular biology studies in KT are dedicated to the diagnostic modalities of rejection, aiming at identifying exhaustive gene signatures associated with a specific condition. However, several questions remain unanswered: which clinical situations may benefit from molecular assessment? What is the proportion of biopsies in these situations? Do biopsies diagnosed as AMR through molecular assessment have the same

evolution course as those histologically-diagnosed AMR? What is the clinical impact of biopsy-based transcriptomics in terms of patient management?

According to Banff recommendations, biopsy-based transcriptomics can substitute for certain AMR criteria, such as MVI, C4d staining, or DSA. Given the limited use of molecular assessment in routine clinical practice, it remains unclear how many biopsies that do not meet histological criteria for AMR could be classified as AMR after molecular evaluation. We have previously developed a simple molecular assay for the diagnosis of rejection<sup>57,157</sup> using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks left over from the routine diagnostic procedure. Based on a cost-effective multiplex PCR targeting only 17 genes, this assay enables the molecular assessment of all KT biopsies performed at a centre, prospectively or retrospectively.

The aim of this study was to evaluate the which impact of integrating this molecular assay in the diagnosis procedure of AMR in clinical practice, as proposed by the Banff classification. For this purpose, we have applied our assay to all biopsies with features of AMR, but not meeting all Banff AMR criteria, sampled on a 4-year period. Our results provide an overview of the clinical consequences of integrating biopsy-based transcriptomics assessment, including the number of diagnosis reclassifications as well as and their clinical relevance in terms of graft outcome.

### **3.3.5 Material and methods**

#### **3.3.5.1 Biopsies selection**

All KT biopsies performed in Rouen University Hospital from 1<sup>st</sup> January 2014 to 31<sup>st</sup> December 2017 were retrospectively included. When several biopsies were available for a single patient, only the first one was included. Patients were followed until 1<sup>st</sup> January 2023. KT biopsies were performed using an 18-Gauge spring-loaded needle. The fragment dedicated to optical microscopy assessment was included in FFPE block. After sampling of FFPE blocks for routine staining, they were stored in the dark at room temperature.

#### **3.3.5.2 Biopsies interpretation and groups definition**

All biopsies were assessed according to Banff guidelines. Diagnostic interpretation was performed according to Banff 2019 guidelines<sup>152</sup> and confirmed with the Banff Automation System<sup>132</sup> to ensure the absence of misclassification. Three groups were defined:

The “AMR” group consisted of biopsies with the full criteria of active or chronic-active AMR, independently of biopsy-based transcriptomics. The following criteria were required: 1/ histologic evidence of acute tissue injury, 2/ evidence of current or recent antibody interaction with vascular endothelium and 3/ serologic evidence of DSA or C4d staining. For the chronic-active AMR category, only the transplant glomerulopathy criterion assessed by optical microscopy was considered, as electronic microscopy was not available for all samples.

The “undetermined for AMR” group consisted of biopsies that did not meet the three criteria of AMR as mentioned above, but would have been considered as AMR if biopsy-based transcriptomics had been positive for AMR. This covered three situations: 1- acute tissue injury with MVI, C4d staining negative and DSA negative; 2- acute tissue injury without MVI, C4d staining negative, DSA negative; and 3- acute tissue injury without MVI, C4d staining negative, DSA positive.

The “control” group consisted of biopsies which did not meet criteria of the two previous groups, after the exclusion of biopsies with T-cell mediated rejection (TCMR).

### **3.3.5.3 Molecular assessment of KT biopsies**

A previously developed molecular assay for the diagnosis of KT rejection was employed<sup>57,157</sup>. This assay uses the remaining FFPE block after its routine use for diagnostic staining. Briefly, RNA was extracted from 3 to 5 consecutive 20µm-sections of the FFPE block using Qiagen RNeasy FFPE kit. The molecular assay is based on a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) assay enabling simultaneous evaluation of a previously developed 17-gene expression panel. The gene panel includes inflammation associated transcripts (CARD16, CXCL11), B-cell transcript (CD72), T-cell transcripts (CTLA4, IFNG, PRF1), NK-cell transcripts (CCL4, FCGR3, GNLY, KLRD1), endothelial-associated transcripts (CAV1, PECAM, PLA1A, ROBO4) and monocytes/macrophages-associated transcripts (ADAMDEC1, CCL18, CD68). Relative gene expression levels can be interpreted using an open-access classifier (<https://kidney-transplant-classifier.herokuapp.com/>). For each obtained molecular profile, the classifier provides a result: “molecular signal of AMR”, “molecular signal of TCMR” or “molecular signal of non-rejection”. Sensitivity and specificity of this classifier to diagnose AMR were both 0.94. For non-rejection biopsies, sensitivity was 0.89 and specificity was 0.81.

Biopsies from the “undetermined for AMR” group with biopsy-based transcriptomics positive for AMR were considered as “undetermined for AMR, molecular biology (MB)-positive”. Otherwise, they were considered as “undetermined for AMR, MB-negative”.

#### **3.3.5.4 Clinical and biological data collection**

Clinical and biological data were retrospectively collected from medical records. DSA were monitored systematically once a year and at the time of the biopsy with Labscreen mixed beads as screening test, and Labscreen single antigen beads for identification (One Lambda, CA). The threshold for positivity was a mean fluorescence intensity above 500. The follow-up period was 5 years for each patient.

#### **3.3.5.5 Ethical consideration**

This study was conducted in accordance with the Declaration of Istanbul on Organ Trafficking and Transplant Tourism. Biopsies collected during the routine care of patients were used for secondary research after obtention of their non-opposition, according to the French Jardé's law. The study was part of the project approved by local institutional review board (notice No. 474).

#### **3.3.5.6 Statistical analysis**

Qualitative data are presented as number of patients and percentages. Quantitative data are presented as median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles] or mean  $\pm$  standard deviation (SD) according to their distribution. Fisher's or chi-squared tests were used for categorical variables, depending on sample sizes. Student's test, Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis' test were used for continuous variables. KT survival at five years was analysed with Kaplan-Meier survival curve. A two-sided p-value  $< 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism version 6.04, GraphPad Software, La Jolla California USA.

### **3.3.6 Results**

#### **3.3.6.1 Study population and indications for biopsy-based transcriptomics**

Six hundred and seventeen KT biopsies were performed between 1<sup>st</sup> January 2014 and 31<sup>st</sup> December 2017. Seventy-nine were excluded due to missing DSA and/or C4d data. For 120 patients, several biopsies were available. Only the first biopsy with signs of rejection or the first biopsy in chronological order, if none of them had rejection signs, was included. Therefore, 178 biopsies were excluded. Eighteen other biopsies were diagnosed as TCMR without AMR features.

Among the 342 remaining biopsies, 36 already met the criteria for AMR according to usual histological and biological criteria, with 20 FFPE blocks available for molecular assessment (**Figure 1**). The other blocks had no remaining tissue (N = 6), were lost (N = 4), or already used for other studies (N = 6).

Out of the 306 remaining biopsies, 43/306 (14.1%) were “undetermined for AMR”, requiring molecular assessment according to Banff 2019 guidelines. Precisely, 25/43 (58.1%) presented the first Banff criteria with MVI but without C4d staining and without DSA. Four (9.3%) had the first Banff criteria without MVI, C4d staining or DSA. Fourteen (32.6%) biopsies fulfilled the first Banff criteria with positive DSA, without MVI or C4d staining. Among these DSA-positive biopsies, 10/14 (71.4%) were performed for *de novo* DSA with (N = 5) or without (N = 5) clinical allograft dysfunction. FFPE blocks were available for all of them.

Two-hundred sixty-three biopsies were considered as control. Control biopsies FFPE blocks were randomly selected to match the 20 AMR FFPE blocks. RNA extraction failed in 3 of them. Clinical and biological data of patients included are summarised in **Table 1**.

### **3.3.6.2 Biopsy-based transcriptomics allows biopsies of undetermined diagnosis to be reclassified as AMR**

RNA was successfully extracted from all FFPE blocks of AMR and “undetermined for AMR” biopsies. A technical failure of extraction occurred in three control biopsies. Mean RNA concentration obtained from extraction was  $99.6 \pm 44.3$  ng/ $\mu$ L, with a  $260/280 = 2.5 \pm 1.1$ . Molecular assessment was successful in all these cases.

At the time of the initial pathological assessment, the 43 biopsies “undetermined for AMR” did not meet all the usual histological and biological criteria for AMR and were therefore considered as non-AMR. After molecular assessment, 24/43 (55.8%) showed a molecular signature of AMR, and were thus retrospectively classified into the AMR category. Clinical and biological data at the time of the biopsy were comparable between groups with (MB+) and without (MB-) a molecular signature of AMR, with similar graft function and Banff scores (**Table 2**). Among biopsies MVI+, C4d-, DSA-, 15/25 (60.0%) had a molecular signal of AMR. In the MVI-, C4d-, DSA- subgroup, 3/4 (75.0%) of biopsies were MB+. In the MVI-, C4d-, DSA+ subgroup, 6/14 (42.9%) biopsies were MB+ (**Table 3**). Of the 10 biopsies performed for *de novo* DSA not fulfilling histological criteria for AMR, 6/10 (60%) of them were MB+. Focusing on biopsies performed for *de novo* DSA without graft dysfunction, 3/5 (60%) were MB+.

Among control biopsies, 5/17 (29.4%) were MB+. Due to the absence of other AMR criteria, this was not sufficient to classify them into the AMR category. Among the biopsies categorised as AMR before molecular assessment, 15/20 (75.0%) were MB+.

### **3.3.6.3 Death-censored kidney transplant survival grafts reclassified as AMR based on biopsy-based transcriptomics is similar to that of grafts with AMR diagnosed through histological scoring only**

To estimate if the reclassification of undetermined biopsies into the AMR category after molecular assessment was clinically relevant, 5-year death-censored KT survival was analysed. Median KT death-censored survival of histologically-diagnosed AMR was 1819 days, with 10/20 (50.0%) graft loss during the follow-up. Death-censored KT survival of the “undetermined for AMR” group was not statistically different,  $p = 0.9$ , with 20/43 (46.5%) graft loss (**Figure 2**). Only 1/17 (5.9%) KT loss occurred in the control group.

After molecular assessment, death-censored KT survival between the 4 groups was statistically different,  $p = 0.0005$  (**Figure 3**). The group of biopsies reclassified into AMR after molecular assessment had a median death-censored KT survival at 1407 days, with 15/24 (62.5%) graft loss, which was comparable to histologically-diagnosed AMR,  $p = 0.2$ . In the “undetermined for AMR, MB-” group, 5/19 (26.3%) graft loss occurred. KT survival of this group was not statistically different from that in the control group,  $p = 0.09$ . Among the “undetermined for AMR group”, univariate and multivariate Cox analyses were performed to determine risk factors for graft loss (**Table 4**). In multivariate analysis, a negative molecular signal for AMR was associated with a decreased risk of death-censored KT loss.

### **3.3.6.4 “Undetermined for AMR” grafts with biopsy-based transcriptomics positive for AMR tend to have shorter rejection-free survival.**

Twenty-six patients underwent another KT biopsy following the first one assessed by molecular biology: 6 in the control group, 9 in the “undetermined for AMR, MB-” and 11 in the “undetermined for AMR, MB+”. No histologically-diagnosed AMR occurred within 2 years following the index biopsy in the control group, 1/9 (11.1%) in the “undetermined for AMR, MB-“, and 4/11 (36.4%) in the “undetermined for AMR, MB+” group. However, these

differences in rejection-free survival at 2 years did not reach statistical significance  $p = 0.07$  (Figure 4).

### 3.3.7 Discussion

The aim of this study was to evaluate the clinical impact of integrating biopsy-based transcriptomics for the diagnosis of AMR in routine practice. Over a 4-year period, and considering only AMR diagnosis, 14.1% of KT biopsies performed in the centre should have been assessed by molecular biology according to the Banff guidelines. Indeed, for these biopsies, histological and biological assessments could not exclude or confirm AMR. Among these, 55.8% had a molecular signature of AMR, reclassifying them *a posteriori* into the AMR category. These reclassified biopsies had an unfavourable death-censored KT survival, comparable to that of biopsies with AMR (regardless of subsequent therapeutic management), along with a trend towards shorter rejection-free KT survival.

The molecular characterisation of AMR has benefited from a sustained international dynamic. Recently, major studies have provided us with a better comprehension of AMR with or without C4d deposition or identified DSA, as well as MVI characterisation<sup>141,154,158</sup>. In addition to these studies primarily focused on deep-phenotyping of biopsies at a molecular level, some classifiers have also been proposed based on Affymetrix MMDx system and Nanostring B-HOT panel<sup>159,160</sup>. However, the clinical application of such tools is scarcely explored yet. With a view to moving towards a general use of molecular diagnosis, Roufosse's group recently reported two studies<sup>155,156</sup>. In Toulza et al.'s study, a restricted panel of gene identified from the literature was assessed by PCR. The study population was an 8-year retrospective series of biopsy samples stored in RNA stabilization solution. Within this non-consecutive cohort, molecular assessment for AMR diagnosis was indicated in 16% of biopsies, supporting AMR diagnosis in 33% of them. In the Beadle et al.'s study, all biopsies sampled over one year were assessed using the Nanostring B-HOT panel. The best predictive genes for AMR were identified and integrated into a score with an accuracy value of 0.92. In this one-year cohort, 14% of biopsies were undetermined for AMR, of which 12% were associated with AMR according to the built molecular classifier.

In our study, the proportion of biopsies with an indication for molecular evaluation was in the similar range (14.1%), despite differences in baseline characteristics, the use of protocol biopsies and patient's management. Overall, it appears from the data from these two centres, that biopsy-based transcriptomics to meet the Banff guidelines for AMR diagnosis may be

justified in at least 10% of KT biopsies. Importantly, these results are consistent using three different technologies: PCR, Nanostring or RT-MLPA.

The proportion of biopsies reclassified into the AMR category after molecular assessment was higher in our study. In addition to the cohort differences inherent in the monocentric nature of these studies, this could be explained by differences in the performances of the developed diagnostic models. Nevertheless, it should be emphasised that in all these studies, KT survival of biopsies undetermined for AMR with positive molecular assessment was significantly impaired, underlining the clinical value of molecular diagnosis. Another consistent finding within these three studies is the intermediate survival of biopsies undetermined for AMR with a negative molecular assessment. For now, this phenotype is not yet clearly defined and may benefit from further molecular insights with larger gene panels.

Several limits of our study have to be noted. First, as only a few KT centres have access to biopsy-based transcriptomics for the diagnosis of rejection, the study was conducted at a single centre. Although all consecutive KT biopsies performed on a 4-year period were included, reflecting real-life practice of a centre, the exact proportion of biopsies undetermined for AMR that may benefit from molecular assessment may vary on a wider multicentre scale. In the same vein, some clinical and biological characteristics at the time of the biopsy may be specific to our centre, which may impact survival analyses performed here.

Secondly, we aimed to simulate the impact of molecular assessment of KT biopsies in terms of diagnosis classification. However, this study does not provide information on the reasons for biopsy reclassification. For example, molecularly-diagnosed AMR could represent an early stage of AMR, or other physiopathological pathways such as NK-mediated AMR. Therefore, their potential response-to-treatment, comparatively to histologically-diagnosed AMR remains undetermined. Moreover, due to the retrospective nature of this study, no clinical decision was made based on molecular results. For these reasons, although biopsy-based transcriptomics may change diagnosis, further studies are required to examine the link between molecular diagnosis, patient management, and allograft survival.

Finally, the molecular assay used in this study presents characteristics suitable with clinical use, such as simplicity of handling and interpretation and its price. However, its performances are likely to be less robust than those of assays based on hundreds of transcripts<sup>161</sup>.

In conclusion, we applied a molecular assay dedicated to the diagnosis of AMR on a retrospective cohort. By doing so, we identified a significant proportion of biopsies with an

indication for biopsy-based transcriptomics according to Banff recommendations and among them, a significant proportion (50%) of reclassified biopsies into the AMR category. At the time of the initial pathological assessment, no therapeutic decision was taken for these reclassified biopsies that retrospectively showed poor KT survival. This highlights the pressing need to adapt molecular assays to clinical practice and to conduct clinical trials to assess the impact and potential benefit of biopsy-based transcriptomics on patient management and KT survival.

### 3.3.8 References

1. Mayrdorfer M, Liefeldt L, Wu K, Rudolph B, Zhang Q, Friedersdorff F, et al.: Exploring the Complexity of Death-Censored Kidney Allograft Failure. *J Am Soc Nephrol* 32: 1513–1526, 2021
2. Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, et al.: The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant.* 2020
3. Furness PN, Taub N: International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: Report of the CERTPAP Project1. *Kidney International* 60: 1998–2012, 2001
4. Mengel M, Sis B, Halloran PF: SWOT analysis of Banff: strengths, weaknesses, opportunities and threats of the international Banff consensus process and classification system for renal allograft pathology. *Am J Transplant* 7: 2221–2226, 2007
5. Halloran PF, Famulski KS, Reeve J: Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. *Nat Rev Nephrol* 12: 534–548, 2016
6. Callemeyn J, Lerut E, de Loor H, Arijs I, Thauinat O, Koenig A, et al.: Transcriptional Changes in Kidney Allografts with Histology of Antibody-Mediated Rejection without Anti-HLA Donor-Specific Antibodies. *J Am Soc Nephrol* 31: 2168–2183, 2020
7. Halloran PF, Madill-Thomsen KS, Pon S, Sikosana MLN, Böhmig GA, Bromberg J, et al.: Molecular diagnosis of ABMR with or without donor-specific antibody in kidney transplant biopsies: Differences in timing and intensity but similar mechanisms and outcomes. *Am J Transplant* 22: 1976–1991, 2022
8. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al.: Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 14: 272–283, 2014
9. Schinstock CA, Askar M, Bagnasco SM, Batal I, Bow L, Budde K, et al.: A 2020 Banff Antibody-mediated Injury Working Group examination of international practices for diagnosing antibody-mediated rejection in kidney transplantation - a cohort study. *Transpl Int* 34: 488–498, 2021
10. Halloran PF, Madill-Thomsen KS, Reeve J: The Molecular Phenotype of Kidney Transplants: Insights From the MMDx Project. *Transplantation* 2023
11. Toulza F, Dominy K, Willicombe M, Beadle J, Santos E, Cook HT, et al.: Diagnostic application of transcripts associated with antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies. *Nephrol Dial Transplant* gfab231, 2021
12. Beadle J, Papadaki A, Toulza F, Santos E, Willicombe M, McLean A, et al.: Application of the Banff Human Organ Transplant Panel to kidney transplant biopsies with features suspicious for antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 104: 526–541, 2023
13. de Nattes T, Beadle J, Toulza F, Candon E, Ruminy P, François A, et al.: A Simple Molecular Tool for the Assessment of Kidney Transplant Biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol* 18: 499–509, 2023

14. de Nattes T, Kaveri R, Farce F, François A, Guerrot D, Hanoy M, et al.: Daratumumab for antibody-mediated rejection: Is it time to target the real culprit? *Am J Transplant* S1600-6135(23)00549-X, 2023
15. Yoo D, Goutaudier V, Divard G, Gueguen J, Astor BC, Aubert O, et al.: An automated histological classification system for precision diagnostics of kidney allografts. *Nat Med* 29: 1211–1220, 2023
16. Rosales IA, Mahowald GK, Tomaszewski K, Hotta K, Iwahara N, Otsuka T, et al.: Banff Human Organ Transplant Transcripts Correlate with Renal Allograft Pathology and Outcome: Importance of Capillaritis and Subpathologic Rejection. *J Am Soc Nephrol* 33: 2306–2319, 2022
17. Reeve J, Böhmig GA, Eskandary F, Einecke G, Gupta G, Madill-Thomsen K, et al.: Generating automated kidney transplant biopsy reports combining molecular measurements with ensembles of machine learning classifiers. *Am J Transplant* 19: 2719–2731, 2019
18. van Baardwijk M, Cristoferi I, Ju J, Varol H, Minnee RC, Reinders MEJ, et al.: A Decentralized Kidney Transplant Biopsy Classifier for Transplant Rejection Developed Using Genes of the Banff-Human Organ Transplant Panel. *Front Immunol* 13: 841519, 2022
19. Schachtner T, von Moos S, Kokkonen SM, Helmchen B, Gaspert A, Mackova M, et al.: The Molecular Diagnosis Might Be Clinically Useful in Discrepant Kidney Allograft Biopsy Findings: An Analysis of Clinical Outcomes. *Transplantation* 107: 485–494, 2023

### 3.3.9 Tables

**Table 1**

	Undetermined for antibody mediated rejection, N = 43	Control, N = 17	Antibody mediated rejection, N = 20	p value
Age at biopsy, years	52 [38-64]	57 [47-70]	38 [31-57]	0.04
Female, n (%)	19 (44.2)	5 (29.4)	6 (30.0)	0.4
Cause of end-stage kidney disease, n (%)				0.2
Diabetes	4 (9.3)	0	3 (15.0)	
IgAN	4 (9.3)	1 (5.9)	3 (15.0)	
Other glomerulonephritis	12 (27.9)	4 (23.5)	1 (5.0)	
Nephrosclerosis	2 (4.7)	0	2 (10.0)	
Cystic kidney disease	5 (11.6)	4 (23.5)	0	
Tubulointerstitial or uropathy	8 (18.6)	4 (23.5)	8 (40.0)	
Other	2 (4.7)	1 (5.9)	0	
Unknown	5 (11.6)	3 (17.6)	3 (15.0)	
Living donor, n (%)	3 (7.0)	2 (11.8)	4 (20.0)	0.3
Prior solid organ transplantation, n (%)	4 (9.3)	0	1 (5.0)	0.7
Mismatch HLA A, n (%)				0.7
0 mismatch	7 (16.3)	5 (29.4)	3 (15.0)	
1 mismatch	18 (41.9)	5 (29.4)	6 (30.0)	
2 mismatches	15 (34.9)	7 (41.2)	10 (50.0)	
Unknown	3 (7.0)	0	1 (5.0)	
Mismatch HLA B, n (%)				0.8
0 mismatch	4 (9.3)	3 (17.6)	2 (10.0)	
1 mismatch	9 (20.9)	5 (29.4)	6 (30.0)	
2 mismatches	27 (62.8)	9 (52.9)	11 (55.0)	
Unknown	3 (7.0)	0	1 (5.0)	
Mismatch HLA DR, n (%)				0.5
0 mismatch	13 (30.2)	4 (23.5)	2 (10.0)	
1 mismatch	20 (46.5)	8 (47.1)	11 (55.0)	
2 mismatches	7 (16.3)	5 (29.4)	6 (30.0)	
Unknown	3 (7.0)	0	1 (5.0)	
DSA at transplant, n (%)				
Class I	32 (74.4)	13 (76.5)	17 (85.0)	0.3
Class II	29 (67.4)	15 (88.2)	16 (80.0)	0.1
Induction therapy, n (%)				
Antithymocyte globulins	20 (46.5)	3 (17.6)	6 (30.0)	0.1
Anti IL-2 receptor	23 (53.5)	14 (82.4)	14 (70.0)	
Biopsy indication, n (%)				0.6
For cause	41 (95.3)	16 (94.1)	20 (100.0)	
Protocol	2 (4.7)	1 (5.9)	0	

Maintenance immunosuppressive therapy, n (%)				
Antiproliferative alone	1 (2.3)	0	0	0.5
Belatacept and antiproliferative	0	0	1 (5.0)	
CNI alone	4 (9.3)	1 (5.9)	3 (15.0)	
CNI and antiproliferative	35 (81.4)	12 (70.6)	15 (75.0)	
CNI and mTORi	2 (4.7)	3 (17.6)	1 (5.0)	
mTORi and antiproliferative	1 (2.3)	1 (5.9)	0	
Corticosteroids	26 (60.5)	11 (64.7)	13 (65.0)	0.9
Donor-specific antibodies at biopsy, n (%)				
Yes	14 (32.6)	2 (11.8)	18 (90.0)	< 0.0001
Class I	2 (4.7)	2 (11.8)	1 (5.0)	
Class II	12 (27.9)		17 (85.0)	
MFI immunodominant class I	850 [800-900]		12000	
MFI immunodominant class II,	2536 [1044-3506]	2800 [1000-4600]	10100 [4000-13000]	0.08
De novo DSA, n (%)	10 (71.4)	0	12 (66.7)	0.1
Time from kidney transplantation to biopsy, days	864 [190-2752]	90 [19 – 724]	1096 [370-724]	0.03
Plasma creatinine at biopsy, µmol/L	166 [125-305]	160 [109-211]	179 [121-206]	0.8
Proteinuria at biopsy, g/g of creatininuria	1.0 [0.3-2.6]	0.2 [0.1-1.0]	1.0 [0.3-2.2]	0.08
Banff score				
cg	0.6 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.9 ± 1.1	0.008
ci	1.4 ± 0.9	0.8 ± 0.8	1.5 ± 0.9	0.002
ct	1.1 ± 1.1	0.5 ± 0.7	1.2 ± 0.8	0.046
cv	1.4 ± 0.9	0.6 ± 0.5	0.9 ± 0.9	0.009
mm	0.8 ± 0.8	0.3 ± 0.5	1.0 ± 0.7	0.01
ptc	0.9 ± 0.8	0.2 ± 0.7	1.5 ± 0.9	< 0.0001
t	0.3 ± 0.7	0.2 ± 0.7	0.6 ± 0.8	0.1
i	0.5 ± 0.8	0.1 ± 0.5	0.9 ± 0.7	0.0005
g	1.1 ± 0.9	0.2 ± 0.4	1.5 ± 0.7	< 0.0001
ah	0.8 ± 1.1	0.2 ± 0.4	1.0 ± 1.2	0.1
v	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.3
ti	0.9 ± 0.8	0.5 ± 0.6	1.3 ± 0.6	0.004
g + ptc	1.9 ± 1.2	0.4 ± 1.0	3.0 ± 0.9	< 0.0001
i + t	0.8 ± 1.3	0.3 ± 1.2	1.5 ± 1.4	0.0006
C4d positive, n (%)	0	0	2 (10.0)	0.046

Table 1: baseline characteristics of patients included. Results are expressed as mean ± standard deviation or median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>] according to their distribution. IgAN: IgA nephropathy. HLA: human leukocyte antigen. IL-2: interleukin-2. CNI: calcineurin inhibitors. mTORi: mTOR mammalian target of rapamycin inhibitors. MFI: mean fluorescence intensity. DSA: donor-specific antibody.

**Table 2**

	Molecular biology negative, N = 19	Molecular biology positive, N = 24	p value
Age at biopsy, years	46.8 [32.1-63.4]	53.4 [42.2-65.2]	0.4
Female, n (%)	8 (42.1)	11 (45.8)	0.9
Maintenance immunosuppressive therapy, n (%)			
Antiproliferative alone	1 (5.3)	0	< 0.0001
Belatacept and antiproliferative	0	0	
CNI alone	1 (5.3)	3 (12.5)	
CNI and antiproliferative	2 (10.5)	21 (87.5)	
CNI and mTORi	15 (78.9)	0	
mTORi and antiproliferative	0	0	
Corticosteroids	8 (42.1)	18 (75.1)	
Donor-specific antibodies at biopsy, n (%)			
Yes	8 (42.1)	6 (25.0)	0.3
Class I	1 (5.3)	1 (4.2)	0.9
Class II	7 (36.8)	5 (20.8)	0.9
MFI immunodominant class I	900	800	
MFI immunodominant class II,	1290 [1076-2536]	3675 [2600-4300]	0.3
De novo DSA, n (%)	4 (21.1)	6 (25.0)	0.08
Time from kidney transplantation to biopsy, days	864 [190-3079]	978 [161-2170]	0.7
Plasma creatinine at biopsy, $\mu\text{mol/L}$	150 [116-255]	204 [134-347]	0.09
Proteinuria at biopsy, g/g of creatininuria	1.3 [0.3-2.8]	1.0 [0.3-2.3]	0.8
Banff score			
cg	0.5 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 1.1	0.9
ci	1.3 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 0.8	0.5
ct	1.1 $\pm$ 1.1	1.1 $\pm$ 1.2	0.9
cv	1.4 $\pm$ 0.9	1.4 $\pm$ 1.0	0.9
mm	0.8 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 1.0	0.8
ptc	0.8 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.9	0.4
t	0.4 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.8	0.9
i	0.4 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.8	0.6
g	0.8 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.9	0.2
ah	0.8 $\pm$ 1.2	0.8 $\pm$ 1.1	0.9
v	0.1 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.8	0.2
ti	1.0 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.7	0.7
g + ptc	1.7 $\pm$ 1.1	2.2 $\pm$ 1.3	0.2
i + t	0.8 $\pm$ 1.4	0.9 $\pm$ 1.5	0.5
C4d positive, n (%)	0	0	

*Table 2: Baseline characteristics of patients with biopsies undetermined for antibody mediated rejection, according to molecular assessment results. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation or median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>] according to their distribution. CNI: calcineurin inhibitors. mTORi: mTOR mammalian target of rapamycin inhibitors. MFI: mean fluorescence intensity. DSA: donor-specific antibody.*

**Table 3**

Indication for biopsy-based transcriptomics	Number of biopsies, N (%)	Biopsy-based transcriptomics positive for AMR, N (%)
MVI positive, C4d negative, DSA negative	25/43 (58.1)	15/25 (60.0)
MVI negative, C4d negative, DSA negative	4/43 (9.3)	3/4 (75.0)
MVI negative, C4d negative, DSA positive	14/43 (32.6)	6/14 (42.9)

*Table 3: histological and biological features of the 43 “undetermined for AMR” biopsies and results of the biopsy-based transcriptomics. MVI: microvascular inflammation, DSA: donor-specific antibody, AMR: antibody-mediated rejection.*

**Table 4**

	Univariate analysis		p value	Multivariate analysis	
	Hazard Ratio (95% CI)			Hazard Ratio (95% CI)	p value
Age	1.0	(0.9-1.1)	0.9		
Sex (female)	0.9	(0.4-2.4)	0.9		
t	1.1	(0.7-1.9)	0.7		
i	1.3	(0.7-2.2)	0.4		
ti	1.5	(0.9-2.7)	0.2		
v	1.3	(0.6-2.8)	0.6		
cg	1.5	(1.0-2.1)	0.05		
cv	1.8	(1.1-3.1)	0.03	1.1	(0.6-2.3) 0.7
mm	1.4	(0.8-2.3)	0.6		
ah	1.1	(0.8-1.6)	0.5		
ci	2.3	(1.4-3.9)	0.002	0.9	(0.1-6.1) 0.9
ct	2.1	(1.4-3.3)	0.0007		
Plasma creatinine	1.0	(0.9-1.1)	0.5		
Proteinuria	1.6	(1.1-2.2)	0.009	1.6	(1.1-2.5) 0.03
Molecular signal negative for AMR	0.3	(0.1-0.9)	0.03	0.2	(0.1-0.7) 0.02

*Table 4: Univariate and multivariate analyses of risk factor for death-censored kidney transplant loss in the "undetermined for antibody-mediated rejection" group. CI: confidence interval, AMR: antibody-mediated rejection.*

### 3.3.10 Figure legends

#### **Figure 1:**

Flow-chart.

The “undetermined for AMR” group included biopsies that did not meet the histological and biological criteria for AMR, but could potentially be considered as AMR based the results of biopsy-based transcriptomics. Only one biopsy was included per patient, either the first one which met criteria of AMR or “undetermined for AMR”, or the first one if none of the biopsies met these criteria. Control biopsies were randomly selected to match the number of AMR biopsies that were available for biopsy-based transcriptomics.

DSA: donor-specific antibody. TCMR: T-cell mediated rejection. AMR: antibody-mediated rejection. FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded.

#### **Figure 2:**

Death-censored kidney graft survival at 5 years according to histological diagnosis.

Biopsies with all histological and biological criteria of antibody-mediated rejection (AMR) were defined as “histological AMR”. The “undetermined for AMR” group consisted in biopsies which did not meet the three histological criteria of AMR but would have been considered as AMR if the biopsy-based transcriptomics for AMR had been positive.

Death-censored kidney transplant survival was different between groups defined histologically without biopsy-based transcriptomics,  $p = 0.001$ . Outcome of the “histological AMR” and “undetermined for AMR” groups was similar,  $p = 0.9$ .

AMR: antibody-mediated rejection.

#### **Figure 3:**

Death-censored kidney graft survival at 5 years according to histological and biopsy-based transcriptomics.

Biopsies that met all Banff criteria for AMR regardless of the results of biopsy-based transcriptomics were included into the “histological AMR” group. Biopsies which met all Banff criteria for AMR after positive molecular assessment were included in the “Undetermined for AMR, molecular +” group. Biopsies undetermined for AMR with negative biopsy-based transcriptomics for AMR, therefore not reaching criteria for AMR, were included in the “Undetermined for AMR, molecular –“ group.

Death-censored kidney transplant (KT) survival at 5 year was different between these groups,  $p = 0.0005$ . As the “Undetermined for AMR, molecular +” biopsies were initially considered

as non-rejection biopsies, no specific treatment was attempted. KT survival was not statistically different between this group and the “histological AMR” group,  $p = 0.2$ . KT survival of the “Undetermined for AMR, molecular –“and the control groups was not statistically different,  $p = 0.09$ . KT survival of biopsies “undetermined for AMR”, with or without molecular signature of AMR was different,  $p = 0.001$ .

AMR: antibody-mediated rejection. KT: kidney transplant.

**Figure 4:**

Rejection-free survival at 2 years.

A second biopsy was performed after the first index biopsy in 36 patients. A rejection occurred in 0/6 patient from the control group, in 1/9 patient (11.1%) from the “undetermined for AMR, molecular-“ group, and in 4/11 patients (36.4%) from the “undetermined for AMR, MB+” group. Rejection-free survival was not statistically different between groups,  $p = 0.07$ .

### 3.3.11 Figures

Figure 1

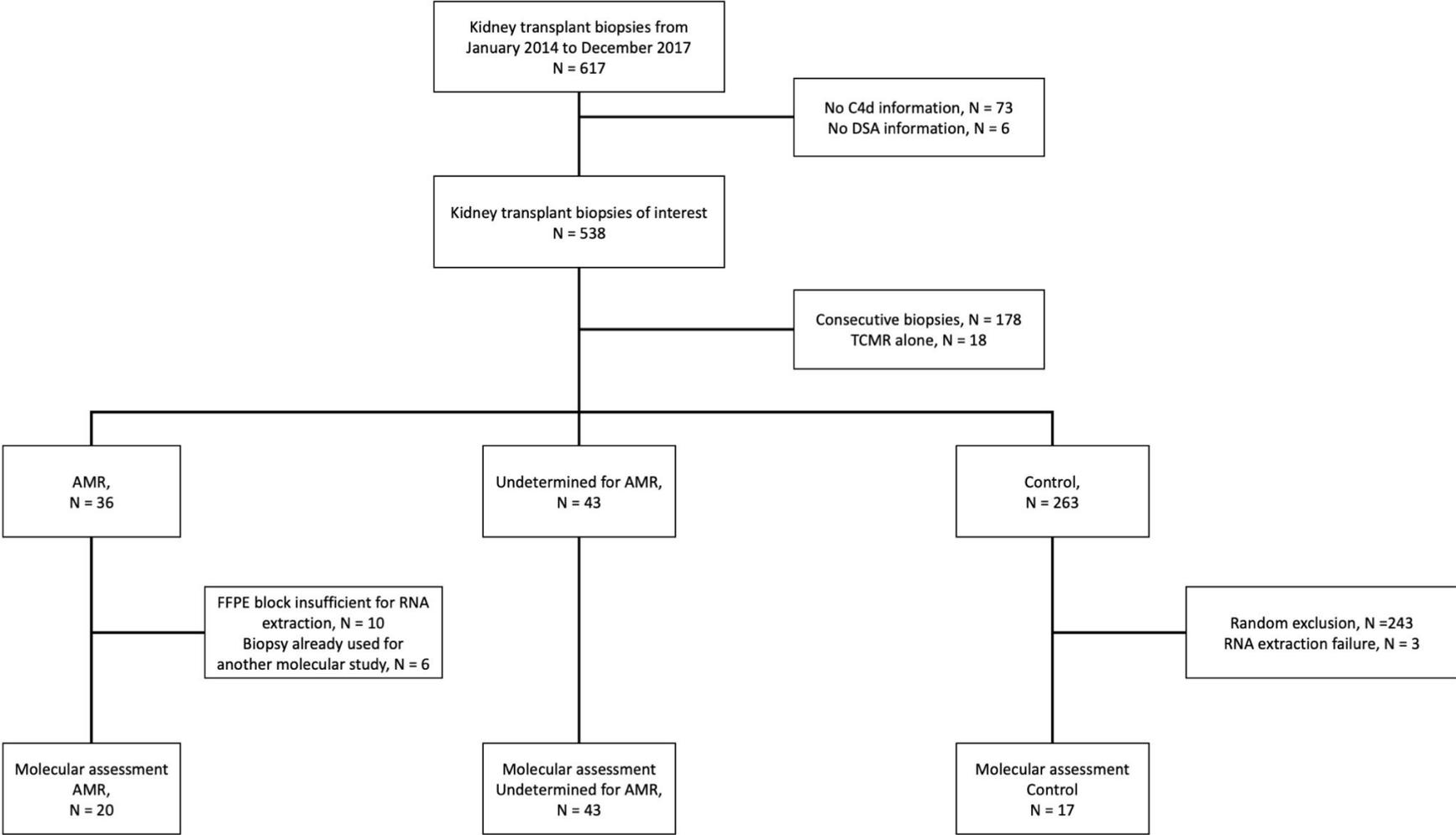
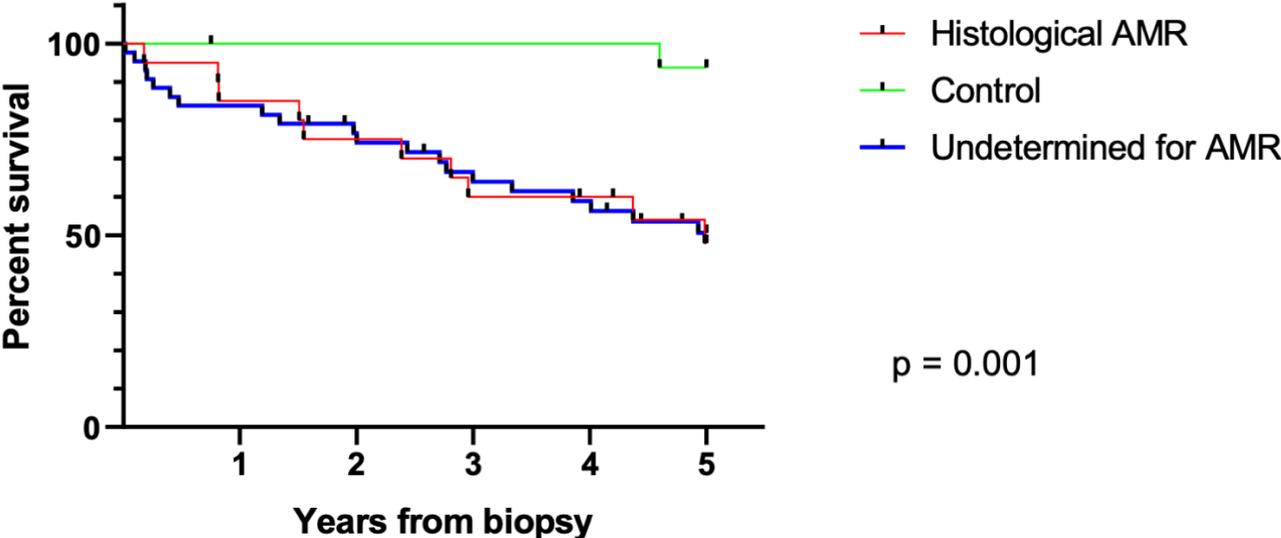


Figure 2

### Death-censored kidney graft survival



**Figure 3**  
**Death-censored kidney graft survival**

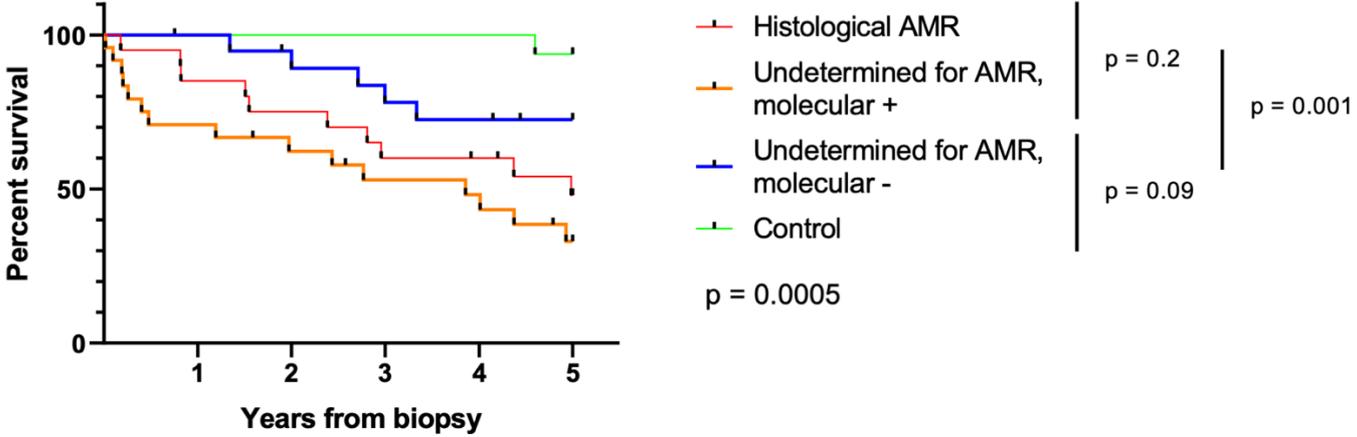
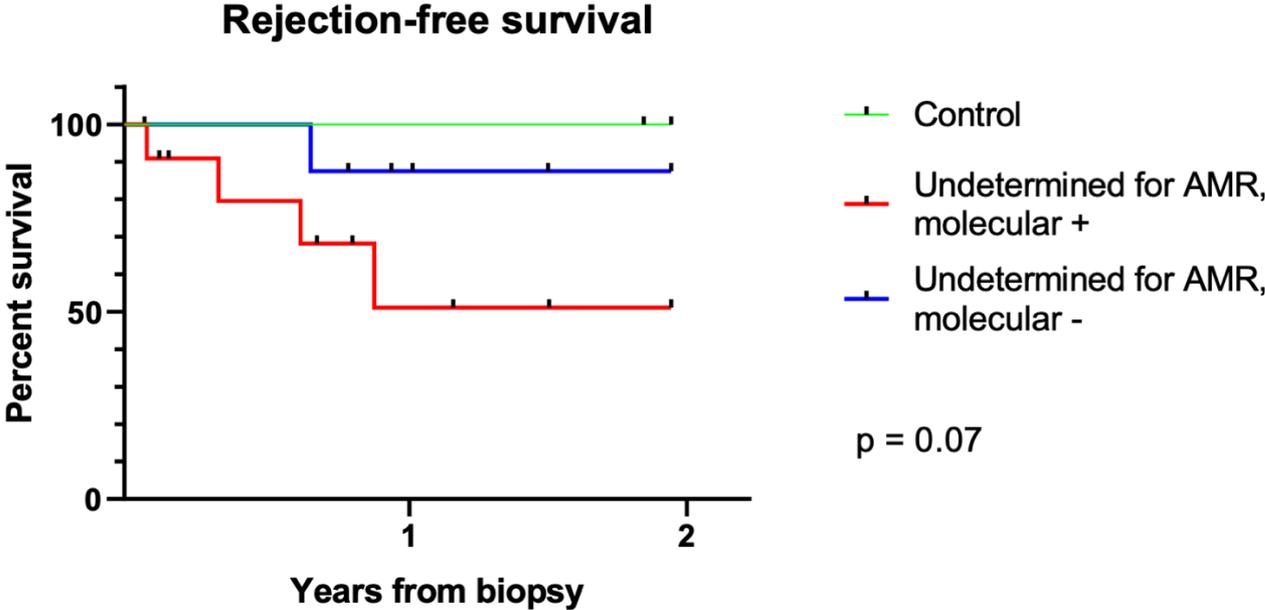


Figure 4



## **4 Caractérisation des lymphocytes B mémoires allo-réactifs chez les patients hyper immunisés**

### **4.1 Introduction et objectifs**

Comme vu précédemment, l'évaluation du risque de rejet repose principalement sur la mise en évidence d'anticorps anti-HLA, or celle-ci est grevée de nombreuses limites. Au-delà des problématiques liées aux techniques de dosage de ces anticorps, il apparaît que les caractéristiques de ces derniers -non recherchées en pratique clinique- agit sur leur potentielle pathogénicité.

Les caractéristiques de ces anticorps, telle que leur affinité et leur capacité effectrice, dépendent de la différenciation des cellules responsables de leur sécrétion, les SLPC et LLPC, et donc des lymphocytes B mémoires. En contexte infectieux, il est bien décrit que les lymphocytes B mémoires sont hétérogènes en termes de phénotypes (avec contingent CD21<sup>low</sup> ou tissue-like), fonctions, et degré d'hypermutation somatique et de switch isotypique. Les connaissances en matière de lymphocytes B mémoire allo-réactifs en transplantation d'organe solide sont encore très limitées. Or, la transplantation rénale représente une situation d'immunisation particulière, d'une part du fait de la complexité des molécules HLA, et d'autre part du fait de la stimulation antigénique chronique associée au greffon. Alors que les LLPC ne sont pas circulants, et donc inaccessibles à des explorations peu invasives, il a été montré chez le patient transplanté que les lymphocytes B mémoires peuvent être isolés<sup>81</sup>.

L'objectif de cette deuxième partie de thèse était donc de caractériser les lymphocytes B mémoires en transplantation rénale, afin d'évaluer d'une part si ces derniers présentent une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle particulière, et d'autre part si celle-ci est en lien avec des modalités variables de l'immunisation : type d'évènement immunisant et charge épitopique.

Pour ce faire, les lymphocytes B mémoires HLA-spécifique anti A2 et/ou anti A1 de patients immunisés en attente de transplantation rénale ont été étudiés à l'aide de la technologie single cell, permettant l'analyse de leur répertoire BCR et leur expression génique.

Du fait des délais liés à l'analyse bio-informatique, seuls les résultats préliminaires sont présentés ici.

## 4.2 Méthodes

### 4.2.1 Méthode de recherche des anticorps anti-HLA

Le test de dépistage des anticorps anti-HLA était réalisé annuellement ou à la demande du clinicien à l'aide du test Labscreen mixed beads. En cas de positivité de ce test, un test d'identification par Luminex était réalisé en utilisant le Labscreen *Single antigen beads*, avec un seuil de positivité de MFI à 500 (One Lambda, CA). Ces examens étaient réalisés par l'Etablissement Français du Sang de Hauts de France-Normandie.

### 4.2.2 Sélection des patients

Il s'agit d'une étude prospective monocentrique menée dans le service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation rénale du CHU de Rouen portant sur les patients inscrits sur liste de transplantation rénale. La période d'inclusion s'étendait du 1<sup>er</sup> novembre 2021 au 1<sup>er</sup> août 2023. Tous les patients ayant présenté des anticorps anti-HLA de spécificité anti-A1 et/ou anti-A2 sur au moins un examen réalisé dans le cadre du suivi habituel ont été sélectionnés.

Les patients ayant dont la MFI maximale n'atteignait pas au moins 2000 en *Single antigen* pour un des deux anticorps étaient exclus. Les autres critères d'exclusions étaient : diminution de plus de 25% des valeurs de MFI anti-A1 et/ou anti-A2 entre deux examens de *Single antigen*, traitement immunosuppresseur en cours, suivi réalisé dans un centre en dehors de la haute-Normandie, infection chronique par le VIH, personne privée de liberté par une décision administrative ou judiciaire ou personne placée sous sauvegarde de justice/sous-tutelle ou curatelle.

Parmi les patients répondants aux critères d'inclusions et ne présentant pas de critères d'exclusions, les spécificités anti-éplets ont été déterminées à l'aide de l'outil HLAMatchmaker (version juillet 2020 : <http://www.epitopes.net/>) et les événements immunisants antérieurs ont été recherchés à l'interrogatoire des patients et dans les dossiers cliniques.

La non-opposition des patients était recueillie après information orale et écrite. Les patients inclus dans l'étude restaient inscrits sur liste d'attente de transplantation.

L'étude était enregistrée sous le numéro 2021-A02507-34.

### 4.2.3 Isolement cellulaire

Tous les patients inclus étaient traités par hémodialyse chronique. Un prélèvement unique de 50 mL de sang était réalisé sur l'abord vasculaire avant le début de séance. L'ensemble des manipulations jusqu'à la *reverse transcription* de la suspension lymphocytaire B isolée, triée et partitionnée en cellules uniques était réalisée le jour du prélèvement, sur sang frais.

Le cellules mononuclées étaient isolées du sang périphérique à l'aide d'un gradient de Ficoll avec un ratio 1:2 de sang:PBS 1x. Une lyse des hématies par tampon ammonium-chlorure-potassium était réalisée si nécessaire. Les cellules isolées vivantes et apoptotiques étaient comptées manuellement à l'aide d'une cellule de Malassez (>90% viabilité).

Ensuite, un enrichissement en lymphocytes B était réalisé par tri négatif magnétique à l'aide du kit EasySep #19054 (Stemcell, Vancouver).

#### 4.2.4 Marquage cellulaire

##### 4.2.4.1 Anticorps utilisés

Plusieurs marquages membranaires ont été réalisés afin de permettre l'identification des lymphocytes B anti-A1 ou anti-A2, leur phénotypage membranaire en cytométrie, et l'identification de certains de ces marquages membranaires après séquençage. Par ailleurs, au cours d'une journée de manipulation, chaque échantillon de patient était marqué par un *hashtag* membranaire, anticorps couplé à un barcode spécifique de patient, permettant lors des étapes ultérieures de traiter en une suspension cellulaire unique plusieurs échantillons de patients.

Ces différents anticorps sont couplés soit à un fluorochrome permettant leur identification en cytométrie, soit à un barcode compatible avec le Chromium 10x permettant de tracer la cellule marquée par ce barcode après le séquençage. Certains anticorps sont couplés à la fois à un fluorochrome et à un barcode.

Le marquage de spécificité anti-A1 ou anti-A2 était réalisé à l'aide de dextramères HLA (dCODE-Dextramer) fournis par Immudex (Copenhague). Ces dextramères sont composés d'un dextran, auquel sont couplées des molécules HLA A1 ou A2 chargées d'un peptide non relevant. Pour chaque spécificité, deux dextramère étaient utilisés : l'un conjugué à la fois au fluorochrome APC (allophycocyanine) et à un barcode compatible Chromium 10x, et l'autre conjugué uniquement au fluorochrome PE (phycoerythrine) sans barcode associé.

Le marquage membranaire en fluorescence était réalisé l'aide d'anticorps anti-humains conjugués de spécificités suivantes : CD3 FITC, CD14 FITC, CD15 FITC et CD56 FITC CD19 APC, CD27 PE/Cyanine 7, et IgD PerCP/Cyanine5.5. Ces anticorps étaient fournis par Biolegend (San Diego).

Des anticorps barcodés anti-CD27 et anti-IgD ainsi que trois hashtags (#1, #2 et #3) ont été utilisés au cours de l'étude. Ces anticorps barcodés étaient fournis par Biolegend (San Diego).

#### 4.2.4.2 Protocole de marquage

Le marquage cellulaire a été réalisé selon les recommandations des différents fournisseurs, en utilisant des concentrations d'anticorps saturantes.

Brièvement, tous les lymphocytes B isolés après enrichissement magnétique étaient marqués. Après une incubation de 10 minutes des cellules en présence de *Fc Receptor Blocking* (Biolegend) dans du Stain Buffer contenant 0.1g/L d'ADN de sperme de hareng, le marquage anti-A1 et anti-A2 était réalisé avec un temps d'incubation de 10 minutes. Ensuite, le marquage par les autres anticorps fluorochromes, les anticorps barcodés, et les hashtags était réalisé dans le même temps, avec un temps d'incubation de 30 minutes à 4°C. Les anticorps anti-CD27 et anti-IgD marqués par un fluorochrome ou barcodés étaient mélangés à une concentration équimolaire.

Deux lavages à l'aide de PBS+BSA 1% étaient réalisés, puis les cellules étaient resuspendues dans du PBS-SVF à 2% à une concentration de 1 million de cellule par mL.

#### 4.2.5 Tri cellulaire

Les lymphocytes B ainsi marqués étaient triés à l'aide d'un trieur BD FACS Aria III.

Pour chaque patient, l'intégralité des cellules B HLA spécifiques (fenêtre CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD15<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>, dextramère-PE<sup>+</sup>, dextramère-APC<sup>+</sup>) étaient triées et chiffrées à partir du comptage fourni par le cytomètre.

Deux autres populations étaient triées : les lymphocytes B naïfs IgD<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> dextramère négatifs et B mémoires IgD<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> dextramères négatifs. Ces cellules étaient comptées manuellement et *poolées* aux cellules dextramères-positives avec un ratio 1:1:1.

Cette stratégie a été choisie en raison de la fréquence attendue faible des lymphocytes B dextramère-double-positifs, et du nombre minimal de cellules pouvant être traités par le système Chromium (10X Genomics) lors de la partition en cellules uniques : minimum 500 cellules par piste. Le choix a également été fait d'utiliser les sous-populations naïves et mémoires dextramère-négatives comme références pour l'analyse des lymphocytes B dextramère-double-positives.

Du fait de l'utilisation de hashtags spécifiques de patients, ces échantillons étaient ensuite *poolés* et les cellules étaient resuspendues dans 33µL de PBS-SVF 2%. Un à trois échantillons de patients pouvaient donc être traités par série de manipulation.

#### 4.2.6 Génération des émulsions de cellules uniques

Cette étape était réalisée selon le protocole « Single Cell 5' Reagent Kits v2 (Dual Index) », version décembre 2022, du fournisseur Chromium 10x.

L'émulsion de cellules uniques était générée en combinant le pool de cellules issues du tri cellulaire, le mix de réactifs de PCR, et l'huile de partitionnement. Ces éléments sont ensuite chargés dans le *Chromium Controller 10x* qui permet de générer des gouttelettes lipidiques contenant chacune une seule cellule marquée selon le protocole ci-dessous, le matériel nécessaire à une RT-PCR, et un identifiant unique de gouttelette.

Dans un second temps, le contenu des gouttelettes est lysé, permettant à l'ARNm cellulaire et aux barcodes des anticorps utilisés d'être « capturés » par les amorces associées à chaque gouttelette. Ces amorces sont constituées d'une séquence universelle d'initiation de PCR, d'un barcode 10x, d'un identifiant unique à chaque gouttelette (barcode 10x), d'un motif TSO (template switch oligo) permettant d'ajouter une séquence 5' commune à l'ADNc synthétisé lors de la reverse transcription.

Ensuite, une étape de reverse transcription est effectuée, puis le cDNA est amplifié.

#### 4.2.7 Construction des bibliothèques

Après cette étape, trois bibliothèques ont été construites : la bibliothèque d'expression de gènes, permettant d'évaluer approximativement les 1000 transcrits les plus exprimés dans chaque cellule, la bibliothèque V(D)J qui permet d'étudier le répertoire BCR, et la bibliothèque des protéines de surface, correspondant au marquage par les anticorps barcodés : dextramère A1 et A2, CD27, IgD, et hashtags d'identification patient.

Pour un même échantillon, les 3 bibliothèques partagent un même identifiant 10X Genomics. Les hashtags, amplifiés au sein de la bibliothèque de surface, permettent d'identifier chaque patient. Lors de la construction de chaque bibliothèque, un « sample index » y est associé, permettant réaliser simultanément le séquençage de toutes les bibliothèques construites ([Table 1](#)).

Jour de génération de l'émulsion	Nom du patient inclus	Hashtag associé au patient lors du marquage	Barcode 10x d'une gouttelette lipidique	Index librairie de surface	Index librairie expression de gènes	Index librairie V(D)J
Émulsion 1	Patient 1	#1	Barcode 10x	Index A1	Index B1	Index C1
	Patient 2	#2	Barcode 10x			
	Patient 3	#3	Barcode 10x			
Émulsion 2	Patient 4	#1	Barcode 10x	Index A2	Index B2	Index C2
	Patient 5	#2	Barcode 10x			
Émulsion 3	Patient 6	#1	Barcode 10x	Index A3	Index B3	Index C3
	Patient 7	#2	Barcode 10x			
	Patient 8	#3	Barcode 10x			

Table 1 : représentation des différents index et barcodes permettant d'identifier chaque échantillon de patient après le séquençage simultané de l'ensemble des librairies. Les librairies de surface, d'expression de gènes et V(D)J issues d'une même gouttelette partagent le même barcode 10x unique.

#### 4.2.8 Séquençage des librairies

Pour chaque librairie, la taille moyenne des fragments d'ADN et leur concentration étaient déterminées par électrophorèse à l'aide d'un bioanalyseur Agilent (Santa Clara) utilisant une puce à haute sensibilité. La concentration en ADN était aussi vérifiée par quantification fluorométrique Qubit (ThermoFisher, Waltham).

Toutes les librairies ont été poolées pour le séquençage. Les librairies étaient poolées d'après les recommandations du fournisseur de façon à ce que 5000 reads soient effectués pour chaque librairie de surface, 10000 pour chaque librairie V(D)J, et 35000 pour chaque librairie d'expression de gènes. Au sein d'un groupe de librairie chaque échantillon était poolé de manière équimolaire. Le séquençage de l'ensemble des librairies issues de tous les échantillons a été effectué sur séquenceur NovaSeq lors d'un run unique à l'aide d'une *flowcell* d'une capacité de 800 millions de reads afin d'éviter un effet *batch*.

## 4.3 Résultats

### 4.3.1 Patients inclus

Vingt-et-un patients répondaient aux critères d'inclusion. Pour 4 d'entre eux, un échec technique a eu lieu au cours de la manipulation, avant la genèse des émulsions de cellule. Un patient n'a pas pu être inclus du fait de l'éloignement géographique et de la nécessiter de réaliser la manipulation sur du sang frais. Une patiente a secondairement été exclue pour des considérations techniques de séquençage. En effet, pour cette patiente, trop de cellules naïves dextramères-négatives ont été poolées aux cellules HLA-spécifiques. Ces cellules ayant un intérêt moindre dans l'étude, et du fait des coûts associés au séquençage, il a été décidé de ne pas séquencer les bibliothèques de cette patiente.

Au total, les échantillons de 15 patients ont donc été inclus et effectivement séquencés.

### 4.3.2 Caractéristiques des patients inclus

Les données d'immunisation des patients inclus et, le cas échéant, les données de leur donneur ont été récupérées dans les dossiers cliniques locaux ou nationaux. La cinétique d'apparition des anticorps anti-A1 et/ou anti-A2 a permis d'identifier les événements responsables de ces immunisations. L'algorithme HLAMatchmaker a permis d'identifier les épîtres contre lesquels les patients sont immunisés, et d'associer ces épîtres à une immunisation anti-transplant ou non (grossesse, transfusion ou anticorps dits naturels) (**Table 2**).

D'après ces caractéristiques, trois phénotypes sont identifiés et serviront de sous-groupe pour l'interprétation des résultats de séquençage : 1- immunisation dirigée contre de nombreux épîtres après une transplantation d'organe solide ou une grossesse, 1- immunisation dirigée contre peu d'épîtres après une transplantation d'organe solide ou une grossesse, 3- immunisation après transfusion.

Patient	Sexe	Age	MFI anti-A1	Immunisation suspectée anti-A1	Nombre d'épiles anti-A1	Anti-A1 anti-transplant	Anti-A1 autre	MFI anti-A2	Immunisation suspectée anti-A2	Nombre d'épiles anti-A2	Anti-A2 anti-transplant	Anti-A2 autre	Nombre total d'épiles ciblés	Transplantation antérieure	Détransplantation	Durée avec greffon en place
BEG.	M	28						7156	Post transplantation	2	62GK 62GE		9	1	1	6 ans
BOU.	M	37						23460	Post transplantation	8	62GK 107W 127K 142TKH 144KHA 150AAH 193AV 253Q		45	1	1	1 an
LE .	M	51						17693	Post transplantation	5		62GK 62GE 107W 142TKH 144KHA	9	1	1	23 ans
LEB.	M	56						970	Post transplantation	4	62GK 62GE 107W	95V	11	1	1	13 ans
CAB.	M	53	18462	Post transplantation	2	44KM 163RG							4	1	1	10 ans
CLO.	F	50	22194	Post transplantation	7	79GT	44KM 62QE 65RNA 76ANT 163R 163RG	21890	Post transplantation	8	62GK 62GE 79GT 107W 142TKH 144KHA 193AV 253Q		43	1	1	6 mois
EKA.	M	67	13467	Post transfusion	2		44KM 163RG						7	0	0	
LEU.	M	47	10951	Post transplantation	2		44KM 163RG						9	1	0	12 ans
LUC.	M	40	22517	Post transplantation	6	44KM 62QE 76ANT 144KR 163R 163RG							23	1	1	2 ans
BAL.	M	67	21244	Post transfusion. Les épiles anti-transplant A1 sont partagés avec le	6	144KR 144K 149AH 166DG	44KM 163RG	21519	Post transplantation	9	62GK 62GE 107W 127K 142TKH		40	1	0	10 ans

				A24 :02 du donneur.							<b>144K</b> 144KHA <b>149AH</b> 150AAH					
BAR.	F	49	2648	Post transplantation. Les épèlets anti-transplants correspondent à des épèlets partagés avec A2 et A24 présentés par le greffon	4	<b>149AH</b> <b>163RG</b>	<b>44KM</b> 163R	22499	Post transplantation	8	62GK 62GE 107W 127K 142TKH 144KHA <b>149AH</b> 150AAH		32	1	1	1 jour
BEL.	M	42	18724	Post transplantation	3		<b>44KM</b> <b>163RG</b> 166DG	22841	Post transplantation	3	62GK 62GE 107W		33	1	1	1 an
BRU.	M	54	997	Post transfusion	1		<b>163RG</b>	7783	Post transplantation	5		62GK 107W 127K 142TKH 144KHA	22	1	0	8 ans
CHA.	F	54	11267	Post grossesse	4		<b>44KM</b> 62QE 144KR <b>163RG</b>	18403	Post grossesse	3		62GK 62GE 107W	22	0	0	
TOU.	M	59	835	Post transfusion	3		<b>44KM</b> <b>149AH</b> <b>163RG</b>	21700	Post transfusion	7		62GK 107W 127K 142TKH 144KHA <b>149AH</b> 150AAH	13	0	0	

Table 2 : caractéristiques de l'immunisation anti-HLA des patients inclus. Les épèlets partagés entre les HLA-A1 et HLA-A2 chez un même patient sont matérialisés en gras. Les épèlets étant partagés par moins de 3 molécules HLA sont matérialisés en rouge. MFI: mean fluorescence intensity

### 4.3.3 Isolement des cellules et données de cytométrie

Tous les patients ont été prélevé de 50 mL de sang, directement sur l'abord vasculaire, avant le branchement au générateur de dialyse. A partir de ces prélèvements, la médiane [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>] du nombre de cellules mononuclées était 42.7 millions [29.9-58.0]. Après enrichissement lymphocytaire B, 1.5 millions [0.7-2.0] de lymphocytes B étaient isolés puis marqués pour l'étape de cytométrie. La stratégie de gating pour le tri lymphocytaire est représentée en **Figure 1**.

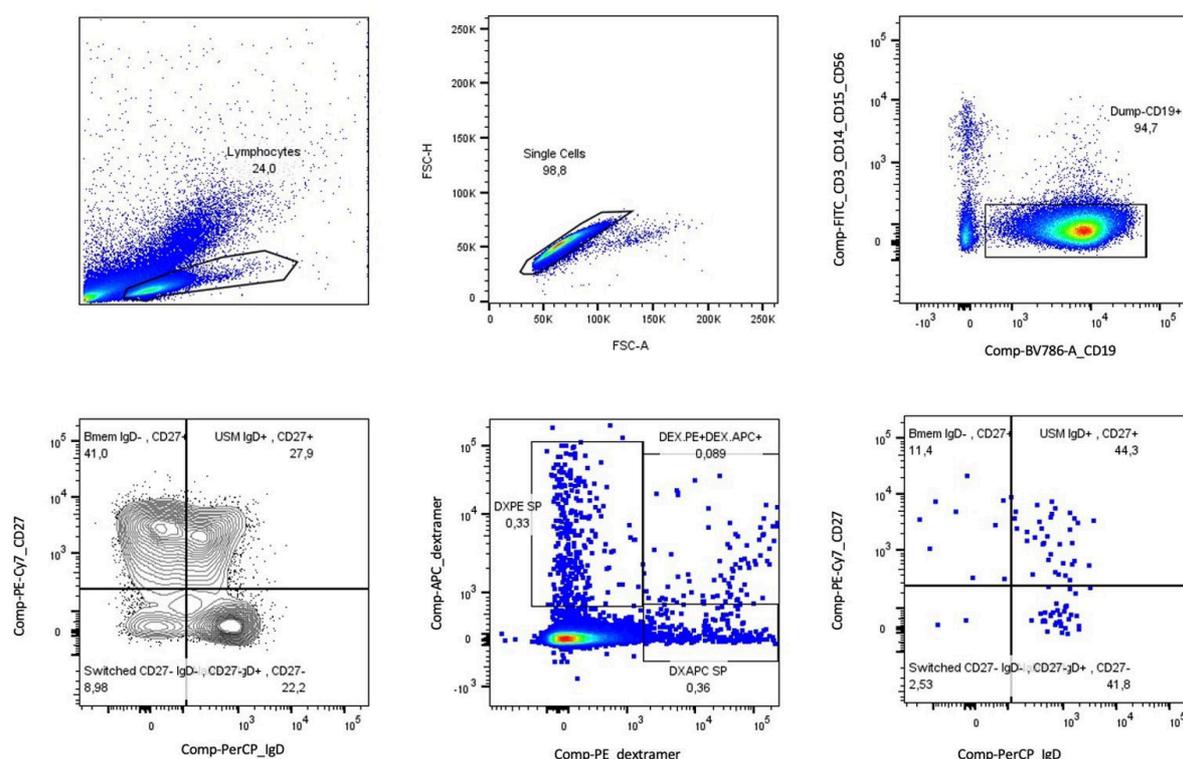


Figure 1 : Stratégie de tri cytométrique

Au sein des lymphocytes B CD19<sup>+</sup>, 77.1% [57.6-82.0] avaient un phénotype de lymphocyte B naïf CD27-IgD<sup>+</sup>, 10.3% [8.0-24.0] un phénotype de lymphocyte B mémoire switché CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>, 5.6% [2.8-8.0] un phénotype de lymphocyte B mémoire non switché CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, et 3.9% [3.4-8.0] un phénotype de lymphocyte B switché CD27-IgD<sup>+</sup>.

Les lymphocytes doublement marqués par les dextramères HLA représentaient 0.07% [0.05-0.09] des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> totaux. Au sein des lymphocytes doubles dextramères, la répartition entre les populations naïves, mémoires switchées et non switchées, et CD27-IgD<sup>+</sup> était comparable à celle des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> non dextramères marqués.

La répartition de ces populations par patient est fournie dans la **Table 3**.

Le trieur cytométrique BD FACS Aria III fournit un décompte de cellules triées.

Aussi, d'après le cytomètre, 655 [358-1541] cellules dextramère-doubles positives ont été triés par échantillon pour un total de 14837 cellules double marquées par les dextramères. Du fait du nombre de cellules par échantillon, ces cellules n'ont pu être recomptées manuellement. Néanmoins, la population de cellules B non marquées par les deux dextramères étant plus importante, ces dernières étaient recomptées manuellement avant d'être poolées au cellules dextramères positives en vue de la génération des émulsions de cellules uniques. Ainsi, il a pu être mis en évidence une discordance de  $-25.3\% \pm 19.7$  entre le comptage du cytomètre et le comptage manuel. Aussi, il est estimé qu'environ 11000 cellules dextramères double-positives ont effectivement été chargées sur la piste du *Chromium Controller 10x*.

Patient	Répartition des sous-populations lymphocytaires B au sein des cellules CD19 <sup>+</sup>				Fréquence des lymphocytes double dextramères parmi les lymphocytes CD19 <sup>+</sup>	Répartition des sous-populations lymphocytaires B au sein des cellules CD19 <sup>+</sup> , doubles dextramères <sup>+</sup>			
	Lymphocyte B mémoire switché CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	Lymphocyte B naïf CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>	Lymphocyte B switché CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>	Lymphocyte B mémoire non switché CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>		Lymphocyte B mémoire switché CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup>	Lymphocyte B naïf CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>	Lymphocyte B switché CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup>	Lymphocyte B mémoire non switché CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>
BAL.	8,2%	81,8%	7,5%	2,5%	0,07%	0,0%	75,0%	0,0%	25,0%
BAR.	4,7%	89,8%	3,6%	2,0%	0,12%	0,0%	91,7%	8,3%	0,0%
BEG.	7,0%	87,9%	2,5%	2,7%	0,14%	0,0%	92,3%	0,0%	7,7%
BEL.	9,8%	81,3%	3,3%	5,6%	0,04%	4,8%	76,2%	2,4%	16,7%
BOU.	7,2%	77,1%	11,6%	4,2%	0,54%	2,4%	85,4%	9,8%	2,4%
BRU.	20,4%	51,4%	3,9%	24,3%	0,04%	0,0%	47,6%	4,8%	47,6%
CAB.	34,5%	52,9%	9,7%	2,9%	0,04%	7,9%	76,3%	0,0%	15,8%
CHA.	15,3%	67,4%	3,7%	13,5%	0,08%	3,9%	69,2%	0,0%	26,9%
CLO.	31,6%	59,4%	7,1%	2,0%	0,05%	4,7%	83,7%	2,3%	9,3%
EKA.	27,4%	55,8%	8,9%	7,9%	0,06%	12,2%	59,2%	14,3%	14,3%
LE .	7,8%	82,2%	3,4%	6,5%	0,09%	6,8%	71,6%	2,3%	19,3%
LEB.	41,0%	22,2%	9,0%	27,9%	0,09%	11,4%	41,8%	2,5%	44,3%
LEU.	10,3%	77,4%	7,2%	5,0%	0,07%	3,4%	86,4%	5,1%	5,1%
LUC.	13,7%	75,7%	3,5%	7,2%	0,05%	0,0%	87,5%	0,0%	12,5%
TOU.	9,8%	80,4%	2,0%	7,8%	0,07%	0,0%	71,4%	0,0%	28,6%
Moyenne ± déviati on standard	16,6% ± 11,6	69,5% ± 18,2	5,8% ± 3,1	8,1% ± 7,9	0,1% ± 0,1	3,8% ± 4,2	74,4% ± 15,1	3,5% ± 4,3	18,4% ± 14,1
Médiane [1er-3ème quartiles]	10,3% [8,0 - 23,9]	77,1% [57,6 - 81,6]	3,9% [3,4 - 8,2]	5,6% [2,8 - 7,8]	0,07% [0,05 - 0,09]	3,4% [0 - 5,9]	76,2% [70,3 - 85,9]	2,3% [0 - 4,9]	15,8% [8,5 - 26,0]

Table 3 : répartition des sous-populations lymphocytaires B CD19<sup>+</sup> par patient, au sein de l'ensemble des cellules CD19<sup>+</sup> et au sein des cellules doubles marquées par les dextramères

### 4.3.4 Données de séquençage

Les premières analyses bio-informatiques ont permis d'obtenir le décompte des cellules effectivement encapsulées lors de la génération des émulsions, puis séquencées (**Table 4**).

Série d'échantillons	Patient	Comptage par le cytomètre			Comptage manuel et estimation d'un taux de succès d'encapsulation de 50%		Données issues du séquençage		
		Nombre de cellules théoriquement chargées sur le Chromium 10x	Nombre de cellules dextramères double-positives théoriquement chargées	Nombre de cellules dextramères double-négatives théoriquement chargées	Nombre estimé de cellules par patient	Nombre estimé de cellules par série	Nombre de cellules séquencées	Pourcentage de cellules séquencées ayant un marquage hashtag patient	Nombre de cellules séquencées par patient
A	BAL.	5320	1213	2408	1086	1596	1981	96.1	1343
	EKA.		282	566	254				333
	LEB.		291	561	256				227
B	BEG.	5665	1869	2000	1161	1700	4229	84.8	2200
	TOU.		596	1200	539				1386
C	BEL.	5080	655	2000	797	1525	3089	56.3	912
	BRU.		425	2000	728				826
D	BOU.	3450	561	1044	482	1038	1300	85.4	192
	BAR.		763	1089	556				918
E	CAB.	4990	149	295	133	1497	2089	87.8	0
	CLO.		203	274	143				0
	LEU.		2621	1448	1221				1833
F	CHA.	10809	1005	1600	782	3243	2290	90.1	531
	LUC.		2137	2000	1241				737
	LE .		2067	2000	1220				808
Somme des cellules		35314	14837	20485	10599	10599	14978		12246

Table 4 : nombre de cellules triées, chargées dans le Chromium 10x, et effectivement encapsulées et séquencées.

## 4.4 Discussion

Du fait des délais liés à l'analyse bio-informatique des données générées, seule la première partie des résultats est présentée ici.

Au total, les cellules de 15 patients ont pu être séquencées. Ces patients présentaient une immunisation anti-HLA A1 et/ou anti-HLA A2 stable sur la base de tests *Single antigen*, et répondaient à la définition de patient hyper-immunisés sur la base d'un taux de greffon incompatible des 5 dernières années supérieur ou égal à 85%.

En utilisant l'outil HLAMatchmaker, différents profils d'immunisation ont pu être mis en évidence. En effet, en appliquant cet outil aux résultats des sérums prélevés successivement au

cours du suivi des patients, la cinétique d'apparition des anticorps anti-éplet a été réalisée, permettant de suspecter l'évènement à l'origine de l'immunisation : post-transfusion, post-grossesse, ou post-transplantation. De plus, il a été possible d'identifier si une immunisation anti-éplet A1 et/ou A2 était secondaire à une molécule HLA A1 ou A2 effectivement présentée par le greffon, ou si elle faisait suite à une immunisation contre un éplet partagé avec une autre molécule HLA, lorsque le greffon ne présentait pas la molécule A1 ou A2.

La stratégie de tri a permis d'identifier en moyenne  $0.1\% \pm 0.1$  de lymphocytes B HLA-spécifiques parmi les lymphocytes B CD19<sup>+</sup> totaux, pour un total de 14837 cellules B HLA-spécifiques. Cette faible fréquence de lymphocytes B HLA-spécifiques identifiés en cytométrie est en adéquation avec les données connues concernant les lymphocytes B HLA-spécifiques dans le cadre de la transplantation rénale<sup>145,146</sup>, ou peptide-spécifiques dans le cadre de l'immunité anti-SARS-CoV-2<sup>147</sup>, ou de l'immunité anti-bactérienne<sup>148</sup>. Cette faible fréquence de lymphocytes B HLA-spécifiques explique les difficultés à les explorer et donc à les décrire dans le cadre de la transplantation<sup>149</sup>.

Le séquençage BCR dans une situation de transplantation rénale a déjà été étudié. En effet, Beausang *et al.* ont montré que chez les patients hyper-immunisés, il n'y avait pas de clone BCR prédominant parmi l'ensemble des lymphocytes B séquencés<sup>150</sup>. Néanmoins, aucune stratégie de tri HLA-spécifique n'était réalisée. Après administration de Rituximab, les auteurs montraient une diminution de ce répertoire B avec par ailleurs une augmentation de la proportion de lymphocytes B switchés. Ceci pourrait être expliqué par la non-sensibilité au Rituximab de cellules telles que les LLPC ayant un BCR très différencié responsables d'un répertoire d'anticorps plus restreint. Plus récemment, Pineda *et al.* ont réalisé une étude avec des prélèvements pré- et post-transplantation pendant 24 mois. Ils ont ainsi montré que les patients développant un rejet après transplantation avaient un répertoire BCR pré-transplantation plus large, et qu'après transplantation celui-ci se restreignait avec une accumulation de variants au sein des séquences V(D)J et une augmentation de la clonalité comparativement aux patients ne développant pas de rejet<sup>151</sup>. Cette restriction de répertoire était présente dès les premiers mois post-transplantation, avec l'occurrence du rejet. Néanmoins, il s'agissait dans cette étude d'un séquençage *bulk* sans isoler spécifiquement les lymphocytes B HLA-spécifique, aussi aucune information sur les cellules sécrétrices d'anticorps n'était disponible.

Dans le cadre de cette thèse, l'analyse de lymphocytes B HLA-spécifiques à l'aide de la technologie Single cell va permettre d'étudier individuellement chaque cellule, en fournissant des informations quant aux variants V(D)J accumulés, au transcriptome de la cellule en identifiant environ les 1000 transcrits les plus exprimés, et aux marqueurs de membranes utilisés (ici HLA, CD27 et IgD). L'ensemble de ces informations permettra d'identifier des clusters de cellules selon leur phénotype membranaire, leur spécificité anti-HLA, et leur fonctionnalité suspectée du fait des transcrits exprimés. Le séquençage V(D)J permettra d'apprécier la diversité du BCR et la et la clonalité cellulaire au sein d'un échantillon patient, qui seront interprétés à la lumière du profil d'immunisation de chaque patient.

## 5 Discussion et perspectives

Malgré une activité de recherche importante en immunologie de la transplantation, les outils utilisés pour évaluer le risque de rejet ou pour diagnostiquer celui-ci en pratique clinique sont peu nombreux et souffrent de différentes limites.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes appliqués à mieux comprendre la physiopathologie de la réponse B mémoire anti-HLA et à développer un outil de diagnostic moléculaire appliqué aux biopsies de greffons rénaux.

Comme nous l'avons vu, les anticorps anti-HLA ne reflètent que partiellement le risque de rejet. L'impact de certaines caractéristiques de ces anticorps, comme les sous-classes IgG, sur leur pathogénicité a déjà été étudié, sans améliorer significativement le pouvoir prédictif du rejet de ces anticorps. Une des raisons pour cette faible association entre biologie et clinique pourrait être que les techniques actuelles de dosage des anticorps en pratique clinique ne reflètent pas avec justesse les cellules indirectement responsables de leur sécrétion. En effet, il a été montré que ces lymphocytes B mémoires, cellules elles-mêmes non sécrétrices d'anticorps, mais précurseur des cellules sécrétrices d'anticorps et accessibles dans la circulation périphérique sont hétérogènes en termes de phénotype et de fonction. Bien que les résultats définitifs des données issues du séquençage réalisé ne soient pas disponibles, nous avons pu identifier des lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques chez des patients en attente de transplantation rénale, présentant une immunisation anti-HLA d'intensité et d'étiologie (transplantation, grossesse, transfusion) variable. Les résultats définitifs devaient permettre de mieux comprendre les mécanismes soutenant la réponse allo-réactive et aider à termes à mieux stratifier le risque immunologique des patients.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons donc développé un outil de PCR multiplex évaluant un panel restreint de gènes pour le diagnostic du rejet de greffe rénale et sa classification entre rejet cellulaire et rejet humoral. Nous avons ensuite appliqué cet outil à différentes situations cliniques, participant d'une part une validation externe, et d'autre part à l'exploration de l'intérêt de tels outils en pratique clinique.

A ce jour, le diagnostic du rejet humoral repose sur l'observation de lésions histologiques peu spécifiques lorsqu'elles sont considérées une à une, et avec une faible profondeur de détails : absence de typage cellulaire, non évaluation des sous-types d'immunoglobulines, absence de

mise en évidence d'un DSA au sein du greffon et d'identification du DSA responsable : anti-HLA classe 1 ou 2, antigènes mineurs...

Le phénotypage moléculaire des biopsies de greffons rénaux en utilisant de larges panels tels que le MMDx ou le B-HOT panel nous donne donc accès à une nouvelle strate d'informations nous permettant de mieux comprendre les voies physiopathologiques du rejet. Dans le cadre du rejet humoral, trois sous-types sont reconnus à ce jour : actif, chronique-actif et chronique-inactif, la lésion signant un rejet dit chronique étant la multi-lamellation de la membrane basale. Il semble exister une chronologie entre ces trois phénotypes. Pourtant, certains patients vont d'emblée présenter des stigmates de chronicité sans que ce type de présentation clinique ne soit réellement expliqué. De même, en intégrant des données non histologiques, on perçoit que ces catégories mélangent différents phénotypes de patients : rejet infra-clinique, lentement progressif, répondeur ou non à un traitement, AMR actif précoce avec DSA pré existant mettant en jeu des réponses B mémoires versus AMR actif tardif avec DSA *de novo*<sup>162</sup>... Il est probable que le phénotypage moléculaire de ces différentes catégories diagnostiques apporte des éléments de réponse permettant de mieux comprendre et refléter cette hétérogénéité : signal moléculaire de chronicité peu en faveur d'une réponse aux traitements, différenciation de processus pathogènes comme les AMR liés à un DSA et les AMR secondaires au *missing self*, réduction de l'ambiguïté concernant les rejets mixtes (co-incidence d'un AMR et d'un TCMR ou autre voie spécifique), identification de signaux cellulaires spécifiques<sup>163</sup>.

A côté de ces considérations concernant l'affinage des connaissances physiopathologiques, l'utilisation éventuelle de tels outils en pratique clinique soulève d'autres questions.

D'un point de vue technique, au même titre que l'évaluation histologique du greffon souffre d'une variabilité inter observateur, la reproductibilité de ces tests doit être évaluée. Au-delà du test en lui-même, la phase pré-analytique peut varier d'un centre à l'autre (modalités de fixation de la biopsie, de préservation des blocs dans le cadre d'une évaluation sur FFPE, d'extraction de l'ARN...), modifiant les caractéristiques de l'ARN extrait en termes de tailles des fragments, concentration et pureté, et modifiant potentiellement les résultats d'un même test de biologie moléculaire. Aussi, il n'y a pas à ce jour de recommandations quant aux caractéristiques requises pour permettre une évaluation moléculaire, par analogie avec les critères définissant les biopsies adéquates pour rendre un diagnostic selon le Banff.

Concernant la phase analytique, la multiplicité des plateformes et leurs caractéristiques intrinsèques questionnent sur la possibilité de standardisation des résultats obtenus par l'une ou

l'autre de ces techniques, et donc sur les possibilités de comparaison inter-centres. Par exemple le MMDx utilise un fragment de biopsie conservé dans du RNAlater et implique une étape d'amplification de l'ADN, alors que le B-HOT panel du Nanostring utilise un fragment de biopsie fixé, ce qui risque de fragmenter les ARNm, et mesure directement les ARNm sans étape de pré-amplification. Dans la première étude menée ici, nous avons montré une corrélation imparfaite entre les résultats bruts du panel de gènes fournis par la RT-MLPA et par le B-HOT panel du Nanostring, bien que l'interprétation globale de ces résultats via l'utilisation du *classifier* était comparable dans 80% des biopsies.

Une des étapes pour l'amélioration de l'accessibilité des outils de biologie moléculaire est la réduction du nombre de gènes évalués. Les deux outils actuellement sur le marché évaluent plusieurs centaines de gènes, augmentant le coût des technologies. Il est probable qu'un panel restreint de gènes suffise pour le diagnostic des principales entités décrites par le Banff. Dans l'étude de Beadle *et al*, les auteurs ont évalué 349 biopsies à l'aide du B-HOT panel (770 gènes). A l'aide d'un modèle d'apprentissage supervisé, un panel de 9 gènes a pu être identifié au sein de ce panel, avec de bonnes performances de diagnostic du rejet humoral. La même équipe avait précédemment identifié un panel de 10 gènes évalués en RT-PCR, aussi pour le diagnostic de rejet humoral. Dans un autre travail non publié de Jasper Callemeyn et Maarten Naesens, des performances diagnostiques satisfaisantes étaient obtenues en évaluant uniquement 2 gènes pour le diagnostic de rejet humoral. Ces études sont néanmoins focalisées sur le diagnostic du rejet humoral. Aussi, il est probable qu'un panel trop restreint de gènes induise une trop grande perte d'information et réduise l'utilisation du diagnostic moléculaire à une seule question avec une réponse binaire : diagnostic de l'AMR, diagnostic du TCMR, stratification actif/chronique actif/chronique inactif... Comparativement, le panel de 17 gènes mis en place ici permet de classer les biopsies en trois catégories : AMR, TCMR et contrôle. Aussi, un compromis sera probablement à trouver entre nombre restreint de gènes afin de diminuer le coût de la technique, mais suffisant pour permettre de répondre aux différentes situations cliniques rencontrées. A ce jour, il n'a pas encore été identifié de « panel universel » restreint.

L'impact clinique de tels outils n'est pas non plus défini en termes de volume de biopsies pouvant changer de catégorie après évaluation moléculaire et de pronostic de ces biopsies. Dans la 2<sup>ème</sup> étude de cette thèse, nous avons évalué cet impact à une échelle monocentrique pour les biopsies suspectes de rejet humoral. Se faisant, nous avons pu montrer qu'environ 10% des biopsies de notre centre aurait dû bénéficier d'une évaluation moléculaire, et que celle-ci était

en faveur d'un rejet humoral dans 50% des cas. A une plus grande échelle, et en étendant les indications de la biologie moléculaires à d'autres situations (TCMR, biopsies avec dépôts de C4d sans signes de rejet, biopsies optiquement normales mais faite devant l'apparition d'un DSA...), la proportion de biopsies pour lesquelles l'évaluation moléculaire pourrait être intéressante n'est pas connue. Aussi, il est difficile à ce jour de juger de la rentabilité diagnostique et de l'impact financier de l'implémentation de tels outils.

Une autre limite majeure de l'utilisation des outils de biologie moléculaire, que ce soit dans le cadre de la description de voies physiopathologiques ou dans le cadre du soin courant est celle d'un gold-standard imparfait. En effet à ce jour celui-ci est l'évaluation histologique guidée par la classification de Banff, définissant un nombre limité de catégories diagnostiques. Les limites de cette classification ont été précédemment décrites : biais d'échantillonnage et limites techniques, variabilité intra- et inter-individuelle, spécificité restreinte des lésions, erreurs dans l'utilisation des recommandations. A côté de ces limites, les modifications régulières de la classification questionnent. Celles-ci sont effectuées après publications d'études fondamentale et/ou cliniques concordantes par au moins deux équipes, permettant théoriquement d'assurer un niveau de preuve suffisant.

Pourtant, en étudiant la première classification de Banff de 1991, on remarque que les lésions histologiques définies sont globalement les mêmes qu'en 2023 (g, t, i, v, ah, cg, ci, ct, cv), et que les descriptions des rejets TCMR, AMR et la qualification « chronique » de l'AMR ont finalement peu évolué depuis<sup>126</sup> (**Figure 11**). En remontant plus en amont encore, on retrouve la description histologique du premier rejet de greffe rénale mis en évidence en 1953, décrivant un infiltrat interstitiel lymphocytes, un épaississement de la membrane basale glomérulaire, et une nécrose tubulaire aiguë sévère<sup>164</sup>.

**Table 1.** Diagnostic categories for renal allograft biopsies

---

1. Normal
2. Hyperacute rejection (see <b>Definitions</b> )
3. Borderline changes (“very mild acute rejection”) This category is used when no intimal arteritis is present, but only mild or moderate focal mononuclear cell infiltration with foci of mild tubulitis (1 to 4 mononuclear cells/tubular cross section).
4. Acute rejection
Grade I, mild acute rejection Cases with significant interstitial infiltration (> 25% of parenchyma affected) and foci of moderate tubulitis (> 4 mononuclear cells/tubular cross section or group of 10 tubular cells).
Grade II, moderate acute rejection Cases with (A) significant interstitial infiltration and foci of severe tubulitis (> 10 mononuclear cells/tubular cross section) and/or (B) mild or moderate intimal arteritis.
Grade III, severe acute rejection Cases with severe intimal arteritis and/or “transmural” arteritis with fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells. Recent focal infarction and interstitial hemorrhage without other obvious cause are also regarded as evidence for Grade III rejection.
5. Chronic allograft nephropathy (Glomerular and vascular lesions help define type of chronic nephropathy; new-onset arterial fibrous intimal thickening suggests the presence of chronic rejection.)
Grade I — Mild, chronic transplant nephropathy Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy
Grade II — Moderate chronic transplant nephropathy Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy
Grade III — Severe chronic transplant nephropathy Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy and tubular loss
6. Other (changes not considered to be due to rejection, see <b>Table 3</b> )

---

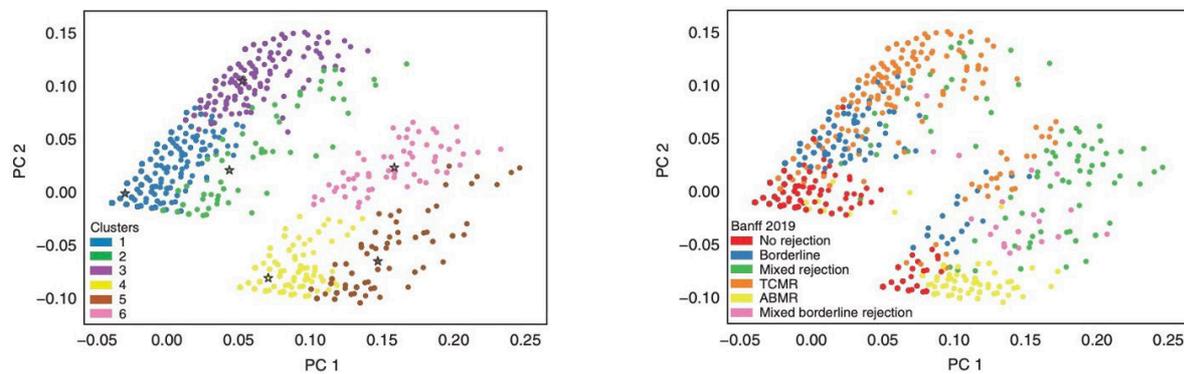
The recommended format of report is a descriptive narrative signout followed by numerical codes in parentheses (see **Table 2**). Categorization should in the first instance be based solely on pathologic changes, then integrated with clinical data as a second step. More than one diagnostic category may be used if appropriate.

*Figure 11 : classification de Banff en 1991. Figure issue de Solez et al<sup>126</sup>.*

Aussi, il apparaît que les évolutions de la classification de Banff correspondent plus à l’accumulation successives de nouvelles couches d’informations sur une base ancienne qu’à une modification en profondeur des critères diagnostic du rejet.

Le rationnel de ces catégories diagnostiques décrites il y a plus de 30 ans peut être questionné. Dans deux études récentes de Vaulet *et al.*<sup>165,166</sup> reprenant plus de 3500 biopsies d’entraînement et 3800 biopsies de validation, les auteurs ont réalisé une méthodologie de *clustering* basé sur le score de Banff, la présence de DSA et la perte de greffon, indépendamment de la catégorie diagnostique définie par le Banff. En se concentrant sur les lésions aiguës (t, i, v, g, ptc, thrombis, dépôts de C4d et DSA), les auteurs ont décrit 6 clusters matchant partiellement avec ceux définis par le Banff. Pour certains de ces clusters, une forte association avec les groupes définis par le Banff était retrouvée. Par exemple un des clusters est composé de biopsies optiquement subnormales et ayant un bon pronostic. Dans ce cluster, on retrouvait plus de 90% des biopsies dites normales d’après la classification de Banff et 80% des biopsies dites « borderline pour le rejet cellulaire », renforçant le rationnel des catégories du Banff. *A contrario*, les AMR définis par le Banff étaient répartis équitablement en deux clusters : un premier consistant en biopsies DSA+ associées à des lésions mineures (t, g ou ptc scorées 0 ou 1) et de plutôt pronostic, et un cluster DSA+ MVI+ de moins bon pronostic. D’autres clusters ne trouvaient pas de résonance avec une catégorie du Banff, par exemple un cluster fait de biopsies présentant une glomérulite isolée et de bon pronostic. Enfin, près de 10% des biopsies

dites normales par la classification de Banff sont retrouvées dans le cluster numéro 4, dans lequel sont aussi retrouvé 46% des biopsies AMR (Figure 12).



**Table 2.** Contingency tables comparing the Banff 2019 diagnosis and the six clusters derived from semi-supervised learning. Proportions represent the distribution in the clusters per Banff category ( $n=3510$  biopsies)

Banff 2019 Diagnosis	N	Cluster 1 (%)	Cluster 2 (%)	Cluster 3 (%)	Cluster 4 (%)	Cluster 5 (%)	Cluster 6 (%)
No rejection	2659	2387 (89.8)	53 (2.0)	4 (0.2)	215 (8.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
Borderline changes	327	261 (79.8)	9 (2.8)	26 (8.0)	23 (7.0)	0 (0.0)	8 (2.4)
TCMR	285	48 (16.8)	25 (8.8)	184 (64.6)	5 (1.8)	0 (0.0)	23 (8.1)
ABMR	122	8 (6.6)	4 (3.3)	0 (0.0)	56 (45.9)	53 (43.4)	1 (0.8)
Mixed borderline rejection	27	1 (3.7)	3(11.1)	1 (3.7)	3 (11.1)	15 (55.6)	4 (14.8)
Mixed rejection	90	5 (5.6)	7 (7.8)	16 (17.8)	5 (5.6)	27 (30.0)	30 (33.3)
Total	3510	2710 (77.2)	101 (2.9)	231 (6.6)	307 (8.7)	95 (2.7)	66 (1.9)

Figure 12 : représentation de l'analyse en composante principale, calculée à partir des lésions histologiques et de la présence de DSA, indépendamment des catégories diagnostiques définies par les recommandations de Banff et de la survie des greffons, superposée au clustering semi-supervisé (haut, gauche) et au catégories diagnostiques définies par la classification de Banff de 2019 (haut, droite). Le tableau décrit la distribution des biopsies classées selon le Banff au sein des clusters.

Du fait des limites de l'évaluation histologique, de la classification de Banff, et des différences mises en évidence dans les études de Vaulet *et al.* entre classification diagnostique selon le Banff et classification selon les données histologiques, DSA et survie de greffon, on peut questionner le rationnel d'appliquer les outils de biologie moléculaire à des groupes de biopsies définis par le Banff. En effet, les études actuelles visent à phénotyper ces catégories diagnostiques, permettant d'associer à chacune d'entre elle une signature moléculaire. Ceci pourrait donc se heurter à deux questions : phénotyper un groupe diagnostique du Banff comme l'AMR, sans subdiviser selon des groupes décrits (AMR précoce *versus* tardif, chronique ou non, infra clinique ou avec insuffisance rénale, DSA *de novo* ou préformé...) permet-il de dépendre correctement un tableau moléculaire, et comment réagir face à une discordance entre diagnostic histologique et diagnostic moléculaire ?

Le groupe d'Alerta a rapporté qu'au sein d'une cohorte prospective de 1 679 biopsies, les résultats histologiques et les résultats du MMDx étaient discordants dans 37% des cas<sup>167</sup>. Dans cette étude, il n'y a pas de conclusions précises sur les raisons de ces discordances, mais on peut suspecter que le diagnostic histologique, actuel gold-standard, soit mis en défaut.

Plusieurs études ont pointé des situations de discordances entre diagnostic histologique et moléculaire, en faveur du diagnostic moléculaire.

Tout d'abord le deuxième article de cette thèse, où des biopsies suspectes d'AMR mais classée *stricto-sensu* en contrôle d'après le Banff présentaient une signature moléculaire d'AMR, avec une survie greffon en faveur d'un processus humoral et non d'un contrôle.

Dans la catégorie « dépôts de C4d sans signes de rejet », Dominy *et al.* ont mis en évidence une positivité du signal moléculaire pour l'AMR dans près de 20% des biopsies, avec une moindre survie sans AMR et un odd ratio de 16.3 (1,3-210,6),  $p = 0.03$ , pour la survenue ultérieure d'un AMR<sup>168</sup>.

Concernant les biopsies « borderline for TCMR », il a été montré que 40% de ces biopsies présentaient un signal moléculaire de rejet (TCMR, AMR ou mixte) d'après le MMDx, sans analyse de survie réalisée<sup>169</sup>.

Enfin, isolant les biopsies présentant de l'inflammation dans les zones d'atrophie tubulaire et de fibrose (i-IFTA), 36% de ces biopsies répondaient aux critères histologiques d'AMR, proportion augmentant à 56% en utilisant le MMDx<sup>170</sup>.

Des incertitudes existent donc quant au diagnostic final lorsque l'histologie et l'évaluation moléculaire sont discordants. Pourtant, ce sont les situations dans lesquelles le diagnostic moléculaire serait le plus rentable, puisque pour les cas concordants, le diagnostic moléculaire dans sa forme actuelle (diagnostique et non pronostique) n'aurait pas de valeur ajoutée.

Il faut mentionner un dernier obstacle à l'implémentation des outils de biologie moléculaire en pratique clinique. Il est supposé que ces outils permettront d'améliorer le diagnostic, principalement du rejet, des patients transplantés rénaux. Cependant, les traitements actuels du rejet, en particulier l'AMR, sont décevants avec une survie du greffon médiocre<sup>171</sup>. On peut supposer que les difficultés à mettre en évidence un traitement efficace du rejet humoral peuvent être dues en partie à l'hétérogénéité des biopsies au sein d'une catégorie définie par le Banff. Aussi, le diagnostic moléculaire pourrait affiner le diagnostic du rejet humoral, identifiant des voies physiopathologiques précises pouvant être ciblées par des thérapeutiques particulières. Néanmoins il n'existe pas à ce jour d'essai clinique guidé par l'outil moléculaire

permettant d'évaluer si l'ajout de cette modalité diagnostique impacte *in fine* la survie du greffon rénal.

Au total, le diagnostic moléculaire offre de nouvelles perspectives dans le diagnostic du rejet de greffe rénale, que ce soit dans le cadre de la description de voies physiopathologiques, ou alors dans la prise en charge des patients transplantés rénaux. Néanmoins, le développement de ces outils n'est que récent, et leur utilisation est encore limitée. De ce fait, la place et l'impact de ces nouveaux outils en clinique ne sont pas encore connus. A travers cette thèse, nous avons voulu développer un test compatible avec la pratique clinique et apporter des éléments de réponse quant au bénéfice d'implémenter un tel outil en routine. Sur la base de ces résultats, il semble possible pour un centre de transplantation rénale de se doter d'un outil de biologie moléculaire afin de diagnostiquer une proportion de rejets non diagnostiqués par les techniques histologiques standards. Il reste à analyser l'impact de l'utilisation de ces outils à une plus large échelle et de manière prospective, et à déterminer si le diagnostic de rejet *via* l'utilisation d'outils moléculaire modifie la prise en charge et à terme la survie du greffon.

## 6 Conclusions

Le rejet de greffe, en particulier humoral, reste la première cause de perte de greffon rénaux en 2023, pourtant, les mécanismes immunologiques responsables ces rejets sont mal compris, et les modalités diagnostiques du rejet souffrent de différentes limites

L'étude des cellules effectrices d'une partie de ces rejets, les lymphocytes B mémoires, se heurte à des difficultés techniques du fait de leur faible fréquence dans la circulation périphérique. En utilisant une technique de séquençage en cellules uniques, nous avons pu isoler des lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques chez des patients immunisés en attente de transplantation d'organe. L'étude phénotypique et transcriptomique de ces cellules ainsi que le séquençage du BCR devraient permettre d'étudier l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelles de ces cellules, déjà rapportée dans le champ des maladies infectieuses, mais non encore explorée dans le cadre de l'allo-réactivité. Ces résultats devraient aider à mieux rendre compte du risque immunologique individuel.

Dans la seconde partie de ces travaux, un test de diagnostic moléculaire utilisable en routine a été mis en place. Ces outils, pourtant recommandés par le consortium de Banff, ne sont pas utilisés en pratique clinique, du fait entre autres de leur complexité d'utilisation. En développant un outil de diagnostic moléculaire revêtant des caractéristiques compatibles avec son implémentation en pratique clinique, nous avons visé à améliorer les modalités diagnostiques du rejet, en particulier humoral. Dans un second temps, nous avons montré que ces outils ont un intérêt en pratique clinique, puisqu'ils permettent de mettre en évidence une certaine proportion de rejets non diagnostiqués par les techniques usuelle de néphropathologie.

Ce travail devrait ainsi contribuer à un raffinement de la stratification du risque immunologique des patients en attente de transplantation rénale, et à une amélioration du diagnostic du rejet.

## 7 Références

1. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, et al.: Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant* 11: 2093–2109, 2011
2. Rose C, Gill J, Gill JS: Association of Kidney Transplantation with Survival in Patients with Long Dialysis Exposure. *Clin J Am Soc Nephrol* 12: 2024–2031, 2017
3. Agence de la biomédecine [Internet]. Available from: <https://rams.agence-biomedecine.fr/greffe-renale> [cited 2020 Jan 27]
4. Cooper JE: Evaluation and Treatment of Acute Rejection in Kidney Allografts. *Clin J Am Soc Nephrol* 15: 430–438, 2020
5. Coemans M, Süsal C, Döhler B, Anglicheau D, Giral M, Bestard O, et al.: Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int* 94: 964–973, 2018
6. Sellarés J, Freitas DG de, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al.: Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence. *Am J Transplant* 12: 388–399, 2012
7. Van Loon E, Senev A, Lerut E, Coemans M, Callemeyn J, Van Keer JM, et al.: Assessing the Complex Causes of Kidney Allograft Loss. *Transplantation* 104: 2557–2566, 2020
8. Mayrdorfer M, Liefeldt L, Wu K, Rudolph B, Zhang Q, Friedersdorff F, et al.: Exploring the Complexity of Death-Censored Kidney Allograft Failure. *J Am Soc Nephrol* 32: 1513–1526, 2021
9. Dausset J: [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 20: 156–166, 1958
10. Zinkernagel RM, Doherty PC: The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 18: 14–17, 1997
11. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI: Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant* 13: 10.1097/MOT.0b013e328309ee31, 2008
12. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA: Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 166: 973–981, 2001
13. Archbold JK, Macdonald WA, Miles JJ, Brennan RM, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, et al.: Alloreactivity between disparate cognate and allogeneic pMHC-I complexes is the

result of highly focused, peptide-dependent structural mimicry. *J Biol Chem* 281: 34324–34332, 2006

14. Whitelegg AME, Oosten LEM, Jordan S, Kester M, van Halteren AGS, Madrigal JA, et al.: Investigation of peptide involvement in T cell allorecognition using recombinant HLA class I multimers. *J Immunol* 175: 1706–1714, 2005
15. Son ET, Faridi P, Paul-Heng M, Leong ML, English K, Ramarathinam SH, et al.: The self-peptide repertoire plays a critical role in transplant tolerance induction. *J Clin Invest* 131: e146771, 2021
16. Carnel N, Lancia HH, Guinier C, Benichou G: Pathways of Antigen Recognition by T Cells in Allograft Rejection. *Transplantation* 107: 827–837, 2023
17. Charmetant X, Chen C-C, Hamada S, Goncalves D, Saison C, Rabeyrin M, et al.: Inverted direct allorecognition triggers early donor-specific antibody responses after transplantation. *Sci Transl Med* 14: eabg1046, 2022
18. DeWolf S, Sykes M: Alloimmune T cells in transplantation. *J Clin Invest* 127: 2473–2481, 2017
19. Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM, Anderson SK: Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol* 14: 1336–1348, 2003
20. Lahat N, Bitterman H, Weiss-Cerem L, Rahat MA: Hypoxia increases membranous and secreted HLA-DR in endothelial cells, rendering them T-cell activators. *Transpl Int* 24: 1018–1026, 2011
21. Bailey A, Dalchau N, Carter R, Emmott S, Phillips A, Werner JM, et al.: Selector function of MHC I molecules is determined by protein plasticity. *Sci Rep* 5: 14928, 2015
22. Traherne JA: Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet* 35: 179–192, 2008
23. Iversen R, Sollid LM: The Immunobiology and Pathogenesis of Celiac Disease. *Annu Rev Pathol* 18: 47–70, 2023
24. Duquesnoy RJ: HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol* 63: 339–352, 2002
25. Duquesnoy RJ: Antibody-reactive epitope determination with HLAMatchmaker and its clinical applications. *Tissue Antigens* 77: 525–534, 2011
26. Saleem N, Das R, Tambur AR: Molecular histocompatibility beyond Tears: The next generation version. *Hum Immunol* 83: 233–240, 2022

27. Tambur AR, Das R: Can We Use Eplets (or Molecular) Mismatch Load Analysis to Improve Organ Allocation? The Hope and the Hype. *Transplantation* 107: 605–615, 2023
28. Felix NJ, Allen PM: Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol* 7: 942–953, 2007
29. Brooks CL, Blackler RJ, Sixta G, Kosma P, Müller-Loennies S, Brade L, et al.: The role of CDR H3 in antibody recognition of a synthetic analog of a lipopolysaccharide antigen. *Glycobiology* 20: 138–147, 2010
30. Finlay WJJ, Almagro JC: Natural and man-made V-gene repertoires for antibody discovery. *Front Immunol* 3: 342, 2012
31. Akkaya M, Kwak K, Pierce SK: B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* 20: 229–238, 2020
32. Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, Förster R: Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics. *Annu Rev Immunol* 34: 203–242, 2016
33. Cyster JG, Allen CDC: B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* 177: 524–540, 2019
34. Laguna-Goya R, Suárez-Fernández P, Paz-Artal E: Follicular helper T cells and humoral response in organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 33: 183–190, 2019
35. Crotty S: T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50: 1132–1148, 2019
36. Kurosaki T, Kometani K, Ise W: Memory B cells. *Nat Rev Immunol* 15: 149–159, 2015
37. Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T: Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol Rev* 283: 138–149, 2018
38. Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R: Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* 203: 1081–1091, 2006
39. Taylor JJ, Pape KA, Steach HR, Jenkins MK: Humoral immunity. Apoptosis and antigen affinity limit effector cell differentiation of a single naïve B cell. *Science* 347: 784–787, 2015
40. Yam-Puc JC, Zhang L, Maqueda-Alfaro RA, Garcia-Ibanez L, Zhang Y, Davies J, et al.: Enhanced BCR signaling inflicts early plasmablast and germinal center B cell death. *iScience* 24: 102038, 2021

41. MacLennan ICM, Toellner K-M, Cunningham AF, Serre K, Sze DM-Y, Zúñiga E, et al.: Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194: 8–18, 2003
42. Taylor JJ, Pape KA, Jenkins MK: A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J Exp Med* 209: 597–606, 2012
43. Dal Porto JM, Haberman AM, Kelsoe G, Shlomchik MJ: Very low affinity B cells form germinal centers, become memory B cells, and participate in secondary immune responses when higher affinity competition is reduced. *J Exp Med* 195: 1215–1221, 2002
44. Khalil AM, Cambier JC, Shlomchik MJ: B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science* 336: 1178–1181, 2012
45. De Silva NS, Klein U: Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* 15: 137–148, 2015
46. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM: The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15: 160–171, 2015
47. Roco JA, Mesin L, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, et al.: Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* 51: 337-350.e7, 2019
48. Zheng B, Yang Y, Chen L, Wu M, Zhou S: B-cell receptor repertoire sequencing: Deeper digging into the mechanisms and clinical aspects of immune-mediated diseases. *iScience* 25: 105002, 2022
49. Baumjohann D, Fazilleau N: Antigen-dependent multistep differentiation of T follicular helper cells and its role in SARS-CoV-2 infection and vaccination. *European Journal of Immunology* 51: 1325–1333, 2021
50. Weisel FJ, Zuccarino-Catania GV, Chikina M, Shlomchik MJ: A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* 44: 116–130, 2016
51. Andrade P, Gimblet-Ochieng C, Modirian F, Collins M, Cárdenas M, Katzelnick LC, et al.: Impact of pre-existing dengue immunity on human antibody and memory B cell responses to Zika. *Nat Commun* 10: 938, 2019
52. Lindner C, Thomsen I, Wahl B, Ugur M, Sethi MK, Friedrichsen M, et al.: Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat Immunol* 16: 880–888, 2015
53. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Mégret J, Storck S, et al.: Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 10: 1292–1299, 2009

54. Lam WY, Bhattacharya D: Metabolic Links between Plasma Cell Survival, Secretion, and Stress. *Trends Immunol* 39: 19–27, 2018
55. Perry DK, Pollinger HS, Burns JM, Rea D, Ramos E, Platt JL, et al.: Two novel assays of alloantibody-secreting cells demonstrating resistance to desensitization with IVIG and rATG. *Am J Transplant* 8: 133–143, 2008
56. Kwun J, Matignon M, Manook M, Guendouz S, Audard V, Kheav D, et al.: Daratumumab in Sensitized Kidney Transplantation: Potentials and Limitations of Experimental and Clinical Use. *J Am Soc Nephrol* 30: 1206–1219, 2019
57. de Nattes T, Kaveri R, Farce F, François A, Guerrot D, Hanoy M, et al.: Daratumumab for antibody-mediated rejection: Is it time to target the real culprit? *Am J Transplant* S1600-6135(23)00549-X, 2023
58. Lavinder JJ, Horton AP, Georgiou G, Ippolito GC: Next-generation sequencing and protein mass spectrometry for the comprehensive analysis of human cellular and serum antibody repertoires. *Curr Opin Chem Biol* 24: 112–120, 2015
59. Kwun J, Manook M, Page E, Burghuber C, Hong J, Knechtle SJ: Crosstalk Between T and B Cells in the Germinal Center After Transplantation. *Transplantation* 101: 704–712, 2017
60. Filippone EJ, Farber JL: The Implications of B-lineage Cells in Kidney Allografts. *Transplantation* 104: 2011, 2020
61. Zhang H, Cavazzoni CB, Hanson BL, Bechu ED, Podestà MA, Azzi J, et al.: Transcriptionally Distinct B Cells Infiltrate Allografts After Kidney Transplantation. *Transplantation* 107: e47–e57, 2023
62. Abbott RK, Lee JH, Menis S, Skog P, Rossi M, Ota T, et al.: Precursor Frequency and Affinity Determine B Cell Competitive Fitness in Germinal Centers, Tested with Germline-Targeting HIV Vaccine Immunogens. *Immunity* 48: 133-146.e6, 2018
63. Wu Y, Przysiecki C, Flanagan E, Bello-Irizarry SN, Ionescu R, Muratova O, et al.: Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18243–18248, 2006
64. Akkaya M, Akkaya B, Kim AS, Miozzo P, Sohn H, Pena M, et al.: Toll-like receptor 9 antagonizes antibody affinity maturation. *Nat Immunol* 19: 255–266, 2018
65. Kato Y, Abbott RK, Freeman BL, Haupt S, Groschel B, Silva M, et al.: Multifaceted Effects of Antigen Valency on B Cell Response Composition and Differentiation In Vivo. *Immunity* 53: 548-563.e8, 2020

66. Kearney JF, Patel P, Stefanov EK, King RG: Natural antibody repertoires: development and functional role in inhibiting allergic airway disease. *Annu Rev Immunol* 33: 475–504, 2015
67. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J: “Natural” human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 86: 1111–1115, 2008
68. Sicard A, Amrouche L, Suberbielle C, Carmagnat M, Candon S, Thervet E, et al.: Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology. *Am J Transplant* 14: 193–201, 2014
69. Duquesnoy RJ: Human leukocyte antigen epitope antigenicity and immunogenicity. *Curr Opin Organ Transplant* 19: 428–435, 2014
70. Gao B, Rong C, Porcheray F, Moore C, Girouard TC, Saidman SL, et al.: Evidence to support a contribution of polyreactive antibodies to HLA serum reactivity. *Transplantation* 100: 217–226, 2016
71. Zorn E, See SB: Polyreactive natural antibodies in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 22: 8–13, 2017
72. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, Jacquelinet C, Audry B, Nong T, et al.: Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. *Transplantation* 98: 738–744, 2014
73. van den Broek DAJ, Meziyerh S, Budde K, Lefaucheur C, Cozzi E, Bertrand D, et al.: The Clinical Utility of Post-Transplant Monitoring of Donor-Specific Antibodies in Stable Renal Transplant Recipients: A Consensus Report With Guideline Statements for Clinical Practice. *Transpl Int* 36: 11321, 2023
74. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, Saji H, et al.: Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 70: 844–853, 2009
75. Zachary AA, Lucas DP, Detrick B, Leffell MS: Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum Immunol* 70: 496–501, 2009
76. Reed EF, Rao P, Zhang Z, Gebel H, Bray RA, Guleria I, et al.: Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for the detection of antibodies to HLA. *Am J Transplant* 13: 1859–1870, 2013
77. Gandhi MJ, Degeoey S, Falbo D, Jenkins S, Stubbs JR, Noreen H, et al.: Inter and intra laboratory concordance of HLA antibody results obtained by single antigen bead based assay. *Hum Immunol* 74: 310–317, 2013

78. Ravindranath MH, Terasaki PI, Pham T, Jucaud V, Kawakita S: Therapeutic preparations of IVIg contain naturally occurring anti-HLA-E antibodies that react with HLA-Ia (HLA-A/-B/-Cw) alleles. *Blood* 121: 2013–2028, 2013
79. Weinstock C, Schnaidt M: 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, 2013
80. Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, et al.: Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. *Am J Transplant* 13: 2075–2082, 2013
81. Snanoudj R, Claas FHJ, Heidt S, Legendre C, Chatenoud L, Candon S: Restricted specificity of peripheral alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant. *Kidney Int* 87: 1230–1240, 2015
82. Zhang R: Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 13: 182–192, 2018
83. Suzuki M, Ishida H, Komatsu T, Kennoki T, Ishizuka T, Tanabe K: Kidney transplantation in a recipient with anti-HLA antibody IgM positive. *Transpl Immunol* 21: 150–154, 2009
84. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Briley KP, Bolin P, Kendrick WT, et al.: Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. *Transplantation* 97: 494–501, 2014
85. Bentall A, Tyan DB, Sequeira F, Everly MJ, Gandhi MJ, Cornell LD, et al.: Antibody-mediated rejection despite inhibition of terminal complement. *Transpl Int* 27: 1235–1243, 2014
86. Babu A, Andreou A, Briggs D, Krishnan N, Higgins R, Mitchell D, et al.: Clinical Relevance of Donor-Specific IgM Antibodies in HLA Incompatible Renal Transplantation: A Retrospective Single-Center Study. *Clin Transpl* 32: 173–179, 2016
87. Everly MJ, Roberts M, Townsend R, Bray RA, Gebel HM: Comparison of de novo IgM and IgG anti-HLA DSAs between belatacept- and calcineurin-treated patients: An analysis of the BENEFIT and BENEFIT-EXT trial cohorts. *Am J Transplant* 18: 2305–2313, 2018
88. Li F, Gragert L, Giovanni Biagini D, Patel JK, Kobashigawa JA, Trück J, et al.: IgM Marks Persistent IgG Anti-Human Leukocyte Antigen Antibodies in Highly Sensitized Heart Transplant Patients. *J Heart Lung Transplant* S1053-2498(23)02055–7, 2023
89. Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, et al.: Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 205: 1797–1805, 2008

90. Kardava L, Moir S, Wang W, Ho J, Buckner CM, Posada JG, et al.: Attenuation of HIV-associated human B cell exhaustion by siRNA downregulation of inhibitory receptors. *J Clin Invest* 121: 2614–2624, 2011
91. Kardava L, Moir S, Shah N, Wang W, Wilson R, Buckner CM, et al.: Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals. *J Clin Invest* 124: 3252–3262, 2014
92. Luque S, Lúcia M, Bestard O: Refinement of humoral immune monitoring in kidney transplantation: the role of “hidden” alloreactive memory B cells. *Transpl Int* 30: 955–968, 2017
93. Zarkhin V, Kambham N, Li L, Kwok S, Hsieh S-C, Salvatierra O, et al.: Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int* 74: 664–673, 2008
94. van de Berg PJEJ, Hoevenaars EC, Yong S-L, van Donselaar-van der Pant KAMI, van Tellingen A, Florquin S, et al.: Circulating lymphocyte subsets in different clinical situations after renal transplantation. *Immunology* 136: 198–207, 2012
95. Longshan L, Dongwei L, Qian F, Jun L, Suxiong D, Yitao Z, et al.: Dynamic analysis of B-cell subsets in de novo living related kidney transplantation with induction therapy of basiliximab. *Transplant Proc* 46: 363–367, 2014
96. Han M, Rogers JA, Lavingia B, Stastny P: Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro. *Hum Immunol* 70: 29–34, 2009
97. Heidt S, Roelen DL, de Vaal YJH, Kester MGD, Eijssink C, Thomas S, et al.: A NOVEL ELISPOT assay to quantify HLA-specific B cells in HLA-immunized individuals. *Am J Transplant* 12: 1469–1478, 2012
98. Karahan GE, de Vaal YJH, Roelen DL, Buchli R, Claas FHJ, Heidt S: Quantification of HLA class II-specific memory B cells in HLA-sensitized individuals. *Hum Immunol* 76: 129–136, 2015
99. Luque S, Lúcia M, Crespo E, Jarque M, Grinyó JM, Bestard O: A multicolour HLA-specific B-cell FluoroSpot assay to functionally track circulating HLA-specific memory B cells. *J Immunol Methods* 462: 23–33, 2018
100. Lúcia M, Luque S, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Martorell J, et al.: Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int* 88: 874–887, 2015
101. Luque S, Lúcia M, Melilli E, Lefaucheur C, Crespo M, Loupy A, et al.: Value of monitoring circulating donor-reactive memory B cells to characterize antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 19: 368–380, 2019

102. Wehmeier C, Karahan GE, Krop J, de Vaal Y, Langerak-Langerak J, Binet I, et al.: Donor-specific B Cell Memory in Alloimmunized Kidney Transplant Recipients: First Clinical Application of a Novel Method. *Transplantation* 104: 1026–1032, 2020
103. Chen C-C, Pouliquen E, Broisat A, Andreato F, Racapé M, Bruneval P, et al.: Endothelial chimerism and vascular sequestration protect pancreatic islet grafts from antibody-mediated rejection. *J Clin Invest* 128: 219–232, 2018
104. Cross AR, Glotz D, Mooney N: The Role of the Endothelium during Antibody-Mediated Rejection: From Victim to Accomplice. *Front Immunol* 9: 106, 2018
105. Delpire B, Van Loon E, Naesens M: The Role of Fc Gamma Receptors in Antibody-Mediated Rejection of Kidney Transplants. *Transpl Int* 35: 10465, 2022
106. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen J-P, Vernerey D, Aubert O, et al.: IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol* 27: 293–304, 2016
107. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thaunat O, Naesens M: Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int* 101: 692–710, 2022
108. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al.: Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 14: 272–283, 2014
109. Haas M, Mirocha J: Early ultrastructural changes in renal allografts: correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 11: 2123–2131, 2011
110. 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* 9: 2312–2323, 2009
111. Sapir-Pichhadze R, Curran SP, John R, Tricco AC, Uleryk E, Laupacis A, et al.: A systematic review of the role of C4d in the diagnosis of acute antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 87: 182–194, 2015
112. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al.: The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant* 17: 28–41, 2017
113. Dragun D, Catar R, Philippe A: Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. *Kidney Int* 90: 280–288, 2016
114. Mesnard L, Muthukumar T, Burbach M, Li C, Shang H, Dadhania D, et al.: Exome Sequencing and Prediction of Long-Term Kidney Allograft Function. *PLoS Comput Biol* 12: e1005088, 2016

115. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Kainz A, van Setten J, Jelencsics K, Hu K, et al.: Contribution of non-HLA incompatibility between donor and recipient to kidney allograft survival: genome-wide analysis in a prospective cohort. *Lancet* 393: 910–917, 2019
116. Delville M, Lamarthée B, Pagie S, See SB, Rabant M, Burger C, et al.: Early Acute Microvascular Kidney Transplant Rejection in the Absence of Anti-HLA Antibodies Is Associated with Preformed IgG Antibodies against Diverse Glomerular Endothelial Cell Antigens. *J Am Soc Nephrol* 30: 692–709, 2019
117. Sicard A, Meas-Yedid V, Rabeyrin M, Koenig A, Ducreux S, Dijoud F, et al.: Computer-assisted topological analysis of renal allograft inflammation adds to risk evaluation at diagnosis of humoral rejection. *Kidney Int* 92: 214–226, 2017
118. Koenig A, Chen C-C, Marçais A, Barba T, Mathias V, Sicard A, et al.: Missing self triggers NK cell-mediated chronic vascular rejection of solid organ transplants. *Nat Commun* 10: 5350, 2019
119. Koenig A, Mezaache S, Callemeyn J, Barba T, Mathias V, Sicard A, et al.: Missing Self-Induced Activation of NK Cells Combines with Non-Complement-Fixing Donor-Specific Antibodies to Accelerate Kidney Transplant Loss in Chronic Antibody-Mediated Rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* ASN.2020040433, 2020
120. Callemeyn J, Senev A, Coemans M, Lerut E, Sprangers B, Kuypers D, et al.: Missing Self-Induced Microvascular Rejection of Kidney Allografts: A Population-Based Study. *J Am Soc Nephrol* 32: 2070–2082, 2021
121. Morvan MG, Lanier LL: NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 16: 7–19, 2016
122. Senev A, Coemans M, Lerut E, Van Sandt V, Daniëls L, Kuypers D, et al.: Histological picture of antibody-mediated rejection without donor-specific anti-HLA antibodies: Clinical presentation and implications for outcome. *Am J Transplant* 19: 763–780, 2019
123. Lebraud E, Eloudzeri M, Rabant M, Lamarthée B, Anglicheau D: Microvascular Inflammation of the Renal Allograft: A Reappraisal of the Underlying Mechanisms. *Front Immunol* 13: 864730, 2022
124. Haas M, Mirocha J, Huang E, Najjar R, Peng A, Sethi S, et al.: A Banff-based histologic chronicity index is associated with graft loss in patients with a kidney transplant and antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 103: 187–195, 2023
125. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, et al.: A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* 102: 1795–1814, 2018
126. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al.: International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft

- rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 44: 411–422, 1993
127. Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, et al.: The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant.* 2020
  128. Furness PN, Taub N: International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: Report of the CERTPAP Project1. *Kidney International* 60: 1998–2012, 2001
  129. Mengel M, Chan S, Climenhaga J, Kushner YB, Regele H, Colvin RB, et al.: Banff initiative for quality assurance in transplantation (BIFQUIT): reproducibility of C4d immunohistochemistry in kidney allografts. *Am J Transplant* 13: 1235–1245, 2013
  130. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen J-P, Suberbielle C, Anglicheau D, et al.: Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet* 381: 313–319, 2013
  131. Callemeyn J, Ameye H, Lerut E, Senev A, Coemans M, Van Loon E, et al.: Revisiting the changes in the Banff classification for antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 21: 2413–2423, 2021
  132. Yoo D, Goutaudier V, Divard G, Gueguen J, Astor BC, Aubert O, et al.: An automated histological classification system for precision diagnostics of kidney allografts. *Nat Med* 29: 1211–1220, 2023
  133. Toulza F, Dominy K, Cook T, Galliford J, Beadle J, McLean A, et al.: Technical considerations when designing a gene expression panel for renal transplant diagnosis. *Sci Rep* 10: 17909, 2020
  134. Einecke G, Reeve J, Mengel M, Sis B, Bunnag S, Mueller TF, et al.: Expression of B cell and immunoglobulin transcripts is a feature of inflammation in late allografts. *Am. J. Transplant.* 8: 1434–1443, 2008
  135. Halloran PF, Venner JM, Madill-Thomsen KS, Einecke G, Parkes MD, Hidalgo LG, et al.: Review: The transcripts associated with organ allograft rejection. *Am J Transplant* 18: 785–795, 2018
  136. Halloran PF, Venner JM, Famulski KS: Comprehensive Analysis of Transcript Changes Associated With Allograft Rejection: Combining Universal and Selective Features. *Am. J. Transplant.* 17: 1754–1769, 2017
  137. Halloran PF, Madill-Thomsen KS, Reeve J: The Molecular Phenotype of Kidney Transplants: Insights From the MMDx Project. *Transplantation* 2023

138. Reeve J, Böhmig GA, Eskandary F, Einecke G, Lefaucheur C, Loupy A, et al.: Assessing rejection-related disease in kidney transplant biopsies based on archetypal analysis of molecular phenotypes. *JCI Insight* 2: 2017
139. Sellarés J, Reeve J, Loupy A, Mengel M, Sis B, Skene A, et al.: Molecular Diagnosis of Antibody-Mediated Rejection in Human Kidney Transplants. *Am J Transplant* 13: 971–983, 2013
140. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, Matas A, Picton M, De Freitas D, et al.: Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *Am J Transplant* 13: 2865–2874, 2013
141. Callemeyn J, Lerut E, de Loor H, Arijs I, Thauinat O, Koenig A, et al.: Transcriptional Changes in Kidney Allografts with Histology of Antibody-Mediated Rejection without Anti-HLA Donor-Specific Antibodies. *J Am Soc Nephrol* 31: 2168–2183, 2020
142. Halloran PF, Famulski KS, Reeve J: Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. *Nat Rev Nephrol* 12: 534–548, 2016
143. Mengel M, Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Akalin E, et al.: Banff 2019 Meeting Report: Molecular diagnostics in solid organ transplantation—Consensus for the Banff Human Organ Transplant (B-HOT) gene panel and open source multicenter validation. *Am J Transplant* 20: 2305–2317, 2020
144. Schinstock CA, Askar M, Bagnasco SM, Batal I, Bow L, Budde K, et al.: A 2020 Banff Antibody-mediated Injury Working Group examination of international practices for diagnosing antibody-mediated rejection in kidney transplantation - a cohort study. *Transpl Int* 34: 488–498, 2021
145. Mulder A, Eijnsink C, Kardol MJ, Franke-van Dijk MEI, van der Burg SH, Kester M, et al.: Identification, isolation, and culture of HLA-A2-specific B lymphocytes using MHC class I tetramers. *J Immunol* 171: 6599–6603, 2003
146. Burton H, McLaughlin L, Shiu KY, Shaw O, Mamode N, Spencer J, et al.: The phenotype of HLA-binding B cells from sensitized kidney transplant recipients correlates with clinically prognostic patterns of interferon- $\gamma$  production against purified HLA proteins. *Kidney Int* 102: 355–369, 2022
147. Newell KL, Waldran MJ, Thomas SJ, Endy TP, Waickman AT: Simultaneous analysis of antigen-specific B and T cells after SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cytometry A* 101: 474–482, 2022
148. Hammond EM, Olsen KJ, Ram S, Tran GVV, Hall LS, Bradley JE, et al.: Antigen-Specific CD4 T Cell and B Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 211: 994–1005, 2023

149. Kervella D, Torija A, Zúñiga JM, Bestard O: How to measure human leukocyte antigen-specific B cells. *Curr Opin Organ Transplant* 28: 345–354, 2023
150. Beausang JF, Fan HC, Sit R, Hutchins MU, Jirage K, Curtis R, et al.: B cell repertoires in HLA-sensitized kidney transplant candidates undergoing desensitization therapy. *J Transl Med* 15: 9, 2017
151. Pineda S, Sigdel TK, Liberto JM, Vincenti F, Sirota M, Sarwal MM: Characterizing pre-transplant and post-transplant kidney rejection risk by B cell immune repertoire sequencing. *Nat Commun* 10: 1906, 2019
152. Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, et al.: The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant.* 2020
153. Mengel M, Sis B, Halloran PF: SWOT analysis of Banff: strengths, weaknesses, opportunities and threats of the international Banff consensus process and classification system for renal allograft pathology. *Am J Transplant* 7: 2221–2226, 2007
154. Halloran PF, Madill-Thomsen KS, Pon S, Sikosana MLN, Böhmig GA, Bromberg J, et al.: Molecular diagnosis of ABMR with or without donor-specific antibody in kidney transplant biopsies: Differences in timing and intensity but similar mechanisms and outcomes. *Am J Transplant* 22: 1976–1991, 2022
155. Toulza F, Dominy K, Willicombe M, Beadle J, Santos E, Cook HT, et al.: Diagnostic application of transcripts associated with antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies. *Nephrol Dial Transplant gfab231*, 2021
156. Beadle J, Papadaki A, Toulza F, Santos E, Willicombe M, McLean A, et al.: Application of the Banff Human Organ Transplant Panel to kidney transplant biopsies with features suspicious for antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 104: 526–541, 2023
157. de Nattes T, Beadle J, Toulza F, Candon E, Ruminy P, François A, et al.: A Simple Molecular Tool for the Assessment of Kidney Transplant Biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol* 18: 499–509, 2023
158. Rosales IA, Mahowald GK, Tomaszewski K, Hotta K, Iwahara N, Otsuka T, et al.: Banff Human Organ Transplant Transcripts Correlate with Renal Allograft Pathology and Outcome: Importance of Capillaritis and Subpathologic Rejection. *J Am Soc Nephrol* 33: 2306–2319, 2022
159. Reeve J, Böhmig GA, Eskandary F, Einecke G, Gupta G, Madill-Thomsen K, et al.: Generating automated kidney transplant biopsy reports combining molecular measurements with ensembles of machine learning classifiers. *Am J Transplant* 19: 2719–2731, 2019

160. van Baardwijk M, Cristoferi I, Ju J, Varol H, Minnee RC, Reinders MEJ, et al.: A Decentralized Kidney Transplant Biopsy Classifier for Transplant Rejection Developed Using Genes of the Banff-Human Organ Transplant Panel. *Front Immunol* 13: 841519, 2022
161. Schachtner T, von Moos S, Kokkonen SM, Helmchen B, Gaspert A, Mackova M, et al.: The Molecular Diagnosis Might Be Clinically Useful in Discrepant Kidney Allograft Biopsy Findings: An Analysis of Clinical Outcomes. *Transplantation* 107: 485–494, 2023
162. Cornell LD: Histopathologic Features of Antibody Mediated Rejection: The Banff Classification and Beyond. *Front Immunol* 12: 718122, 2021
163. Yazdani S, Callemeyn J, Gazut S, Lerut E, de Loor H, Wevers M, et al.: Natural killer cell infiltration is discriminative for antibody-mediated rejection and predicts outcome after kidney transplantation. *Kidney International* 95: 188–198, 2019
164. Kreis H, Noël L-H, Legendre C: The first transplant kidney biopsy ever performed. *Am J Transplant* 13: 1367–1368, 2013
165. Vaulet T, Divard G, Thaunat O, Lerut E, Senev A, Aubert O, et al.: Data-driven Derivation and Validation of Novel Phenotypes for Acute Kidney Transplant Rejection using Semi-supervised Clustering. *J Am Soc Nephrol* 32: 1084–1096, 2021
166. Vaulet T, Divard G, Thaunat O, Koshy P, Lerut E, Senev A, et al.: Data-Driven Chronic Allograft Phenotypes: A Novel and Validated Complement for Histologic Assessment of Kidney Transplant Biopsies. *Journal of the American Society of Nephrology* 33: 2026, 2022
167. Madill-Thomsen K, Perkowska-Ptasińska A, Böhmig GA, Eskandary F, Einecke G, Gupta G, et al.: Discrepancy analysis comparing molecular and histology diagnoses in kidney transplant biopsies. *Am J Transplant* 20: 1341–1350, 2020
168. Dominy KM, Willicombe M, Al Johani T, Beckwith H, Goodall D, Brookes P, et al.: Molecular Assessment of C4d-Positive Renal Transplant Biopsies Without Evidence of Rejection. *Kidney Int Rep* 4: 148–158, 2018
169. Hrubá P, Madill-Thomsen K, Mackova M, Klema J, Maluskova J, Voska L, et al.: Molecular patterns of isolated tubulitis differ from tubulitis with interstitial inflammation in early indication biopsies of kidney allografts. *Sci Rep* 10: 22220, 2020
170. Halloran PF, Matas A, Kasiske BL, Madill-Thomsen KS, Mackova M, Famulski KS: Molecular phenotype of kidney transplant indication biopsies with inflammation in scarred areas. *Am J Transplant* 19: 1356–1370, 2019
171. Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, Chong AS, Haas M, Knechtle S, et al.: Recommended Treatment for Antibody-mediated Rejection After Kidney Transplantation: The 2019 Expert Consensus From the Transplantation Society Working Group. *Transplantation* 104: 911–922, 2020

## 8 Annexes

### 8.1 Article “Daratumumab for antibody-mediated rejection: is it time to target the real culprit?”

Cet article rapporte le cas d'une patiente hyper-immunisée avec DSA pré-existants à la transplantation, et illustre l'intérêt potentiel d'une utilisation en pratique courante d'un outil de biologie moléculaire.

Une biopsie protocolaire a été réalisée à 8 jours post-transplantation, classée en non-rejet d'après les recommandations de Banff.

Une seconde biopsie a été réalisée à 3 mois devant une dégradation de fonction, celle-ci présentait les caractéristiques d'un rejet humoral.

Une troisième biopsie a été réalisée après traitement du rejet humoral, avec un phénotype intermédiaire.

Ces trois biopsies ont été rétrospectivement analysées avec le panel de gène développé RT-MLPA. Les deux premières biopsies présentaient un signal moléculaire de rejet humoral, qui n'était plus présent sur la troisième biopsie post-traitement. Si la biologie moléculaire avait été réalisée de manière prospective lors de la première biopsie, celle-ci aurait présenté l'ensemble des critères pour être considérée comme un rejet humoral.



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Transplantation

journal homepage: [www.amjtransplant.org](http://www.amjtransplant.org)

Case Report

## Daratumumab for antibody-mediated rejection: Is it time to target the real culprit?

Tristan de Nattes<sup>1,\*</sup> , Rangolie Kaveri<sup>2</sup>, Fabienne Farce<sup>2</sup>, Arnaud François<sup>3</sup>,  
Dominique Guerrot<sup>4</sup> , Mélanie Hanoy<sup>5</sup>, Charlotte Laurent<sup>5</sup>, Sophie Candon<sup>6</sup> ,  
Dominique Bertrand<sup>5</sup> 

<sup>1</sup> Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, CHU Rouen, Service de Néphrologie, Rouen, France

<sup>2</sup> EFS Hauts de France-Normandie, Service d'Histocompatibilité, Rouen, France

<sup>3</sup> CHU Rouen, Service d'anatomopathologie, Rouen, France

<sup>4</sup> Univ Rouen Normandie, INSERM U1096, CHU Rouen, CIC-CRB 1404, Service de Néphrologie, Rouen, France

<sup>5</sup> CHU Rouen, Service de Néphrologie, Rouen, France

<sup>6</sup> Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, CHU Rouen, Service d'Immunologie et de Biothérapies, Rouen, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

kidney transplantation  
antibody-mediated rejection  
antibody-secreting cells  
immunosuppressive therapy  
daratumumab  
molecular diagnosis

### ABSTRACT

We report the case of a sensitized woman who underwent successful transplantation after a desensitization protocol, with an optically normal 8-day biopsy. At 3 months, she developed active antibody-mediated rejection (AMR) due to preformed donor-specific antibodies. It was decided to treat the patient with daratumumab, an anti-CD38 monoclonal antibody. The mean fluorescence intensity of donor-specific antibodies decreased, pathologic signs of AMR regressed, and kidney function returned to normal. A molecular assessment of biopsies was retrospectively performed. By doing so, regression of the molecular signature of AMR was evidenced between the second and third biopsies. Interestingly, the first biopsy revealed a gene expression profile of AMR, which helped retrospectively classify this biopsy as AMR, illustrating the relevance of molecular phenotyping of biopsy in high-risk situations such as desensitization.

### 1. Case report

We report the case of a 48-year-old woman requiring hemodialysis since 2016. She had 9 pregnancies, leading to the development of anti-human leukocyte antigen (HLA) class I and

class II antibodies, resulting in a calculated panel-reactive antibody status of 100%.

After 5 years on the kidney transplant (KT) waiting list, a desensitization protocol was initiated.<sup>1</sup> Rituximab at 375 mg/m<sup>2</sup> was administered, and 2 weeks later, immunoadsorption was

*Abbreviations:* AMR, antibody-mediated rejection; DSA, donor-specific antibody; KT, kidney transplant; MFI, mean fluorescence intensity; SCr, serum creatinine; POD, postoperative day; TCMR, T cell-mediated rejection.

\* Corresponding author. Univ Rouen Normandie, INSERM U1234, CHU Rouen, Service de Néphrologie, F-76000 Rouen, France.

E-mail address: [tristan.de-nattes@chu-rouen.fr](mailto:tristan.de-nattes@chu-rouen.fr) (T. de Nattes).

<https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.06.018>

Received 6 April 2023; Received in revised form 26 June 2023; Accepted 28 June 2023

Available online xxx

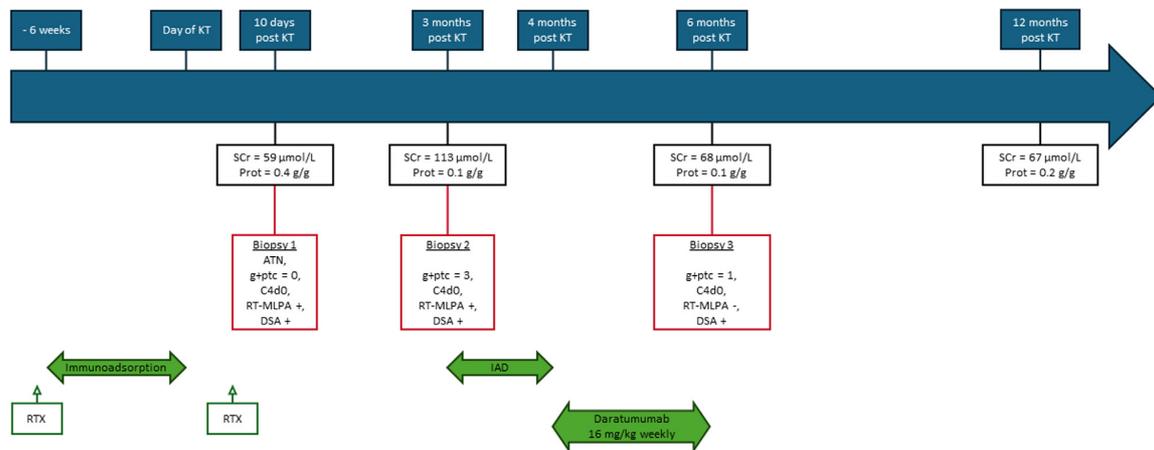
1600-6135/© 2023 American Society of Transplantation & American Society of Transplant Surgeons. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: de Nattes T et al., Daratumumab for antibody-mediated rejection: Is it time to target the real culprit?, American Journal of Transplantation, <https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.06.018>

started (Globaffin, Fresenius; total plasma volume treated, 100 mL/kg per session, 5 sessions a week for 2 weeks, and later 3 sessions weekly until KT, coupled with hemodialysis), without intravenous immunoglobulins, according to local practices.<sup>2</sup> Anti-HLA antibodies were monitored weekly using the Labscreen single antigen bead assay (One Lambda). For each anti-HLA antibody with a mean fluorescence intensity (MFI) of <5000, the corresponding antigen was considered acceptable<sup>3</sup> (Supplementary Material).

Six weeks later, a kidney from a 33-year-old deceased donor was allocated. The panel-reactive antibody calculated on this day decreased to 98%. In serum sampled on the day of KT, 5 donor-specific antibodies (DSAs) were evidenced (Table). T- and B-cell flow cytometric cross-matches were positive in serum collected prior to desensitization therapy (ratio, 1.78 and 4.78, respectively) and on the day of transplantation (ratio, 1.64 and 3.29, respectively) (Supplemental Material). In these sera, complement-dependent cytotoxicity cross-matches were negative. Induction immunosuppressive treatment included 100 g of thymoglobulin from postoperative day (POD) 0 to 5 and pulse corticosteroids (500 mg before surgery and 125 mg on POD 0). The maintenance immunosuppressive regimen was a combination of tacrolimus (trough levels of 8-10 ng/mL), mycophenolate mofetil (1000 mg daily), and corticosteroids (10 mg daily). Rituximab at 375 mg/m<sup>2</sup> was reinfused on POD 6. On day 8, the level of serum creatinine (SCr) reached a plateau at 59 µmol/L, and a protocol KT biopsy was performed. Pathologic examination revealed mild, acute tubular necrosis, without microvascular inflammation; C4d staining was negative; and DSAs were positive, without rebound. No specific treatment was initiated, and the patient was discharged.

Then, kidney function progressively deteriorated to an SCr level of 113 µmol/L, with proteinuria with 0.1 g/g of creatinuria at 3 months. A KT biopsy was performed, which showed glomerulitis (g2) and peritubular capillaritis (ptc1), without C4d staining. DSA were still positive, without de novo DSAs. According to the Banff recommendations, the diagnosis of active antibody-mediated rejection (AMR) was made. The patient was treated with 5 immunoadsorption sessions, and maintenance immunosuppression was similarly maintained.<sup>4</sup> The MFI of DSAs decreased, and immunophenotyping showed no persistent CD19<sup>+</sup> B cells. Considering that the previously administered rituximab did not deplete B-cell subsets that do not express CD20<sup>+</sup>, such as plasmablasts and short-lived or long-lived plasma cells, in the face of DSA secretion persistence, it was decided to treat the patient with daratumumab. Daratumumab at 16 mg/kg was infused weekly, starting 1 week after the last immunoadsorption session, for 7 weeks (the eighth-last infusion was canceled because of concomitant pyelonephritis). Four weeks after the first infusion, B-cell lymphopenia (<5/mm<sup>3</sup>), T-cell lymphopenia (78 CD3<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>), and increased activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were observed. Indeed, 7% of CD4<sup>+</sup> and 41% of CD8<sup>+</sup> T cells expressed the early activation marker CD69 (compared with 1% and 21%, respectively, at baseline), whereas CD25 expression was observed in 54% of CD4<sup>+</sup> and 8% of CD8<sup>+</sup> T cells (versus 40% and 0%, respectively, at baseline). After the last daratumumab infusion, the MFI of DSAs was reduced. At month 6 after KT, the SCr level decreased to 68 µmol/L (Fig. 1), and a new KT biopsy was performed, which showed regression of microvascular inflammation (glomerulitis scored g2, peritubular capillaritis scored ptc1), without arterial intimal thickening or transplant glomerulopathy and with negative C4d staining.



**Figure 1.** Timing of the pretransplant and posttransplant interventions. Rituximab at 375 mg/m<sup>2</sup> was administered 2 weeks before the beginning of immunoabsorption and was reinfused on day 6 after transplantation. Before kidney transplantation, immunoabsorption was performed using Globaffin columns (Fresenius). The total plasma volume treated was 100 mL/kg per session, 5 sessions a week for 2 weeks, and later 3 sessions weekly until kidney transplantation, coupled with hemodialysis. For antibody-mediated rejection treatment, 5 immunoabsorption sessions were performed, and daratumumab at 16 mg/kg was infused weekly for 7 weeks. After treatment, kidney function returned to normal and histologic signs of antibody-mediated rejection regressed. ATN, acute tubular necrosis; DSA, donor-specific antibody; g, glomerulitis; IAD, immunoabsorption; KT, kidney transplantation; Prot, proteinuria (expressed as g/g of creatinuria); ptc, peritubular capillaritis; RT-MLPA, reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification; RTX, rituximab; SCr, serum creatinine.

At that time, our center had developed a molecular assay for the diagnosis of KT rejection using formalin-fixed, paraffin-embedded KT biopsies.<sup>5</sup> The 3 biopsies were retrospectively assessed using this assay. The biopsy performed at month 3 had a gene expression profile of AMR, in line with microscopic examination findings. The biopsy performed after AMR treatment, showing regression of AMR-related lesions, no longer presented a molecular profile of AMR. The first protocol biopsy performed on day 8 had a molecular profile of AMR. Considering optical microscopy findings, anti-HLA DSAs, and this molecular profile, the first protocol biopsy was, therefore, retrospectively considered as active AMR (Fig. 2).<sup>5</sup> This illustrates the relevance of molecular phenotyping of biopsy to provide diagnosis of AMR,<sup>6</sup> especially in high-risk situations such as desensitization.

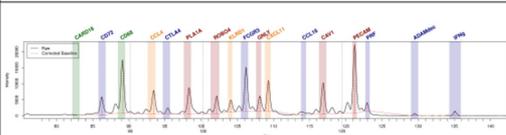
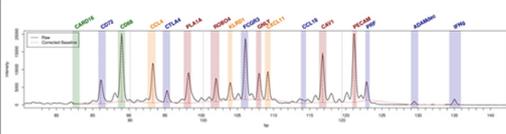
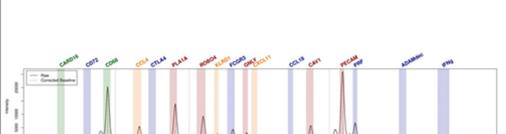
At 12 months after KT, the patient was doing well, with an SCR level of 67  $\mu\text{mol/L}$ .

## 2. Discussion

Consensual treatment of active AMR is based on plasmapheresis, intravenous immunoglobulins, and optional rituximab to remove circulating antibodies and limit their de novo production.<sup>4</sup> However, this strategy may be inefficient to deplete B-cell

subsets responsible for sustained antibody secretion. Indeed, mature B-cell response requires the formation of a germinal center. In this center, differentiation of long-lived plasma cells, which produce high-affinity IgG immunoglobulins, and memory B cells occurs. After antigenic restimulation, memory B cells rapidly differentiate into high-affinity, IgG-secreting, short-lived plasma cells and can generate secondary germinal centers.<sup>7</sup> The membrane phenotypes of these cells influence their sensitivity to therapeutics used in transplantation. Indeed, rituximab targets CD20<sup>+</sup> cells, depleting precursors of antibody-secreting cells, including memory B cells, but does not directly target long-lived plasma cells.

Plasmablasts, plasma cells, and, to a lower extent, memory B cells express the membrane protein CD38. Because CD38 is highly expressed by myeloma cells, it has been proposed as a target in the treatment of myeloma, leading to the development of daratumumab, a human anti-CD38 IgG1k monoclonal antibody. This therapy depletes CD38<sup>+</sup> cells through antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity; complement-dependent cytotoxicity; and apoptosis and is associated with a decrease in antibody levels.<sup>8</sup> Its efficiency in myeloma has been demonstrated, with a higher complete response rate and improvement in progression-free survival, leading to its

Biopsy number	Histologic evidence of acute tissue injury	Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium	Serologic evidence of circulating donor-specific antibodies	Molecular profile	Molecular interpretation	Biopsy interpretation
1	ATN	g + ptc = 0 C4d 0	DSA +		Increased expression of: - NK-related transcripts CCL4, KLRD1, Fcgr3 and granulysin, - Endothelial-related transcripts PLA1A, ROBO4, CAV1 and PECAM, Profile compatible with an antibody mediated rejection.	Biopsy compatible with an active antibody mediated rejection
2	g = 2	g + ptc = 3 C4d 0	DSA +		Similar molecular profile as the first biopsy. Profile compatible with an antibody mediated rejection.	Biopsy compatible with an active antibody mediated rejection
3	g = 1	g + ptc = 1 C4d 0	DSA +		Decrease in the expression of: - NK cells-associated transcripts: CCL4, KLRD1, Fcgr3, granulysin, - Inflammation-related gene CXCL11, Slight decrease in expression of: - monocytes/macrophages-associated genes CD68 and ADAMdec, - Endothelial-associated gene CAV1, Profile compatible with a non-rejection biopsy.	Criteria for antibody mediated rejection not reached

**Figure 2.** Optical microscopy, immunofluorescence, and molecular biology assessment of 3 consecutive kidney transplant biopsies. The reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification assay enables simultaneous evaluation of a restricted panel of genes. For the molecular assessment of kidney transplant biopsies, a 17-gene panel was used,<sup>5</sup> including endothelial-associated genes (PLA1A, ROBO4, CAV1, and PECAM), natural killer cell-associated transcripts (CCL4, KLRD1, Fcgr3, and GNLY), monocyte/macrophage-associated genes (CD68, CCL18, and ADAMDEC1), inflammation-related transcripts (CARD16 and CXCL11), T-cell-associated transcripts (CTLA4, PRF1, and IFNG) and B cell-related transcripts (CD72). A support vector classifier has been previously developed to facilitate molecular data interpretation. Using this classifier, the molecular profiles of the first and second biopsies were compatible with antibody-mediated rejection. The third biopsy no longer presented a molecular profile of antibody-mediated rejection. Considering optical microscopy findings, anti-human leukocyte antigen donor-specific antibodies, and the molecular profile, the first protocol biopsy was retrospectively considered an active antibody-mediated rejection. ATN, acute tubular necrosis; C4d, C4d deposit assessed by immunofluorescence; DSA, donor-specific antibody; g, glomerulitis; NK, natural killer; ptc, peritubular capillaritis.

**Table**  
Mean fluorescence intensity of donorspecific anti-human leukocyte antigen antibodies.

Date	6 wk before kidney transplantation	Day of kidney transplantation	8 d after kidney transplantation	3 mo after kidney transplantation	4 mo after kidney transplantation	7 mo after kidney transplantation	12 mo after kidney transplantation
Event	Beginning of the desensitization protocol	Day of the kidney transplantation	Biopsy 1	Biopsy 2	Following antibody-mediated rejection treatment with immunoadsorption	Following antibody-mediated rejection treatment with daratumumab	
Anti-A26	9863	3300	<500	570	<500	<500	<500
Anti-B50	9125	3800	4600	4000	<500	<500	<500
Anti-DR15	4753	1600	<500	<500	<500	<500	<500
Anti-DR51	8238	3600	4400	4300	5500	3200	2100
Anti-DP4	16 575	9800	8800	7700	9500	4700	5300
No DSA anti-HLA class I antibodies	9568 ± 8453	5542 ± 5826	8208 ± 7776	7972 ± 7945	5948 ± 6417	4503 ± 5389	4891 ± 5825
No DSA anti-HLA class II antibodies	4604 ± 5494	2200 ± 2991	3126 ± 3620	4268 ± 4638	2172 ± 2694	1862 ± 2317	2021 ± 2470
cPRA	100%	99.0%	99.5%	99.0%	98.8%	97.0%	97.3%

Despite a desensitization protocol with immunoadsorption and rituximab, 5 antibodies persisted. Following the treatment of antibody-mediated rejection, the use of daratumumab resulted in a ~2-fold decrease in the mean fluorescence intensity of antibodies. Five months after the end of daratumumab infusions, mean fluorescence DSAs were stable, without significant rebound. No DSA anti-HLA antibodies are expressed as MFI mean value ± SD.

DSA, donor-specific antibody; HLA, human leukocyte antigen; cPRA, calculated panel-reactive antibody.

widespread use both in newly diagnosed and relapsed or refractory myeloma.<sup>9-12</sup> Considering the efficiency of daratumumab in depleting nonmalignant antibody-secreting cells, it has also been successfully used in several antibody-mediated diseases<sup>13</sup> such as autoimmune hemolytic anemia, systemic lupus erythematosus, cold agglutinin disease, and Evans syndrome.<sup>14-16</sup>

In transplantation, daratumumab was evaluated in an experimental model of desensitization prior to KT.<sup>17</sup> In this study, daratumumab led to a decrease in preformed DSAs and plasmablast count. The authors also reported their experience of 2 AMR cases unresponsive to the standard of care, in which daratumumab infusions led to a decrease in DSAs and intragraft plasma cells, with clinical improvement. The use of daratumumab in AMR with de novo DSAs has also been reported in 4 case reports in heart and kidney transplantation and appeared to successfully decrease the MFI of DSAs and pathologic signs of rejection.<sup>18-22</sup>

In the case we report, AMR was attributed to persistent preformed DSAs despite the desensitization protocol, which decreased ~2 folds after CD38-depleting therapy concomitantly to reversion of functional, molecular, and pathologic AMR. This is in line with the concept that sustained production of pathogenic alloantibodies may originate predominantly from long-lived plasma cells differentiated following intense immunizing events such as pregnancy.<sup>23</sup> Given the relative ineffectiveness of current treatments, it is likely that such treatments targeting these antibody-secreting cells will find a place, in combination with other B cell-depleting therapies, in both AMR and desensitization.

These results seem promising; however, attention should be paid to the possible risk of T cell-mediated rejection (TCMR) following daratumumab use. Here, no TCMR episode occurred. However, Scalzo et al<sup>24</sup> recently reported the case of a patient treated prior to KT with daratumumab as maintenance therapy for multiple myeloma. Four days after KT, performed 2 weeks after the last daratumumab infusion, the patient underwent grade IIB TCMR, which was successfully treated with thymoglobulin. In another case report, Doberer et al<sup>20</sup> reported the coincidence of multiple myeloma and chronic, active AMR 13 years after KT. Daratumumab infusion led to regression of both myeloma and AMR; however, a protocol biopsy performed 3 months after daratumumab initiation revealed subclinical tubulointerstitial infiltrates, which decreased after steroid pulse therapy. Finally, the occurrence of TCMR was also observed in a primate model of daratumumab-based desensitization before KT.<sup>17</sup>

This case illustrates the challenging management of highly sensitized patients receiving KT, who require close monitoring for AMR occurrence. To this end, recent diagnostic tools, such as molecular assessment of biopsy, are useful. Finally, daratumumab, which directly targets antibody-secreting cells rather than their precursors, may be of interest in desensitization and AMR treatment.

**Funding**

This study was not funded.

## Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the American Journal of Transplantation.

## Data availability

Data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on request.

## Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

The authors are thankful to the patient who gave written consent for this case report.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.06.018>.

## ORCID

Tristan de Nattes <https://orcid.org/0000-0002-3714-8768>  
 Dominique Guerrot <https://orcid.org/0000-0002-5953-5785>  
 Sophie Candon <https://orcid.org/0000-0001-7060-2275>  
 Dominique Bertrand <https://orcid.org/0000-0002-8766-4859>

## References

- Mamode N, Bestard O, Claas F, et al. European guideline for the management of kidney transplant patients with HLA antibodies: by the European Society for Organ Transplantation Working Group. *Transpl Int*. 2022;35:10511. <https://doi.org/10.3389/ti.2022.10511>.
- Noble J, Metzger A, Daligault M, et al. Immortal time-bias-corrected survival of highly sensitized patients and HLA-desensitized kidney transplant recipients. *Kidney Int Rep*. 2021;6(10):2629–2638. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.07.024>.
- Lefaucheur C, Louis K, Morris AB, et al. Clinical recommendations for posttransplant assessment of anti-HLA (human leukocyte antigen) donor-specific antibodies: a sensitization in transplantation: assessment of risk consensus document. *Am J Transplant*. 2023;23(1):115–132. <https://doi.org/10.1016/j.ajt.2022.11.013>.
- Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, et al. Recommended treatment for antibody-mediated rejection after kidney transplantation: the 2019 expert consensus from the Transplantation Society Working Group. *Transplantation*. 2020;104(5):911–922. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003095>.
- de Nattes T, Beadle J, Toulza F, et al. A simple molecular tool for the assessment of kidney transplant biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2023;18(4):499–509. <https://doi.org/10.2215/CJN.000000000000100>.
- Toulza F, Dominy K, Willicombe M, et al. Diagnostic application of transcripts associated with antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies. *Nephrol Dial Transplant*. 2022;37(8):gfab231. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab231>.
- Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>.
- Varga C, Maglio M, Ghobrial IM, Richardson PG. Current use of monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2018;181(4):447–459. <https://doi.org/10.1111/bjh.15121>.
- Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1207–1219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506348>.
- Moreau P, Attal M, Hulin C, et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10192):29–38. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31240-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31240-1).
- van de Donk NW, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet*. 2021;397(10272):410–427. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00135-5).
- Minakata D, Fujiwara SI, Yokoyama D, et al. Relapsed and refractory multiple myeloma: a systematic review and network meta-analysis of the efficacy of novel therapies. *Br J Haematol*. 2023;200(6):694–703. <https://doi.org/10.1111/bjh.18654>.
- Ejaz K, Roback JD, Stowell SR, Sullivan HC. Daratumumab: beyond multiple myeloma. *Transfus Med Rev*. 2021;35(3):36–43. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2021.06.002>.
- Blennerhassett R, Sudini L, Gottlieb D, Bhattacharyya A. Post-allogeneic transplant Evans syndrome successfully treated with daratumumab. *Br J Haematol*. 2019;187(2):e48–e51. <https://doi.org/10.1111/bjh.16171>.
- Ostendorf L, Burns M, Durek P, et al. Targeting CD38 with daratumumab in refractory systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2020;383(12):1149–1155. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2023325>.
- Tomkins O, Berentsen S, Arulogun S, Sekhar M, D'Sa S. Daratumumab for disabling cold agglutinin disease refractory to B-cell directed therapy. *Am J Hematol*. 2020;95(10):E293–E295. <https://doi.org/10.1002/ajh.25932>.
- Kwon J, Maignon M, Manook M, et al. Daratumumab in sensitized kidney transplantation: potentials and limitations of experimental and clinical use. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(7):1206–1219. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018121254>.
- Spica D, Junker T, Dickenmann M, et al. Daratumumab for treatment of antibody-mediated rejection after ABO-incompatible kidney transplantation. *Case Rep Nephrol Dial*. 2019;9(3):149–157. <https://doi.org/10.1159/000503951>.
- Agudo CA, Bueno MG, Castello IK. Daratumumab for antibody-mediated rejection in heart transplant-A novel therapy: successful treatment of antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2021;105(3):e30–e31. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003505>.
- Doberer K, Kläger J, Gualdoni GA, et al. CD38 antibody daratumumab for the treatment of chronic active antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplantation*. 2021;105(2):451–457. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003247>.
- Fenton M, Shaw K, Murchan H, Duignan S, Dunne E, McMahon CJ. Daratumumab provides transient response of antibody mediated rejection post pediatric orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2022;41(10):1529–1530. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2022.06.017>.
- Zhu L, Guo Z, Zhao D, et al. Case report: daratumumab for treatment of refractory late or chronic active antibody-mediated rejection in renal allograft recipients with high levels of de novo donor-specific antibodies. *Front Immunol*. 2022;13:1087597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1087597>.
- Snanoudj R, Claas FHJ, Heidt S, Legendre C, Chatenoud L, Candon S. Restricted specificity of peripheral alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant. *Kidney Int*. 2015;87(6):1230–1240. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.390>.
- Scalzo RE, Sanoff SL, Rege AS, et al. Daratumumab use prior to kidney transplant and T cell-mediated rejection: a case report. *Am J Kidney*. 2023;81(5):616–620. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2022.11.010>.

## 8.2 Autres articles publiés pendant cette thèse, sans rapport direct avec celle-ci

Dans cette section, seule la première page de chaque article est présentée.

### 8.2.1 Switch from calcineurin inhibitors to belatacept in kidney transplant patients with chronic-active antibody mediated rejection results in lower decline in kidney function at three years

Journal of Nephrology

<https://doi.org/10.1007/s40620-021-01099-7>

RESEARCH LETTER



### Switch from calcineurin inhibitors to belatacept in kidney transplant patients with chronic-active antibody mediated rejection results in lower decline in kidney function at three years

Tristan de Nattes<sup>1,2</sup> · Arnaud François<sup>3</sup> · Sophie Candon<sup>2</sup> · Isabelle Etienne<sup>1</sup> · Charlotte Laurent<sup>1</sup> · Marie Matignon<sup>4,7</sup> · Antoine Morel<sup>4</sup> · Johan Noble<sup>5</sup> · Martin Planchais<sup>6</sup> · Dominique Guerrot<sup>1</sup> · Dominique Bertrand<sup>1</sup>

Received: 3 June 2021 / Accepted: 10 June 2021

© Italian Society of Nephrology 2021

**Keywords** Chronic-active Antibody Mediated Rejection · Belatacept · Kidney transplant · Chronic allograft nephropathy · Immunosuppressive agent

#### Abbreviations

AMBR	Antibody Mediated Rejection
ca-ABMR	chronic-active Antibody Mediated Rejection
CNI	Calcineurin Inhibitors
D0	Day 0
DSA	Donor Specific
eGFR	estimated Glomerular Filtration
HR	Hazard Ratio
KT	Kidney Transplantation
MFI	Mean Fluorescence Intensity

Donor Specific Antibodies (DSA) bind to the donor endothelial cells, ultimately resulting into allograft vasculopathy, the canonical lesion of chronic-active ABMR (ca-ABMR). Another source of chronic endothelial damages in the scope of kidney transplantation (KT) is the use of Calcineurin Inhibitors (CNI). In this setting, Belatacept, a co-stimulation blockade molecule, has emerged as an interesting alternative, improving eGFR in situations of impaired graft endothelium, such as Extended-Criteria Donors and chronic vascular changes [1]. Moreover, recent studies broaden indications of Belatacept to patients with a high immunological risk with benefits in reducing DSA titer [2]. Therefore, we conducted a retrospective multicentric study to assess the beneficial effect on KT function and survival of a switch from CNI to Belatacept in case of ca-ABMR.

Based on pathology databases from four KT centers, all KT biopsies performed between 2007 and 2020 were screened and selected when they met all ca-ABMR diagnosis criteria according to Banff 2019 classification. All patients with a diagnosis of ca-ABMR and switched to Belatacept were included. The control group consisted of all patients from Rouen pathological database with a histological diagnosis of ca-ABMR who remained on CNI. Day 0 (D0) was the day of the biopsy. Detailed method is available in supplementary data 1.

Nineteen patients were switched to Belatacept at the time of ca-ABMR diagnosis and compared to 58 control patients. Baseline characteristics are detailed in supplementary table S1.

There was one death in the control-group at month-16, with functioning KT. After the diagnosis of ca-ABMR, there was no acute rejection in any group. At one, two and three years, death-censored KT survival in the Belatacept-treated

✉ Tristan de Nattes  
tristan.de-nattes@chu-rouen.fr

<sup>1</sup> Nephrology, Kidney Transplant Unit, Rouen University Hospital, 76031 Rouen, France

<sup>2</sup> Department of Immunology, and biotherapies, Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1234, Rouen University Hospital, 76031 Rouen, France

<sup>3</sup> Pathology Department, Rouen University Hospital, 76031 Rouen, France

<sup>4</sup> Nephrology and Renal Transplantation Department, AP-HP (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, F-94010 Créteil Créteil, France

<sup>5</sup> Nephrology, Hemodialysis, Apheresis, and Kidney Transplantation Department, University Hospital of Grenoble-Alpes, Grenoble, France

<sup>6</sup> Nephrology, Hemodialysis, Kidney Transplant Department, Angers University Hospital, 49000 Angers, France

<sup>7</sup> Université Paris-Est Créteil, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), F-94010 Créteil Créteil, France

Published online: 28 June 2021

Springer

## 8.2.2 Lesson for the clinical nephrologist: immune monitoring of human JC-polyomavirus in kidney transplantation

Journal of Nephrology  
https://doi.org/10.1007/s40620-021-01150-7

LESSONS FOR THE CLINICAL NEPHROLOGIST



### Lesson for the clinical nephrologist: immune monitoring of human JC-polyomavirus in kidney transplantation

Tristan de Nattes<sup>1,2</sup> · Isabelle Etienne<sup>1</sup> · Emmanuel Gerardin<sup>3</sup> · Dominique Bertrand<sup>1</sup> · Sophie Candon<sup>2</sup>

Received: 5 July 2021 / Accepted: 22 August 2021  
© Italian Society of Nephrology 2021

**Keywords** Kidney Transplant · Immunosuppressive therapy · Belatacept · Infection · Progressive multifocal leukoencephalopathy · IFN $\gamma$  ELISpot · Immunomonitoring

#### Abbreviations

ATG	Antithymocyte globulin
CMV	Cytomegalovirus
EBV	Epstein Barr virus
FLAIR	Fluid-attenuated inversion recovery
JCV	Human JC-polyomavirus
KT	Kidney transplantation
PML	Progressive multifocal leukoencephalopathy
PRES	Posterior reversible encephalopathy syndrome
MMF	Mycophenolate mofetil
MRI	Magnetic resonance imaging

#### The case

We report the case of a 53-year-old woman who underwent kidney transplantation (KT) for IgA nephropathy in 2012, from a 59-year-old deceased donor. After induction with anti-thymocyte globulin (ATG, 100 mg/day for 5 days), the immunosuppressive regimen included mycophenolate mofetil (MMF) 2 g/day, tacrolimus (trough levels 8–10 ng/mL) and corticosteroids (10 mg/day). Cytomegalovirus (CMV) serology was negative in the recipient and donor, Epstein-Barr Virus serology was positive for both. On day-38, she developed Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome (PRES). After excluding other etiologies of PRES, tacrolimus was discontinued and replaced by

belatacept. Following the switch, neurological symptoms rapidly receded, and hospital discharge occurred on day-74. Several cerebral Magnetic Resonance Imaging (MRI) were performed until total regression of PRES lesions.

After KT, she developed three herpes zoster recurrences, Bowen's disease and Norovirus gastroenteritis, requiring a decrease in MMF dosage to 500 mg/day.

In August 2017, she complained of vertigo. A cerebral MRI found abnormalities evocative of Progressive Multifocal leukoencephalopathy (PML) (Fig. 1a), which was confirmed by the detection of JCV RNA in the cerebrospinal fluid. Belatacept and MMF were then withdrawn (latest injection end-September) and corticosteroids were maintained at 10 mg/day. Concomitantly, total lymphocyte count was 0.160 G/L.

To assess the restoration of T-cell immunity to JCV after immunosuppressive treatment discontinuation, we used an IFN $\gamma$  ELISpot assay (supplementary data 1).

The first IFN $\gamma$  ELISpot was done in December 2017 (month-2 after PML diagnosis and immunosuppressive drug withdrawal). Low but significant numbers of JCV-specific T cells reactive to 2/5 antigens were identified (83 specific T cells/10<sup>6</sup> CD3 + T cells) despite severe lymphopenia (0.245 G/L with CD3 + T lymphocytes = 0.036 G/L) (Fig. 2). At month-6, CD3 + T cell count slightly improved (0.201 G/L) and the IFN $\gamma$  ELISpot assay identified an increased response to JCV, both in its magnitude (3.6-fold) and diversity (4/5 positive antigens) (Table 1). This immunological restoration was associated with an improvement in neurological and radiological examinations. Thereafter, despite persistent lymphopenia < 0.300 G/L, IFN $\gamma$  ELISpot showed constant enrichment in JCV-specific T cells up to month-10 (11.7-fold compared to baseline). Based on these results and stable CD3 + T cell counts around 0.200 G/L, 1 mg/day sirolimus was introduced. However, at month-12, worsening of lymphopenia (CD3 + T cells = 0.060 G/L) prompted its

✉ Tristan de Nattes  
tristan.de-nattes@chu-rouen.fr

<sup>1</sup> Nephrology, Kidney Transplant Unit, Rouen University Hospital, 1 rue de Germont, 76031 Rouen, France

<sup>2</sup> Department of Immunology, and Biotherapies, Normandy University, UNIROUEN, INSERM, U1234, Rouen University Hospital, 76031 Rouen, France

<sup>3</sup> Department of Neuroradiology, Rouen University Hospital, Rouen, France

## 8.2.3 Kidney Transplant T Cell–Mediated Rejection Occurring After Anti-CD19 CAR T-Cell Therapy for Refractory Aggressive Burkitt-like Lymphoma With 11q Aberration: A Case Report

ARTICLE IN PRESS

Case Report

AJKD

### Kidney Transplant T Cell–Mediated Rejection Occurring After Anti-CD19 CAR T-Cell Therapy for Refractory Aggressive Burkitt-like Lymphoma With 11q Aberration: A Case Report

Tristan de Nattes, Vincent Camus, Arnaud François, Grégoire Dallet, Christophe Ferrand, Dominique Guerrot, Mathilde Lemoine, Florence Morin, Catherine Thieblemont, Elena-Liana Veresezan, Sophie Candon, Jean-Baptiste Latouche, and Dominique Bertrand

Post-transplant lymphoproliferative disorder is a growing complication of kidney transplantation and is associated with a poor prognosis. Anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy is an important new treatment option modifying the outcome of refractory hematological cancers. Here, we report the case of a 40-year-old kidney transplant recipient who developed a Burkitt-like lymphoma with 11q aberration 5 years after transplantation. After 3 unsuccessful lines of chemotherapy, it was decided to treat the patient with anti-CD19 CAR T cells as a salvage therapy. Three months after CAR T-cell infusion, she experienced a grade IIB T cell–mediated rejection with severe tubulitis (T3), slight interstitial inflammation (I1), and severe intimal arteritis (V2) with blood suffusion. Among T cells infiltrating the graft, some of them expressed the anti-CD19 CAR. CAR T cells within the graft and in blood samples were also detected by droplet digital polymerase chain reaction. Function of the kidney transplant improved after corticosteroid treatment and remained stable. However, lymphoma progressed, with a massive pulmonary mass leading to the patient's death 10 months after CAR T-cell infusion.

Complete author and article information provided before references.

*Am J Kidney Dis.* XX(XX):1-5. Published online month xx, xxxx.

doi: 10.1053/j.ajkd.2021.07.012

© 2021 by the National Kidney Foundation, Inc.

#### Introduction

Post-transplant lymphoproliferative disorder is an important complication of kidney transplantation (KT) that is associated with a poor prognosis. Anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy is an important new approach to treating hematological and other malignancies. We report the case of a 40-year-old KT recipient who developed a Burkitt-like lymphoma with a chromosome 11q aberration 5 years after transplantation. After standard chemotherapy proved unsuccessful, she was treated with anti-CD19 CAR T cells as a salvage therapy. Three months after CAR T-cell infusion, she experienced a grade IIB T cell–mediated rejection. Among T cells infiltrating the graft, some of them expressed the anti-CD19 CAR. CAR T cells within the graft and in blood samples were also detected by polymerase chain reaction (PCR).

#### Case Report

In January 2013, a 40-year-old woman with kidney failure related to IgA nephropathy received a KT from a living donor with 4 HLA mismatches: 2 in class I and 2 in class II. There was no history of previous HLA sensitization events and no HLA antibodies were detected at the time of transplantation. Lymphocytotoxicity and flow cytometric crossmatch assays were both negative. After transplantation, her serum creatinine concentration (Scr) was 70  $\mu\text{mol/L}$  (0.8 mg/dL) and remained stable for 5 years, without any complication or rejection episode. Her immunosuppressive regimen was a combination of

tacrolimus (8 mg twice daily, trough level 5.4 ng/mL) and azathioprine (75 mg daily).

Five years after transplantation (January 2018), the patient developed a high-grade, Epstein-Barr virus–negative, Burkitt-like lymphoma with 11q aberration,<sup>1</sup> revealed by a cervical nodal localization, without extranodal involvement. Azathioprine was stopped and she received chemotherapy.

First-line therapy based on weekly rituximab infusions for 4 weeks in February 2018 failed and extranodal involvement appeared, reaching breast nodes, thyroid, mediastinum, ovaries, and the graft. Tacrolimus was stopped and only corticosteroids were continued (prednisone 20 mg per day).

She then received second-line chemotherapy with rituximab, vincristine, methotrexate, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisolone (RCOPADM), with partial response. This treatment was completed in August 2018 with rituximab, methotrexate, and cytarabine (R-CYM), combined with intrathecal methotrexate plus cytarabine prophylaxis followed by vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, and prednisolone. Unfortunately, in September 2018, fluorodeoxyglucose–positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) revealed an ovarian and pulmonary relapse. An ovarian biopsy confirmed lymphoma progression.

Third-line chemotherapy with rituximab, ifosfamide, carboplatin, and etoposide was introduced, followed by an autologous stem cell transplantation with BEAM conditioning in February 2019. In May 2019, PET/CT revealed a

## 8.2.4 CD86 occupancy in belatacept-treated kidney transplant patients is not associated with clinical and infectious outcomes

Received: 11 August 2021 | Revised: 10 February 2022 | Accepted: 10 February 2022

DOI: 10.1111/ajt.17005

BRIEF COMMUNICATION

AJT

### CD86 occupancy in belatacept-treated kidney transplant patients is not associated with clinical and infectious outcomes

Tristan de Nattes<sup>1,2</sup>  | Ludivine Lebourg<sup>1</sup> | Isabelle Etienne<sup>1</sup> | Charlotte Laurent<sup>1</sup> | Mathilde Lemoine<sup>1</sup> | Audrey Dumont<sup>1</sup> | Dominique Guerrot<sup>1</sup>  | Serge Jacquot<sup>2</sup> | Sophie Candon<sup>2</sup>  | Dominique Bertrand<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Nephrology – Kidney Transplant Unit, Rouen University Hospital, Rouen, France

<sup>2</sup>Department of Immunology, and Biotherapies, UNIROUEN, INSERM U1234, Normandy University, Rouen University Hospital, Rouen, France

#### Correspondence

Tristan de Nattes, Nephrology – Kidney Transplant Unit, Rouen University Hospital, 1 rue de Germont, 76031, Rouen, France.  
Email: tristan.de-nattes@chu-rouen.fr

The CD86 occupancy assay has been developed to measure the number of CD86 molecules unbound to belatacept, but its association with clinical outcomes has not been assessed yet.

All kidney transplant patients switched to belatacept in our center between 2016 and 2018 were included. Blood samples were collected before each infusion for 1 year to assess CD86 occupancy by CD86 antibody cytometry staining on the surface of CD14<sup>+</sup> monocytes. Results were expressed as the median fluorescence intensity (MFI) value of CD86 staining. At each infusion, the  $MFI_{\text{Day of infusion}}/MFI_{\text{Day 0}}$  ratio was calculated.

Forty-one patients were consecutively included. After every 2-week infusion period, CD86 MFI ratio dropped from 1.00 to 0.73 [0.57–0.98],  $p = .07$ . However, this ratio progressively increased to 0.78 [0.53–1.13] at 1 year, which was not statistically different from pre-switch ratio,  $p = .4$ . Over the first year, the MFI ratio coefficient of variation was 31.58% [23.75–38.31]. MFI ratio was not different between patients with or without opportunistic infections: 0.73 [0.60–0.88] versus 0.80 [0.71–1.00],  $p = .2$ , or between patients with or without EBV DNAemia,  $p = .2$ .

Despite previous in vitro results, the CD86 occupancy assay suffers from a high intra-individual variability and does not appear to be relevant to clinical outcomes.

#### KEYWORDS

belatacept, CD86, kidney transplant, opportunistic infection, therapeutic monitoring

## 1 | INTRODUCTION

Kidney transplantation (KT) is the best therapeutic option for patients with end-stage renal disease, improving both the quantity and quality of life. Despite recent advances in the management of

kidney transplanted patients, especially in early-transplantation, long-term graft survival stagnates, which could be partially due to nephrotoxicity of immunosuppressive therapies.<sup>1</sup> Indeed, although calcineurin inhibitors (CNI) was a major breakthrough for kidney transplant survival and function, acute and chronic nephrotoxicity of these drugs is now a hindrance to improving KT life span, especially considering the increasing number of expanded criteria donors and vascular grafts.<sup>2</sup> Belatacept, a co-stimulation blocker,<sup>3</sup> has emerged as an interesting and safe alternative improving KT

**Abbreviations:** CMV, cytomegalovirus; CNI, calcineurin inhibitors; CV, coefficient of variation; DSA, donor-specific antibodies; EBV, Epstein-Barr virus; KT, kidney transplant; MFI, median fluorescence intensity; OPI, opportunistic infections.

© 2022 The American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

## 8.2.5 Humoral response to a fourth dose of mRNA vaccine in kidney transplant recipient responders to three doses of mRNA vaccine



Clinical Kidney Journal, 2022, vol. 0, no. 0, 1–3

<https://doi.org/10.1093/ckj/sfac183>  
Advance Access Publication Date: 2 August 2022  
Letter to the Editor

LETTER TO THE EDITOR

### Humoral response to a fourth dose of mRNA vaccine in kidney transplant recipient responders to three doses of mRNA vaccine

Tristan de Nattes<sup>1,2</sup>, Sophie Candon<sup>2</sup>, Véronique Lemée<sup>3</sup>,  
Charlotte Laurent<sup>1</sup>, Dominique Guerrot<sup>1</sup> and Dominique Bertrand<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nephrology–Kidney Transplant Unit, Rouen University Hospital, Rouen, France, <sup>2</sup>Department of Immunology, and Biotherapies, Normandy University, Rouen University Hospital, Rouen, France and <sup>3</sup>Department of Virology, Rouen University Hospital, Rouen, France

Correspondence to: Dominique Bertrand; E-mail: [dominique.bertrand@chu-rouen.fr](mailto:dominique.bertrand@chu-rouen.fr)

Kidney transplant recipients (KTRs) experience a low rate of seroconversion after severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) messenger RNA (mRNA) vaccine, even after three or even four or five consecutive doses [1]. Furthermore, in KTR responders to vaccine, we recently reported a decline in both humoral and cellular immunity 6 months after a third mRNA vaccine dose [2]. Such a rapid decline is troubling because of the high probability of reduced vaccine effectiveness against variants of concern and breakthrough infection in KTRs.

Here, we report the extension of our previously published 80-KTR prospective cohort [2], evaluating whether the strategy of administering a fourth dose of mRNA vaccine 6 months after the third dose prevented the decline of humoral immunity in KTR responders to the initial vaccine schedule. The immune response to anti-SARS-Cov-2 mRNA vaccine was assessed by measuring anti-spike receptor-binding domain immunoglobulin G (IgG) antibodies (ARCHITECT IgG II Quant test; Abbott, Abbott Park, IL, USA) (positivity threshold = 8.5 binding antibody unit [BAU]/mL) [3]. A low response to vaccine was defined by an antibody titer less than 264 BAU/mL 1 month after injection [4]. This study was approved by the local ethics committee (CERNI No. E202137), and we obtained informed consent for all participants.

All KTRs had an initial vaccine schedule consisting of three doses of BNT162b2 mRNA vaccine. Among them, 49 of 80 (61.2%)

developed specific anti-SARS-Cov-2 antibodies, and 31 of 80 (38.8%) were seronegative. Notably, the repartition of an immunosuppressive regimen differed among these patients, with a higher proportion of belatacept-treated patients in the seronegative group after the third dose (Supplementary Table 1). Among KTR responders to the third dose, 40 of 49 (81.6%) received a fourth vaccine dose after a median time of 6.26 months after the third dose (interquartile range [IQR]: 5.82–6.94) (Figure 1). Characteristics of these 40 KTRs are summarized in Supplemental Table 2. No modification of immunosuppressive therapy was performed during the study period. No patient had a history of SARS-Cov-2 infection. Median antibody titer increased from 302 BAU/mL (IQR: 67–971) 1 month after the third dose to 1117 BAU/mL (IQR: 416–2554) 1 month after the fourth dose ( $P < .0001$ ). The median increase in antibody titer was 204% (IQR: 85–671). The number of KTRs with a low antibody titer (<264 BAU/mL) decreased from 18 of 40 (45%) at 1 month after the third dose to 8 of 40 (20%) 1 month after the fourth dose of mRNA vaccine ( $p = .0002$ ). Clinical and biological characteristics of KTRs with low or high antibody titer after the fourth dose are reported in Supplemental Table 3. Humoral response 1 month after the second, third, and fourth doses of vaccine is reported in Figure 2. During the median 5.1 (IQR: 4.1–5.5) months of follow-up after the fourth dose, 5 of 40 (12.5%) KTRs developed a SARS-Cov-2 infection, confirmed by polymerase chain reaction on

Received: 23.6.2022; Editorial decision: 12.7.2022

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of the ERA. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

## Rejet humoral d'allogreffe rénale et allo-immunisation HLA

La transplantation rénale est le meilleur traitement de l'insuffisance rénale chronique terminale, que ce soit en termes d'espérance ou de qualité de vie. Malgré les progrès réalisés en immunologie de la transplantation et dans la gestion globale des patients transplantés, la principale étiologie de perte de greffon reste le rejet, et en particulier le rejet humoral.

L'évaluation du risque de rejet humoral repose principalement sur le dosage des anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon. Pourtant, il apparaît que ces anticorps ont un faible pouvoir prédictif de l'incidence et du pronostic du rejet, ce qui pourrait être expliqué par une hétérogénéité de leurs caractéristiques intrinsèques. Ces caractéristiques dépendent des cellules responsables de leur sécrétion, plasmocytes à courte et longue durée de vie, et donc indirectement des cellules responsables du maintien du *pool* de ces cellules sécrétrices d'anticorps : les lymphocytes B mémoires. Il a été montré en pathologies infectieuses que ces lymphocytes B mémoires sont hétérogènes en termes de phénotype, de fonction, de degré de clonalité et de diversification de leur BCR (*B-cell receptor*). Néanmoins, ceci n'a pas encore été analysé en transplantation rénale. Un des objectifs de cette thèse était d'étudier le degré d'hétérogénéité des lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques chez des patients immunisés en attente de transplantation rénale. Pour ce faire, une analyse en cellule unique de lymphocytes B mémoires HLA-spécifiques de patients présentant différents contextes et degré d'immunisation a été réalisée, dans le but d'identifier leurs caractéristiques phénotypiques et transcriptomiques et la diversification de leur répertoire BCR.

La deuxième partie des travaux s'est concentrée sur les modalités diagnostiques du rejet de greffe rénale. Depuis quelques années, des outils de biologie moléculaire sont disponibles, permettant d'évaluer des centaines de transcrits exprimés dans le tissu de biopsie. Ces outils donnent la possibilité de décrire de nouvelles voies physiopathologiques, et potentiellement d'améliorer le diagnostic du rejet, en particulier le rejet humoral. Néanmoins, leur utilisation en pratique courante est restreinte du fait de leur faible disponibilité, des difficultés à interpréter les données produites, et de leur coût. De plus, du fait de cette sous-utilisation en pratique clinique, leur impact exact dans la prise en charge des patients n'est pas déterminé. Au cours de cette thèse, un outil de diagnostic moléculaire ayant des caractéristiques compatibles avec une utilisation en pratique clinique a été développé. Celui-ci permet de diagnostiquer le rejet et de le classer en rejet humoral ou cellulaire. Dans un second temps, cet outil a été confronté à des situations cliniques litigieuses, afin d'évaluer son intérêt en pratique courante.

À travers ces travaux, cette thèse vise d'une part à améliorer la compréhension de la réponse humorale en transplantation rénale, afin de contribuer à terme à mieux stratifier le risque immunologique en transplantation, et d'autre part à améliorer les modalités diagnostiques du rejet en aidant à la généralisation des outils de biologie moléculaire appliqués aux biopsies de greffons rénaux.

---

### Kidney transplant rejection and HLA alloimmunisation.

Kidney transplantation is the best treatment of end-stage renal disease, improving life quality and quantity. Despite advances in pathophysiological knowledge of kidney transplant immunology, kidney transplant rejection remains the major cause of allograft dysfunction, especially antibody-mediated rejection.

Antibody-mediated rejection risk assessment is based on the evaluation of donor-specific anti-HLA antibodies. However, these antibodies have a poor predictive value for incidence and prognosis of rejection. This could be explained by the heterogeneity of their intrinsic characteristics. These characteristics depend on cells responsible for their secretion, which include short- and long-lived plasma cells. Consequently, they indirectly depend on the cells responsible for maintaining the pool of these antibody-secreting cells, such as memory B cells. In infectious diseases, it is known that memory B cells are heterogeneous in terms of phenotype, function, degree of clonality, and diversification of their B-cell receptor (BCR). However, this heterogeneity has not been examined in the context of kidney transplantation.

The aim of the first part of this thesis was to study the heterogeneity of HLA-specific memory B cells in sensitised patients on kidney transplant waiting list. To this end, single-cell analysis of HLA-specific memory B cells from patients with various aetiologies and degrees of immunisation was performed. This led to their phenotypic and transcriptomic characterisation and to the assessment of their BCR repertoire.

The second part of this thesis was dedicated to the diagnosis of kidney transplant rejection.

In recent years, biopsy-based transcriptomics has emerged, enabling the assessment of hundreds of transcripts in kidney biopsy tissue. These tools provide the opportunity to elucidate new physiopathological pathways and potentially enhance the diagnosis of rejection, especially humoral rejection. However, their application in clinical practice is still limited due to their restricted availability, required expertise for data processing and interpretation, and cost. Furthermore, their exact impact on patient management remains undetermined. Here, a molecular diagnostic tool with characteristics suitable for clinical use was developed. This tool enables the diagnosis of rejection and its classification between antibody-mediated and T-cell mediated rejection. Subsequently, this tool was assessed in ambiguous clinical situations to evaluate its impact in clinical practice.

Through these studies, this thesis focused on enhancing our understanding of the humoral response in renal transplantation, which could help improving immunological risk stratification in transplantation. Additionally, it aimed to improve biopsy-based transcriptomics in the diagnosis of kidney transplant rejection.

---

### Mots clefs

Transplantation rénale, allo-réactivité, lymphocyte B mémoire, analyses en cellules uniques, rejet de greffe, rejet humoral, néphropathologie, diagnostic moléculaire