

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES.....	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
REMERCIEMENTS	XI
AVANT-PROPOS.....	XII
1. INTRODUCTION	1
1.1 HISTORIQUE DE LA TRANSPLANTATION	1
1.2 L'ÉTENDUE DE LA MALADIE RÉNALE CHRONIQUE DANS LA SOCIÉTÉ	3
1.3 SITUATION ACTUELLE POUR LE DON ET LA PÉNURIE D'ORGANES AU CANADA ET AU QUÉBEC	4
1.4 SITUATION ACTUELLE DE LA SURVIE DU GREFFON.....	4
1.5 LE REJET DEMEURE LA PRINCIPALE CAUSE DE PERTE PRÉMATURÉE DE GREFFON.....	5
<i>1.5.1 Classification de la pathologie du rejet.....</i>	<i>6</i>
<i>1.5.2 Le rejet hyperaigu.....</i>	<i>7</i>
<i>1.5.3 Le rejet aigu.....</i>	<i>9</i>
<i>1.5.4 Le rejet chronique.....</i>	<i>9</i>
<i>1.5.5 Le rejet cellulaire</i>	<i>10</i>
1.6 LE REJET HUMORAL.....	13
<i>1.6.1 Physiopathologie de l'ABMR.....</i>	<i>18</i>
<i>1.6.2 Le système HLA et les anticorps anti-donneurs circulants (DSA)</i>	<i>18</i>
<i>1.6.3 L'endothélium.....</i>	<i>22</i>
<i>1.6.4 La glomérulopathie du transplant</i>	<i>24</i>
<i>1.6.5 Les traitements potentiels de l'ABMR</i>	<i>25</i>
1.7 LA THROMBOMODULINE	27
<i>1.7.1 Régulation de l'expression génique de la thrombomoduline.....</i>	<i>27</i>
<i>1.7.2 Organisation structurale</i>	<i>28</i>
<i>1.7.3 Rôles</i>	<i>29</i>
<i>1.7.3.1 Cascade de coagulation</i>	<i>29</i>
<i>1.7.3.2 Inflammation.....</i>	<i>30</i>
<i>1.7.3.3 Système du complément.....</i>	<i>31</i>
<i>1.7.3.4 Grossesse.....</i>	<i>31</i>
<i>1.7.4 La forme soluble de la thrombomoduline.....</i>	<i>32</i>
<i>1.7.5 Potentiel thérapeutique.....</i>	<i>32</i>
2. OBJECTIF ET HYPOTHÈSE	35
3. RÉSULTATS.....	37
3.1 ARTICLE	37
4. DISCUSSION	69
4.1 LES VOIES DE SIGNALISATION DES ANTICORPS ANTI-HLA	72

4.1.1	<i>Les voies de signalisation des anticorps anti-HLA-I</i>	72
4.1.2	<i>Les voies de signalisation des anticorps anti-HLA-II</i>	74
4.2	EXPRESSION GÉNIQUE DE LA THROMBOMODULINE	75
4.3	LA GLYCOSYLATION ET LA THROMBOMODULINE	75
5.	CONCLUSION	81
6.	BIBLIOGRAPHIE	83
7.	ANNEXE	89

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de Banff 1997 et mises à jour de 2007

Tableau 2 : Critères de Banff 2013 pour le rejet ABMR

Liste des figures

- Figure 1 : Rejet hyperaigu
- Figure 2 : Activation des lymphocytes T
- Figure 3 : Coupe histologique illustrant la glomérulite dans un capillaire
- Figure 4 : Marquage du C4d par immunofluorescence
- Figure 5 : Mécanismes de l'ABMR
- Figure 6 : Structure des molécules HLA de classe I et II
- Figure 7 : Facteurs potentiels expliquant le développement des DSA *de novo*
- Figure 8 : Glomérulopathie du transplant chronique
- Figure 9 : Structure de la thrombomoduline
- Figure 10 : Fonctions anti-inflammatoires de la thrombomoduline
- Figure 11 : Voies de signalisation des anticorps anti-HLA-I impliquées dans l'activation endothéiale
- Figure 12 : Expression de la TBM membranaire suite à des stimulations par les anticorps anti-HLA
- Figure 13 : Expression de la TBM avec chondroïtine-sulfate (160 kDa) et sans (95 kDa) (puits 5)

Liste des abréviations

- ABMR : « *antibody mediated rejection* », rejet humoral
- ADN : acide désoxyribonucléique
- Akt : protéine kinase B
- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- APC: « *antigen presenting cell* »
- BDCA3: « *Blood Dendritic Cell Antigen 3* »
- Bcl-2 : « *B-cell lymphoma 2* »
- Bcl-xl : membre de la famille Bcl-2
- CAM : complexe d'attaque membranaire
- CORR : registre du remplacement des organes au Canada
- CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
- DSA : « *donor-specific antibody* », anticorps anti-donneurs circulants
- EGF : « *epidermal growth factor* », facteur de croissance épidermique
- ERK : « *extracellular signal-regulated kinases* »
- FAK : « *focal adhesion kinase* »
- FDA : « *U.S food and drug administration* »
- GT : glomérulopathie du transplant
- HLA : « *human leucocyte antigen* », antigène humain des leucocytes
- HMGB1: « *high-mobility group box 1* »
- HO-1: hème oxygénase 1
- HSP: « *heat shock protein* »
- kDA : kilodalton
- KLF2 : facteur de Krüppel 2
- MAT : microangiopathie thrombotique
- MICA : chaîne A du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
- MICB : chaîne B du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
- mTOR: « *mammalian target of rapamycin* »
- NFAT: « *nuclear factor of activated T-cells* »
- NH₂ : extrémité N-terminale
- NK : « *natural killer cells* »
- NRF2 : facteur nucléaire érythroïde 2
- OFUT1 : « *O-fucosyltransferase 1* »

PAR-1 : « *protease-activated receptor 1* »

PC : protéine C

PCA : protéine C activée

PLC : phospholipase C

PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique

RE : réticulum endoplasmique

SHU : syndrome hémolytique urémique

TAFI : « *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* », inhibiteur de la fibrinolyse

TBM: thrombomoduline

TGF- β : « *Transforming growth factor beta* »

TNF- α : « *tumor necrosis factor alpha* »

UNOS: « *United Network for Organ Sharing* »

VEGF : « *vascular endothelial growth factor* », facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Remerciements

La réalisation de ce projet de maîtrise représente le succès de plusieurs personnes et non d'une seule. Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Sacha De Serres pour m'avoir donné l'opportunité d'apprendre au sein de son laboratoire dès mon baccalauréat. Cet été de stage m'a permis de découvrir que la recherche universitaire était un milieu pour moi et que le laboratoire du Dr De Serres correspondait à ce que je recherchais pour mes études graduées.

Je remercie également la Dre Caroline Basoni de m'avoir appris toutes les techniques nécessaires au début de ma maîtrise. Je remercie aussi le Dr Olivier Désy pour son aide en laboratoire mais aussi pour les discussions à mille lieues de la science qui sont bien appréciée, surtout en fin de journée ! Je remercie aussi le Dr Roth-Visal Ung pour son expertise appréciée dans plusieurs domaines scientifiques ou non !

Je remercie également Sarah-Kim Bisson et Marie-Pier Desjardins d'avoir apporté un peu de jeunesse et de féminin au 2^e étage !

Je ne peux passer sous silence l'aide et l'appui que mes parents, Hélène et Martin, m'ont apportés au cours des quelque 20 années que mon parcours scolaire compte à ce jour, ce sont les petits gestes qui comptent le plus comme on dit !

Je remercie chacun de vous pour le soutien apporté durant la réalisation de ma maîtrise, votre aide était très apprécié !

Avant-propos

Le chapitre 3 présente l'article « *Effects of anti-HLA antibodies on endothelial expression and serum levels of thrombomodulin in transplant recipients* », soumis au journal *Blood* le 20 juin dernier. L'étude présentée a été réalisée durant mon projet de maîtrise en médecine expérimentale à l'Université Laval sous la direction du Dr Sacha De Serres. J'ai élaboré et réalisé les expériences, analysé et interprété les données puis rédiger le manuscrit sous la supervision des Dr Sacha De Serres, directeur de recherche et Olivier Désy, professionnel de recherche.

L'annexe présente l'article « *Innate immunity in solid organ transplantation : an update and therapeutic opportunities* », publié dans *Expert Review in Clinical Immunology* en mars 2015. Cet article de revue a été réalisé au début de mon projet de maîtrise. J'ai élaboré le plan, fait les recherches et écrit l'article sous la supervision des Dr Sacha De Serres, directeur de recherche et Olivier Désy, étudiant post-doctoral à ce moment.

1. Introduction

1.1 Historique de la transplantation

La transplantation est une approche médicale qui a beaucoup évolué au cours des 60 dernières années. Il s'agit du traitement de choix dans de multiples maladies dont le rein en insuffisance terminale¹. Ses débuts remontent au 18^e siècle alors que les premières expériences de transplantation d'organe humain et animal débutaient malgré de nombreux échecs². Il faut attendre jusqu'au début du 20^e siècle pour observer des découvertes importantes qui ont mené à la réussite de la transplantation. La première étude majeure concernant la transplantation a été publiée en 1908 par Alexis Carrel, chirurgien qui a notamment perfectionné la technique de l'anastomose vasculaire utilisée pour la revascularisation lors de la transplantation³. Son étude de 1908 faisait état d'une série de 9 chats à qui il avait interchangé les reins⁴. En l'absence des connaissances actuelles en transplantation, les chats sont tous décédés, mais l'expérience a tout de même permis de démontrer la faisabilité du geste chirurgical, les organes transplantés ayant transitoirement démontré une fonction normale chez les receveurs. Peter A. Gorer a quant à lui découvert le développement des anticorps contre les alloantigènes dans les années 30⁵.

Le rein a été l'organe le plus étudié lors des développements de la transplantation. Les premières tentatives de transplantation rénale avec des humains ont été réalisées au début du 20^e siècle, principalement en France et en Allemagne. Il s'agissait, entre autres, de xénogreffé, soit la transplantation d'un organe entre 2 espèces biologiquement différentes. Ici, des reins d'animaux étaient transplantés à des humains. Les organes provenaient de divers animaux, dont le cochon, le mouton, la chèvre et le primate. À la suite des transplantations, aucun organe n'a survécu longtemps et les receveurs humains sont décédés rapidement, en quelques heures après la transplantation ou tout au plus 9 jours plus tard³. Encore aujourd'hui, la xénogreffé est un procédé qui n'a pas été transposé en médecine clinique.

Par la suite, aucune autre expérience notable n'a été réalisée au sujet de la transplantation entre animal et humain avant les débuts de l'immunosuppression en 1962³. Il y a par contre eu des études sur des modèles animaux canins, afin d'améliorer les techniques chirurgicales vasculaires au niveau des organes thoraciques et intra-abdominaux. En 1936, en Russie, Voronoy de Kiev a réalisé une

transplantation rénale à partir d'un donneur dont le type sanguin était B+ et d'un receveur O+. L'incompatibilité des groupes sanguins rend le succès d'une greffe impossible, mais malheureusement ce concept n'était pas encore développé au moment de cette expérience et le receveur n'a pas survécu³.

La notion de rejet en transplantation a été décrite en tant qu'évènement immunologique en 1944 avec Peter Medawar. Ces travaux sur des greffes de peau humaine et de lapins ont démontré que des greffes répétées à partir du même donneur étaient rejetées plus rapidement après chaque tentative de greffe additionnelle. Ces données ont permis de définir la sensibilisation et la spécificité du donneur^{6,7}. Après plusieurs essais infructueux, la première greffe rénale d'humain à humain qui a réussi a eu lieu entre 2 frères jumeaux au Brigham Hospital à Boston. Une greffe entre 2 jumeaux homozygotes est une *isogreffe*, puisqu'ils possèdent un système immunitaire identique. Une *allogreffe* concerne quant à elle 2 individus distincts avec un système immunitaire différent, alors qu'une *autogreffe* est produite sur une seule et même personne. Finalement, une greffe *héterotopique* est lorsqu'un organe est greffé en dehors de son endroit normal, par exemple dans le cas du rein qui peut être greffé dans la cavité abdominale et non au niveau retroréctal. Ainsi, le cas de la première greffe humaine a été un succès puisqu'il s'agissait d'une isogreffe. La transplantation a réussi à long terme, puisque le receveur a survécu 9 ans avant qu'il ne perde son greffon; de son côté, le donneur a survécu 50 ans^{1,8}.

Par la suite, le taux de survie du greffon a commencé à augmenter graduellement grâce au développement des premiers immunosuppresseurs (1962) et la découverte des antigènes humains des leucocytes (HLA), un élément qui sera abordé dans les prochaines sections³. Le premier essai clinique pour tester un immunosuppresseur, l'azathioprine, un inhibiteur de la biosynthèse des nucléotides, a été conduit en 1962. Lors de cet essai, on a observé que le taux de survie de l'allogreffe passait de 40 à 50% un an après la transplantation lorsque l'azathioprine était prescrite avec un corticostéroïde¹. Par la suite, l'arrivée de la cyclosporine au début des années 1980 a permis une percée majeure, faisant passer le taux de survie après 1 an de 70 à 80%¹. De nos jours, la transplantation est devenue le traitement de choix pour plusieurs insuffisances terminales d'organe. Il est maintenant possible de transplanter plusieurs organes solides comme le rein, le cœur, le foie, les poumons, le pancréas ou encore l'intestin, des possibilités qui n'étaient pas envisageables au début de la transplantation en l'absence des connaissances immunologiques actuelles.

1.2 L'étendue de la maladie rénale chronique dans la société

La maladie rénale chronique est un problème de santé en constante augmentation et qui nécessite un traitement adéquat. L’insuffisance rénale chronique est un problème de santé global affectant 10 à 16% de la population mondiale selon le critère de sévérité utilisée, avec des conséquences au niveau rénal et cardiovasculaire associées à une diminution de l’espérance de vie⁹⁻¹². La maladie rénale chronique se définit le plus couramment par un taux de filtration glomérulaire inférieur à 60 mL/min/1.73m² ou par la présence d’albuminurie (ratio albumine/créatinine > 30 mg/g) pour une durée minimale de 3 mois sans égard à la cause^{9, 10, 12}. Toute maladie ou tout processus qui influence la formation de l’urine par les reins peut mener à un dommage rénal aigu, lequel peut évoluer en maladie chronique¹². Le diabète est la première cause de maladie rénale chronique dans les pays industrialisés. Il est en augmentation dans plusieurs pays, particulièrement aux États-Unis¹⁰. Une étude menée en 1997 aux États-Unis estimait la prévalence de la maladie rénale chronique entre 4.2 et 9.1 millions de personnes et ce nombre ne cesse d’augmenter depuis¹².

L’insuffisance rénale chronique peut évoluer vers le stade d’insuffisance rénale terminale où le taux de mortalité augmente de façon considérable, de sorte que l’espérance de vie d’un patient en dialyse âgé de 30 ans est semblable à un individu de 70 ans dans la population générale¹⁰⁻¹². Le nombre de patients inscrits au sein d’un programme de soins pour une insuffisance rénale terminale aux États-Unis est passé de 10 000 en 1973 à 615 899 en 2011, une augmentation importante et coûteuse pour le système de santé (29 milliards en 2009)¹². Au Canada, une année de traitement en dialyse coûte 55 000 \$ de plus que le suivi en greffe pour chaque patient (2012)¹³. Ces données justifient l’importance de prévenir l’insuffisance rénale terminale et de diminuer le recours à la dialyse, ce qui est bénéfique à la fois au point de vue du patient que sur le plan économique pour la société. Nous verrons plus loin qu’un des facteurs limitants le « traitement » par la greffe est la perte prématuree du greffon, c’est-à-dire la courte durée de vie du rein greffé, qui fait en sorte qu’un jeune patient peut avoir besoin de 2, 3 ou même plus de greffes successives au cours de sa vie. L’accroissement des connaissances sur les mécanismes de rejet contribue donc à améliorer la condition des patients atteints d’insuffisance rénale terminale et également diminuer le fardeau pour la société. Il faut par ailleurs savoir que malheureusement, tous les patients atteints d’insuffisance rénale terminale ne peuvent être greffés en raison de plusieurs facteurs. Par exemple, certains ne sont pas aptes à subir une transplantation puisqu’ils sont trop malades pour subir la chirurgie, alors

que d'autres ne peuvent recevoir des anti-rejets puisqu'ils ont eu un cancer dans le passé. Enfin pour certains, le suivi rigoureux de la médication anti-rejet, essentielle à la survie du greffon, ne sera pas possible en raison d'une atteinte cognitive ou autre incapacité.

1.3 Situation actuelle pour le don et la pénurie d'organes au Canada et au Québec

À l'échelle nationale, la situation de la transplantation évolue vers la bonne direction mais le nombre d'organes disponibles demeure insuffisant pour les patients en attente d'une transplantation. Au Canada, depuis 2004, il y a eu une augmentation du nombre de donneurs décédés, qui est passé à 15.7 donneurs décédés par millions d'habitants, ce qui représente une augmentation de 22%. Le taux de donneurs vivants est quant à lui de 16.7 donneurs par millions d'habitants¹⁴. Au niveau national, c'est le Québec qui possède le plus haut taux de donneurs décédés avec 20.2 donneurs par million d'habitants en 2013¹⁵. En nombre absolu, il y a eu 513 organes transplantés donc 251 étaient des reins au Québec en 2013¹⁵. Le Canada et le Québec font plutôt bonne figure en ce qui a trait au taux de donneurs, par contre il n'en demeure pas moins qu'en 2012, 2450 patients étaient toujours en attente d'un rein au pays, de ce nombre, 245 patients adultes sont décédés ou ont été retirés de la liste d'attente parce qu'ils sont devenus trop malades pour être greffés¹³. Idéalement, une survie adéquate signifierait qu'une fois le patient transplanté, celui-ci décèderait avec un greffon fonctionnel. Malheureusement, comme nous l'avons abordé brièvement ci-dessus et le détaillerons dans les prochaines sections, ce n'est pas la réalité actuelle. Au Canada, il y actuellement 17 000 greffés rénaux et une moyenne de 5 500 nouveaux cas de maladie rénale en phase terminale par année, avec une augmentation de l'incidence annuelle légèrement supérieure à 1%¹³. Au-delà de l'augmentation du taux de donneur, il y a donc un besoin évident d'améliorer la survie du greffon.

1.4 Situation actuelle de la survie du greffon

Malgré des gains importants sur la survie à court terme, la survie des greffons rénaux à long terme stagne. Aux États-Unis, les données de l'United Network for Organ Sharing (UNOS) montrent que la survie d'une transplantation rénale est de plus de 90% à un an. Par contre, 4 ans plus tard, environ 30% des patients transplantés auront perdu leur greffon ou seront décédés avec un greffon fonctionnel et la perte de greffon par la suite demeure à environ 4% de perte par année^{16, 17}. Au

Canada, les résultats sont meilleurs, néanmoins le plus récent rapport du registre de remplacement des organes du Canada (CORR) a montré que la survie du greffon après 5 ans pour les receveurs d'un rein de donneur décédé adulte avait seulement augmenté de 79.2% pour les patients transplantés en 2003, à 83.2% en 2008¹³. Au Canada et ailleurs, le taux annuel de mortalité suivant un échec de greffe rénale augmente de plus de 3 fois^{16, 18, 19}. À cet égard, les patients ayant perdu un greffon bénéficiant d'une retransplantation de manière substantielle par rapport à l'option de demeurer en dialyse^{20, 21}. À la fin de 2005, 15% des patients sur la liste d'attente américaine pour un rein avant déjà été transplanté au moins une fois²¹. En raison de la courte durée de vie d'un organe transplanté et du haut taux de mortalité associé à la perte du greffon, le sujet de la perte prématuée du greffon représente un enjeu important pour la communauté néphrologique^{13, 22-24}. Bien que la transplantation soit le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale, la survie à long terme du greffon ne s'est pas améliorée autant que la survie à court terme, ainsi les patients plus jeunes devront recevoir plus d'une greffe dans leur vie et retourner en dialyse entre 2 transplantations, ce qui représente des coûts énormes pour le système de santé et hypothèque la santé du patient^{16, 25-27}.

1.5 Le rejet demeure la principale cause de perte prématuée de greffon

La stagnation de la survie à long terme du greffon peut être causée par plusieurs éléments incluant le rejet, l'infection, la néphrotoxicité ou la récurrence de la maladie rénale primaire^{25, 28}. Bien qu'il soit souvent ardu de déterminer la cause exacte de l'échec du greffe, une revue de plus de 1300 transplantés effectuée à la Clinique Mayo a démontré que l'alloimmunité demeure le mécanisme le plus commun menant à la perte du greffon 1 an après la transplantation. Dans cette cohorte, 12% des pertes de greffon étaient directement attribuables au rejet aigu irréversible, 20% étaient secondaires à un rejet chronique actif et 9% étaient dus à l'atrophie rénale et la fibrose, probablement occasionnée par des épisodes réversibles de rejet²⁵. Des données récentes d'Edmonton, utilisant des méthodes plus sensibles que la Clinique Mayo pour l'étude de la détection des anticorps anti-donneur circulants (DSA), suggèrent que 64% des pertes de greffon seraient dues au rejet²⁹.

Ces données illustrent l'importance cruciale de mieux saisir le rejet à long terme et d'empêcher celui-ci, car en plus d'occuper une place considérable sur la liste d'attente, les patients qui ont déjà

subi une greffe sont plus à risque d'être sensibilisé aux antigènes HLA ce qui diminue leur chance de subir une autre transplantation et augmente leur risque de rejet pour les greffes subséquentes²⁶.

1.5.1 Classification de la pathologie du rejet

Le processus de rejet peut être résumé en 3 étapes générales :

- 1- Les alloantigènes sont reconnus sur le tissu étranger par les cellules immunitaires de l'hôte.
- 2- Une réponse alloimmunitaire est générée en réponse aux alloantigènes.
- 3- Le tissu transplanté est détruit³⁰.

Le rejet est d'abord classé selon le mécanisme en cause :

- 1- Rejet médié par les lymphocytes T, ou communément appelé rejet « cellulaire » (abrégé TCMR pour *T cell-mediated rejection* dans la littérature anglophone de transplantation)
- 2- Rejet médié par les anticorps ou « humoral » (abrégé ABMR pour *antibody-mediated rejection*)

Il peut également être classé en rejet aigu ou chronique, plus sur des critères histologiques que temporel, tel que nous le verrons. Le rejet hyperaigu est un concept important pour la compréhension du phénomène et nous l'aborderons brièvement, vu qu'il est rarement rencontré de nos jours.

Le TCMR/ABMR et aigu/chronique est le fruit d'un consensus établi pour la première fois en 1991 à Banff et publiée en détail en 1993. Il porte le nom de *Classification de Banff de la pathologie de l'allogreffe rénal* depuis cette conférence initiale en 1991 ; cette classification est révisée tous les deux ans lors du congrès dit « de Banff » même s'il se tient dorénavant à différents endroits à travers le monde. Le tableau 1 présente les critères de rejet de la classification de Banff établis en 2007 et qui ont donné la structure des catégories encore utilisées aujourd'hui avec des modifications mineures.

Table 3: Banff 97 diagnostic categories for renal allograft biopsies—Banff'07 update ^{1,2}

1. Normal
2. Antibody-mediated changes (may coincide with categories 3, 4 and 5 and 6)
Due to documentation of circulating antidonor antibody, and C4d ³ or allograft pathology
<i>C4d deposition without morphologic evidence of active rejection</i>
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, no signs of acute or chronic TCMR or ABMR (i.e. g0, cg0, ptc0, no ptc lamination). Cases with simultaneous borderline changes or ATN are considered as indeterminate
<i>Acute antibody-mediated rejection</i> ⁴
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of acute tissue injury, such as (Type/Grade):
I. ATN-like minimal inflammation
II. Capillary and/or glomerular inflammation (ptc/g >0) and/or thromboses
III. Arterial—v3
<i>Chronic active antibody-mediated rejection</i> ⁴
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of chronic tissue injury, such as glomerular double contours and/or peritubular capillary basement membrane multilayering and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy and/or fibrous intimal thickening in arteries
3. Borderline changes: 'Suspicious' for acute T-cell-mediated rejection (may coincide with categories 2 and 5 and 6)
This category is used when no intimal arteritis is present, but there are foci of tubulitis (t1, t2 or t3) with minor interstitial infiltration (i0 or i1) or interstitial infiltration (i2, i3) with mild (t1) tubulitis
4. T-cell-mediated rejection (TCMR, may coincide with categories 2 and 5 and 6)
<i>Acute T-cell-mediated rejection (Type/Grade):</i>
IA. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of moderate tubulitis (t2)
IB. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of severe tubulitis (t3)
IIA. Cases with mild-to-moderate intimal arteritis (v1)
IIB. Cases with severe intimal arteritis comprising >25% of the luminal area (v2)
III. Cases with 'transmural' arteritis and/or arterial fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells with accompanying lymphocytic inflammation (v3)
<i>Chronic active T-cell-mediated rejection</i>
'chronic allograft arteriopathy' (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell infiltration in fibrosis, formation of neo-intima)
5. Interstitial fibrosis and tubular atrophy , no evidence of any specific etiology
(may include nonspecific vascular and glomerular sclerosis, but severity graded by tubulointerstitial features)
Grade
I. Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy (<25% of cortical area)
II. Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy (26–50% of cortical area)
III. Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy/loss (>50% of cortical area)
6. Other: Changes not considered to be due to rejection—acute and/or chronic (for diagnoses see Table 14 in (42); may include isolated g, cg or cv lesions and coincide with categories 2, 3, 4 and 5)

¹The 2007 updates are underlined.

²All existing scoring categories (g, t, v, i, cg, ct, ci, cv, ah, mm) remain unchanged (42)

³Please refer to Table 2 and Figure 1.

⁴Suspicious for antibody-mediated rejection if C4d (in the presence of antibody) or alloantibody (C4d+) not demonstrated in the presence of morphologic evidence of tissue injury.

Table 1 : Critères de rejet, Banff 97 avec les mises à jour de 2007. Tiré avec permission d'*Am*

J Transplant (2008), Solez et al.

Puisque mon projet de maîtrise porte sur le rejet chronique humoral, ce type précis de rejet sera plus détaillé tandis que les autres seront décrits plus brièvement. On commencera par définir le rejet hyperaigu, aigu, chronique, cellulaire et finalement humoral.

1.5.2 Le rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu est devenu de plus en plus rare de nos jours en raison des tests de compatibilité effectués entre le donneur et le receveur avant la greffe ³¹. Il consiste en l'occlusion des vaisseaux du greffon par thrombose aiguë se développant dans les minutes ou les heures suivant la

restauration du flux sanguin dans l'organe³². Il est associé principalement aux DSA préformés contre les HLA, les antigènes de groupe sanguin ABO ou les antigènes exprimés à la surface des cellules endothéliales endommagées^{8, 32, 33}. Il y a 3 événements immunologiques dits « sensibilisants », susceptibles de faire développer des anticorps anti-HLA avant la greffe et pouvant mener à des DSA s'ils sont du même type que le donneur : la grossesse, la transfusion et une greffe antérieure. Les DSA circulants dans les vaisseaux sanguins de l'hôte au moment d'implanter le greffon, se lient à l'endothélium de l'organe greffé, activent localement le complément et le système de coagulation provoquant plusieurs réactions en chaîne^{34, 35}. Les molécules C3a et C5a du complément agissent comme des anaphylotoxines, produisant une chimiотaxie des cellules et molécules inflammatoires vers le greffon. Le complexe d'attaque membranaire (CAM) active et endommege quant à lui l'endothélium des vaisseaux sanguins du greffon. Le dommage endothérial massif expose la membrane basale, ce qui entraîne une activation plaquetttaire. L'activation des cellules endothéliales endommagées permet également la relâche du facteur de von Willebrand et de la P-sélectine préformés dans le cytoplasme endothérial. Ceci initie la formation et la stabilisation du bouchon plaquetttaire, ainsi que l'adhérence des neutrophiles et des monocytes à l'endothélium par une extravasation subséquente. Ainsi, l'endothélium passe d'une barrière protégeant les tissus extravasculaires de la circulation sanguine à une surface adhésive promouvant l'inflammation, mais surtout la coagulation massive des microvaisseaux³⁵. Le résultat final est une thrombose intravasculaire menant à une nécrose du greffon.³⁶. Pathologiquement, le rejet hyperaigu est caractérisé par l'obstruction des petits vaisseaux sanguins à l'intérieur du greffon, incluant les capillaires glomérulaires³⁵.

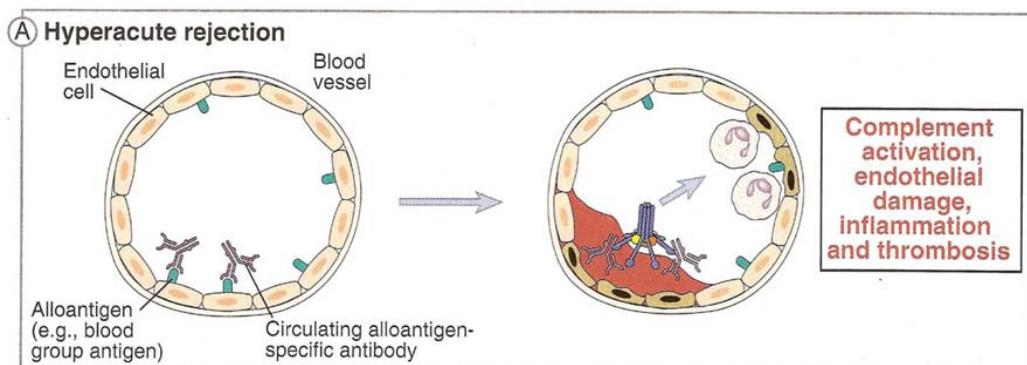


Figure 1 : Rejet hyperaigu. Tiré avec permission de *Cellular and Molecular Immunology 6th edition (2007)*, Abbas.

1.5.3 Le rejet aigu

Depuis 20 ans, on observe une diminution encourageante du rejet aigu dans les 12 premiers mois suivant la transplantation³⁷. Contrairement au rejet hyperaigu, le rejet aigu peut être traité à l'aide d'immunosuppresseurs et est donc potentiellement réversible³⁸. Par convention, le terme aigu réfère à l'aspect histologique où l'on observe une infiltration de leucocytes dans le greffon, soit dans les tubules (tubulite), l'interstitium (inflammation interstitielle), les glomérules (glomérulite) ou les capillaires péri-tubulaires (capillarite). Ainsi, un rejet aigu peut survenir à tout moment après la greffe. Il s'agit d'une réponse allogénique qui peut être médiée autant par les lymphocytes T menant au TCMR aigu, que par les anticorps menant à l'ABMR aigu; le rejet peut également être mixte³². L'utilisation des immunosuppresseurs spécifiques aux cellules a permis de diminuer de façon marquante le taux de rejet cellulaire aigu, mais de façon beaucoup moins significative le rejet aigu de type ABMR, appelé anciennement humorale³¹. Bien que le rejet aigu soit très bien prévenu de nos jours avec l'immunosuppression, il peut être encore présent chez environ 5 à 10% des individus transplantés dans la première année suivant la greffe. Puisqu'il peut être cellulaire ou humorale, le rejet aigu sera expliqué plus en détail dans les sections abordant le rejet cellulaire et le rejet humorale respectivement.

1.5.4 Le rejet chronique

Le rejet chronique survient en général tardivement, mais peut être observé aussi tôt que 2 mois suivant la transplantation³². Sa définition est histologique ; il se présente par des lésions tissulaires chroniques telles la duplication des membranes basales endothéliales, qui témoignent d'un dommage répété à l'endothélium. Le rejet de type chronique peut coexister avec le rejet aigu au sein du greffon ; ceci survient lorsqu'on observe simultanément les deux types de lésions. Dans le cas du rejet de type humorale, on parle alors de rejet « ABMR chronique actif ». Bien que la définition soit histologique, on distingue souvent le rejet chronique du rejet aigu par une absence de détérioration rapide de la fonction rénale. Actuellement, les immunosuppresseurs sont assez efficaces pour traiter le rejet aigu, mais le sont peu pour le rejet chronique, particulièrement l'ABMR chronique, qui provoque des dommages tissulaires irréversibles compromettant la survie du greffon à moyen terme^{31, 39, 40}. La biopsie rénale est nécessaire afin de distinguer le rejet des autres causes de dysfonction du greffon, comme la néphrotoxicité des immunosuppresseurs ou l'infection³⁶. Le rejet cellulaire chronique sera abordé dans la prochaine section portant sur le rejet

cellulaire en général. Mon projet de maîtrise porte principalement sur le rejet ABMR chronique, celui-ci sera donc discuté en détail dans une prochaine section.

1.5.5 Le rejet cellulaire

Le rejet cellulaire est mieux contrôlé de nos jours en raison du développement des agents immunosuppresseurs efficaces pour contrer principalement l'action des lymphocytes T, les acteurs centraux du rejet cellulaire. Les cellules T peuvent être activées selon 2 types d'alloreconnaissances, directe ou indirecte. L'alloreconnaissance survient lorsque le système immunitaire du receveur réagit contre les antigènes du donneur qui sont considérés comme du non-soi³². La voie est dite *directe* lorsque ce sont les cellules présentatrices d'antigènes (APC) *du donneur* elles-mêmes qui interagissent avec les cellules T du receveur. Ce type d'alloreconnaissance se produit plus souvent lors de la phase précoce suivant la transplantation, alors que les leucocytes du donneur, encore viables, migrent vers les ganglions lymphatiques de l'hôte. Le second type de reconnaissance, *indirecte*, survient lorsque non pas les cellules complètes, mais seulement les molécules HLA étrangères provenant de cellules immunitaires ou non immunitaires (par exemple les cellules endothéliales du greffon) sont transformées puis présentées par les APC *du receveur* à ses propres lymphocytes T CD4+⁴¹. Ce type de réponse survient donc en absence de cellules immunitaires du donneur. L'une ou l'autre de ces reconnaissances mène à l'activation des lymphocytes T spécifiques contre un HLA étranger.

Des études ont été réalisées avec des souris ne possédant pas de cellules T afin de déterminer leur rôle dans le rejet. Il a été observé que les souris ne pouvaient pas rejeter complètement une allogreffe non-MHC appariée, le processus de rejet pouvait seulement se poursuivre après la reconstitution des lymphocytes chez les souris³⁵. Aujourd'hui, certains tendent à démontrer que ce n'est pas le cas. Le système immunitaire inné serait apte à mener seul un rejet en l'absence d'une immunité adaptative fonctionnelle, l'explication de ce phénomène dépasse mon projet de maîtrise, mais il est important de le mentionner⁴².

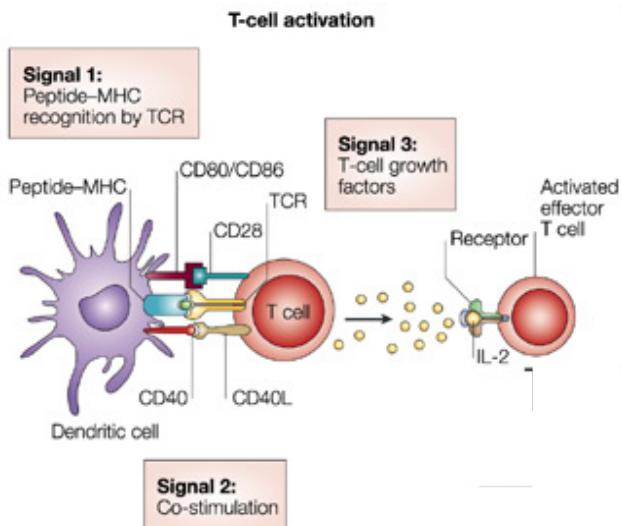


Figure 2 : Activation des lymphocytes T. Tiré avec permission de *Nature*, (2004) Ricordi et al.

La physiologie de l'activation des lymphocytes T dépasse le cadre de ce mémoire ; toutefois, on peut en résumer les principales étapes (figure 2). La reconnaissance du lymphocyte T naïf de son antigène spécifique (présenté par une APC) amène des changements d'activation à sa surface, notamment l'apparition de molécules de co-stimulation et le récepteur à IL-2 (CD25). Une fois que l'activation dite primaire des lymphocytes T a eu lieu, il y a une prolifération autocrine des cellules T grâce à l'expression du récepteur à l'IL-2. En effet, la cytokine IL-2 interagit avec son récepteur ce qui active plusieurs protéines kinases permettant la progression du cycle cellulaire où les cellules T se différencieront en lymphocytes T CD4+ ou CD8+. La boucle autocrine permet alors le développement et la prolifération des cellules T cytotoxiques spécifiques au greffon, tout en évitant la prolifération incontrôlée de lymphocytes T qui ne sont pas spécifiques; il s'agit du processus à la base de la réponse immunitaire dite adaptative³². Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques reconnaissent les antigènes de classe I sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), dont une explication détaillée suit dans une prochaine section. Les cellules T CD8+ s'activent, prolifèrent et puis deviennent des clones alloréactifs spécifiques à l'antigène, capable de relâcher des granzymes (sérines, estérase), des perforines et des cytokines toxiques comme le TNF- α , qui vont détruire les cellules du greffon³². Pour leur part, les lymphocytes T CD4+, qui reconnaissent les antigènes de classe II, participent au rejet cellulaire en activant la relâche de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IFN- γ et le TNF- α recrutant et activant ainsi d'autres cellules du système immunitaire comme les macrophages, les cellules NK, qui à leur tour peuvent endommager le greffon en relâchant plusieurs molécules cytotoxiques emmagasinées

dans des vésicules intracellulaires ³². Les cellules T CD4+ activent également les cellules B qui vont à leur tour endommager le tissu greffé par la production d'anticorps spécifiques aux antigènes de surface du greffon ³². La présence des cytokines augmente également le nombre de molécules HLA à la surface des cellules du greffon, ce qui accroît ainsi l'alloreconnaissance par les cellules effectrices du système immunitaire.

En plus de l'activation primaire et l'expansion clonale des cellules T, le processus à la base du rejet cellulaire, les APC秘ètent des cytokines et chimiokines qui vont induire l'expression endothéliale de molécules d'adhésion. Ces molécules vont attirer des cellules immunitaires au site de rejet et ceux-ci pourront pénétrer l'endothélium en raison de sa perméabilisation provoquée par les cytokines et chimiokines ³².

Selon la classification de Banff, le rejet TCMR aigu se définit soit par : (1) une infiltration interstitielle significative avec des foyers de tubulite modéré ou sévère, (2) une artérite (infiltration artérielle de leucocytes) intime légère à modérée, (3) une artérite intime sévère qui touche au moins 25% de la lumière des vaisseaux, (4) une artérite transmurale et/ou un changement artériel fibrinoïde et de la nécrose au niveau de la média des cellules musculaires lisses accompagnées d'inflammation lymphocytaire ⁴³. Le rejet TCMR chronique est quant à lui défini par une artériopathie chronique de l'allogreffe, soit une fibrose artérielle au niveau de l'intima avec une infiltration de cellules mononucléaires et la formation d'une néo-intima ⁴³. Il est important de noter que ces deux types de rejet peuvent s'accompagner d'un rejet humorale, et mènent à la fibrose interstitielle et à l'atrophie tubulaire.

L'agent-clé de la thérapie immunosuppressive pour contrer le rejet cellulaire est l'inhibiteur de la calcineurine, soit la *cyclosporine*, utilisée depuis le début des années 80 ou le *tacrolimus*, molécule plus récemment développée et d'usage courant depuis plusieurs années. En inhibant la calcineurine, ces 2 agents bloquent la voie de NFAT, ce qui prévient la synthèse de l'IL-2 et d'autres cytokines produites par les cellules T activées; ils interfèrent donc avec l'activation des lymphocytes T CD4+ ⁴⁴. L'inhibition de la synthèse de l'IL-2 bloque la prolifération et la différenciation des cellules T. Plus spécifiquement, la cyclosporine forme un complexe avec une protéine isomérase nommée cyclophilin pour bloquer directement la calcineurine, une phosphatase intracellulaire, qui déphosphoryle NFAT découvrant le signal de localisation nucléaire lui permettant de transloquer au noyau. Le tacrolimus produit le même effet, mais forme plutôt un complexe avec la protéine de

liaison FK (le tacrolimus peut également porter le nom de FK506) et il est 100 fois plus puissant que la cyclosporine à titre d'agent immunosuppresseur⁴⁴.

1.6 Le rejet humorale

Le rejet humorale est actuellement le type de rejet pour lequel les connaissances mécanistiques sont les moins complètes et dont les traitements sont les moins efficaces. Au tout début de la transplantation, les connaissances sur le rejet humorale étaient limitées au rejet hyperaigu, dû à des anticorps préformés du receveur contre des antigènes du donneur^{45,46}. De nos jours, le donneur et le receveur subissent des tests de compatibilité afin d'éviter ce typer de rejet. Jusqu'à tout récemment, il y avait un manque d'outils diagnostiques pour identifier le développement d'anticorps anti-donneur *de novo* chez le receveur (développées suite à la greffe, par opposition aux anticorps préformés présents avant la transplantation et causant le rejet hyperaigu) ainsi que de marqueurs en pathologies pour mettre en évidence le dommage tissulaire dû aux anticorps dans le greffon. Ainsi, le rejet humorale a plus ou moins été ignoré par la communauté scientifique au cours des 30 premières années de la transplantation. Grâce aux percées dans la détection des anticorps circulants et au développement du marquage de la composante du complément C4d dans le greffon (nous y reviendrons plus loin), on sait maintenant que le rejet humorale est la cause principale de rejet à long terme^{26,47}. Le rejet humorale a été reconnu initialement dans des cas de transplantations rénales, puis dans des transplantations de cœur, de pancréas et de poumons³³.

Contrairement au rejet cellulaire, qui survient plus rarement après plus de 5 ans de greffe, le rejet humorale peut apparaître tardivement après la greffe⁴⁵. La définition du rejet humorale, dit ABMR, a subi plusieurs modifications depuis 1991. À ce moment, la rencontre de Banff a statué qu'il était important d'avoir une interprétation standardisée de la biopsie de l'allogreffe rénale afin de guider le traitement thérapeutique et établir des points de références objectifs pour des fins d'études cliniques et de recherche fondamentale⁴⁸. La rencontre de Banff en 2001 a, elle aussi, été une conférence majeure où l'on a alors essentiellement défini l'ABMR par : (1) la présence de DSA circulants, (2) une évidence morphologique de dommage tissulaire inflammatoire aigu à l'endothélium soit glomérulaire ou capillaire sous forme de leucocytes adhérents aux cellules endothéliales (qu'on appelle soit glomérulite ou capillarite, voir figure 3 et 4) un marquage du facteur C4d du complément positif (figure 4). Le C4d étant un sous-produit de la dégradation du C4 qui forme un lien covalent avec l'endothélium, sa présence dans le greffon est une évidence

indirecte qu'il y a eu activation de la voie classique du complément, et donc nécessairement une interaction préalable entre un anticorps et l'endothélium sous-jacent. Comme il sera discuté plus tard, on ne possède pas encore d'agent thérapeutique efficace contre ce type de rejet. On utilise actuellement des thérapies toxiques qui visent soit à retirer les immunoglobulines du sang (par plasmaphérèse), soit à les lier par administration d'immunoglobulines par voie intraveineuse ou soit à inhiber leur production (par anticorps monoclonal anti-lymphocyte B)³¹. Malheureusement, la rémission est souvent de courte durée et les effets secondaires sont majeurs (infections et cancer).

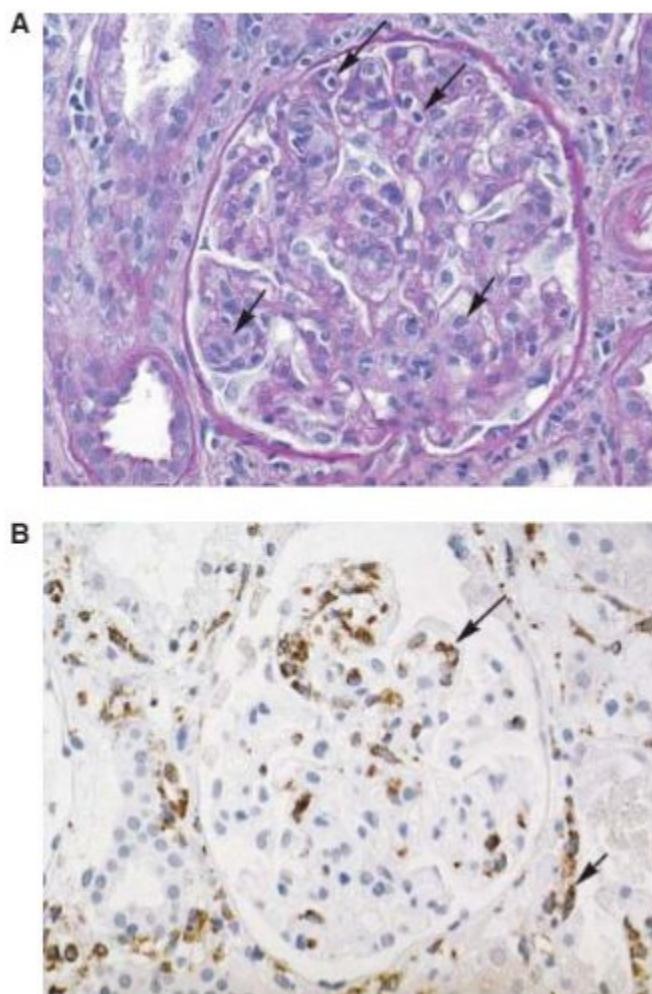


Figure 3 : Coupe histologique illustrant la glomérulite dans un capillaire. (A) Infiltration de cellules mononucléées et gonflement des cellules endothéliales. (B) Marquage à l'immunoperoxidase pour les monocytes et les macrophages. *Tiré avec permission de Am J Transplant (2003), Racusen et al.*

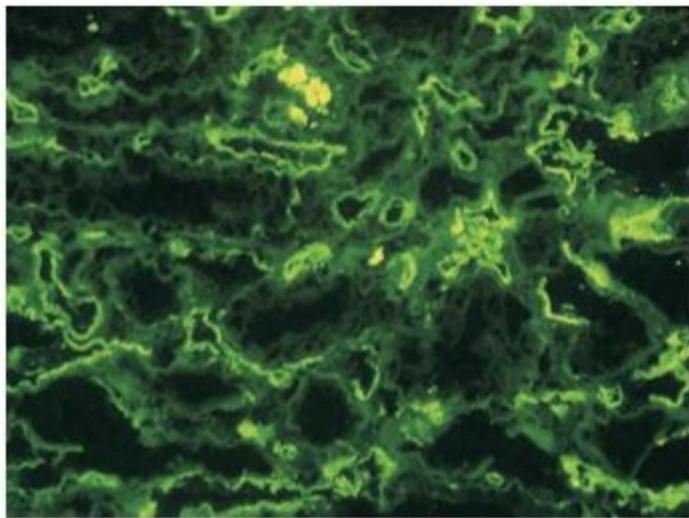


Figure 4 : Marquage du facteur C4d par immunofluorescence. Tiré avec permission de *Am J Transplant* (2003), Racusen et al.

Pour sa part, le rejet ABMR *chronique* a été décrit pour la première fois en 2001²⁶ par la même évidence de C4d tissulaire et de DSA circulants, mais cette fois avec une évidence morphologique de dommage tissulaire chronique, soit le «double contour» glomérulaire (témoignant de cycles de dommage et réparation successifs de l'endothélium, aussi appelé glomérulopathie du transplant) et/ou une multi-lamellation de la membrane basale des capillaires péri-tubulaires⁴⁹. Ainsi, on constate qu'il y a eu des progrès considérables dans la méthode de diagnostic de l'ABMR entre 1997 et 2007.

Table 2: Revised (Banff 2013) classification of antibody-mediated rejection (ABMR) in renal allografts

Acute/active ABMR; all three features must be present for diagnosis^{1,2}

1. Histologic evidence of acute tissue injury, including one or more of the following:
 - Microvascular inflammation ($g > 0^3$ and/or $ptc > 0$)
 - Intimal or transmural arteritis ($v > 0^4$)
 - Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause
 - Acute tubular injury, in the absence of any other apparent cause
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following:
 - Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections)
 - At least moderate microvascular inflammation ($|g + ptc| \geq 2^5$)
 - Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated⁶
3. Serologic evidence of donor-specific antibodies (DSAs) (HLA or other antigens)

Chronic, active ABMR; all three features must be present for diagnosis^{1,7}

1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including one or more of the following:
 - Transplant glomerulopathy (TG) ($cg > 0^8$, if no evidence of chronic thrombotic microangiopathy)
 - Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (requires EM)⁹
 - Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes¹⁰
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following:
 - Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections)
 - At least moderate microvascular inflammation ($|g + ptc| \geq 2^5$)
 - Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated⁶
3. Serologic evidence of DSAs (HLA or other antigens)

C4d staining without evidence of rejection; all three features must be present for diagnosis¹¹

1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections)
2. $g = 0$, $ptc = 0$, $cg = 0$ (by light microscopy and by EM if available), $v = 0$; no TMA, no peritubular capillary basement membrane multilayering, no acute tubular injury (in the absence of another apparent cause for this)
3. No acute cell-mediated rejection (Banff 97 type 1A or greater) or borderline changes

cg, Banff chronic glomerulopathy score; EM, electron microscopy; ENDAT, endothelial activation and injury transcript; g, Banff glomerulitis score; GBM, glomerular basement membrane; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; ptc, peritubular capillary; TCMR, T cell-mediated rejection; v, Banff arteritis score.

¹For all ABMR diagnoses, it should be specified in the report whether the lesion is C4d-positive (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections; C4d > 0 by IHC on paraffin sections) or without evident C4d deposition (C4d0 or C4d1 by IF on frozen sections; C4d0 by IHC on paraffin sections).

²These lesions may be clinically acute, smoldering or subclinical. Biopsies showing two of the three features, except those with DSA and C4d without histologic abnormalities potentially related to ABMR or TCMR (C4d staining without evidence of rejection; see footnote 11, below) may be designated as "suspicious" for acute/active ABMR.

³Recurrent/*de novo* glomerulonephritis should be excluded.

⁴It should be noted that these arterial lesions may be indicative of ABMR, TCMR or mixed ABMR/TCMR. "v" lesions are only scored in arteries having a continuous media with two or more smooth muscle layers.

⁵In the presence of acute TCMR, borderline infiltrates or evidence of infection, $ptc \geq 2$ alone is not sufficient to define moderate microvascular inflammation and g must be ≥ 1 .

⁶At present the only validated molecular marker meeting this criterion is ENDAT expression (4), and this has only been validated in a single center (University of Alberta). The use of ENDAT expression at other centers or other test(s) of gene expression within the biopsy as evidence of ABMR must first undergo independent validation as was done for ENDAT expression by Sis et al (4).

⁷Lesions of chronic, active ABMR can range from primarily active lesions with early TG evident only by EM ($cg1a$) to those with advanced TG and other chronic changes in addition to active microvascular inflammation. In the absence of evidence of current/recent antibody interaction with the endothelium (those features in the Second Section), the term active should be omitted; in such cases DSA may be present at the time of biopsy or at any previous time posttransplantation.

⁸Includes GBM duplication by EM only ($cg1a$) or GBM double contours by light microscopy.

⁹ ≥ 7 layers in one cortical peritubular capillary and ≥ 5 in two additional capillaries (17), avoiding portions cut tangentially.

¹⁰While leukocytes within the fibrotic intima favor chronic rejection, these are seen with chronic TCMR as well as chronic ABMR, and are therefore helpful only if there is no history of TCMR. An elastic stain may be helpful as absence of elastic lamellae is more typical of chronic rejection and multiple elastic lamellae are most typical of arteriosclerosis, although these findings are not definitive.

¹¹The clinical significance of these findings may be quite different in grafts exposed to anti-blood-group antibodies (ABO-incompatible allografts), where they do not appear to be injurious to the graft (18,19) and may represent accommodation. However, with anti-HLA antibodies such lesions may progress to chronic ABMR (20) and more outcome data are needed.

Tableau 2 : Critères de Banff 2013 pour le rejet ABMR. Tiré avec permission d'Am J

Transplant (2014) Haas et al.

Plus récemment, la rencontre de Banff en 2013 a ajouté à la complexité diagnostique de l'ABMR, qui déborde le cadre de ce mémoire dont le principal intérêt n'est pas clinique. On peut se contenter de souligner que le diagnostic évolue toujours autour des 3 mêmes critères conceptuels, à savoir la présence d'anticorps anti-donneurs dans le sang, un dommage tissulaire et une évidence d'interaction anticorps/endothélium dans le greffon (Tableau 2). La nécessité d'avoir les 3 critères a toutefois été remise en cause récemment, notamment par notre groupe de recherche^{39, 40, 50}. On a notamment observé que le pronostic des patients présentant 2 des 3 critères est souvent similaire à ceux qui présentent tous les critères. La difficulté technique à détecter les DSA sanguins et le caractère fluctuant de l'interaction anticorps/endothélium pourraient expliquer la présence d'ABMR avec des critères incomplets. Avec cette nouvelle classification, l'emphase est plutôt mise sur la relation entre les DSA et l'endothélium. Il est important d'approfondir les connaissances sur l'évolution de l'endothélium en présence des DSA, car cela pourrait permettre le développement de nouveaux outils diagnostiques et également de nouvelles cibles thérapeutiques.

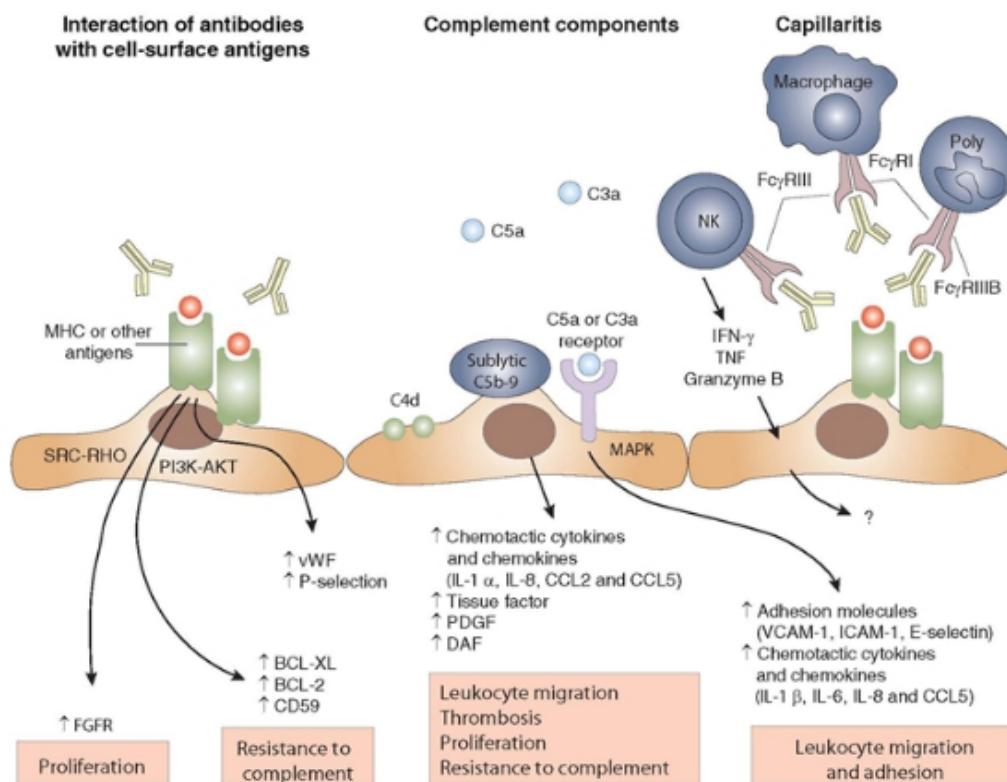


Figure 5 : Mécanismes de l'ABMR Tiré avec libre accès de Am J Transplant (2014), Djamali et al.

1.6.1 Physiopathologie de l'ABMR

Bien que toute la physiopathologique du dommage tissulaire lors du rejet ABMR ne soit pas élucidée, certaines pistes ont déjà mené à des hypothèses plausibles (figure 5). Notamment, une observation clinique importante à l'origine de mes travaux de maîtrise est que les DSA contre les molécules HLA-II seraient plus dommageables que ceux contre les molécules HLA-I^{29, 33}. Alors que de nos jours il n'y a à peu près plus de transplantation subissant un rejet hyperaigu (puisque l'on détecte maintenant les anticorps préformés contre les antigènes du donneur avant la greffe), le développement des anticorps DSA *de novo* spécifiques au HLA du donneur est par contre associé à un haut taux de rejet⁵¹. Nous allons aborder ici les concepts-clés qui seront nécessaires à la compréhension de mon travail au laboratoire :

- le système HLA, dont les DSA
- l'endothélium
- la glomérulopathie du transplant
- la thrombomoduline

1.6.2 Le système HLA et les anticorps anti-donneurs circulants (DSA)

Les anticorps DSA sont reconnus comme une barrière majeure au succès de la transplantation,⁴⁶ particulièrement les DSA dirigés contre les antigènes HLA-II²⁹. Le locus génétique le plus important impliqué dans le rejet d'organe est connu sous le nom de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Chez l'humain, le CMH se nomme le système HLA, car les premiers antigènes identifiés et caractérisés ont été découverts en utilisant des alloanticorps contre les leucocytes⁵². Le complexe HLA est situé sur le chromosome 6 humain et contient plus de 200 gènes, dont 40 encodent les antigènes des leucocytes ; plusieurs gènes au sein de ce complexe ne sont pas impliqués dans le système immunitaire. Il est reconnu comme étant le plus polymorphe des complexes dans le système génétique humain, toutefois son polymorphisme est essentiellement restreint à la fente de liaison antigénique pour la liaison des peptides (Figure 6)^{4, 36, 53-55}. Les HLA qui sont impliqués dans l'immunité sont répartis en 3 classes : I, II et III, qui sont structurellement et fonctionnellement différentes. Le rôle des molécules produites est de présenter des peptides courts aux lymphocytes T, un processus initiant le système immunitaire adaptatif⁵⁴.

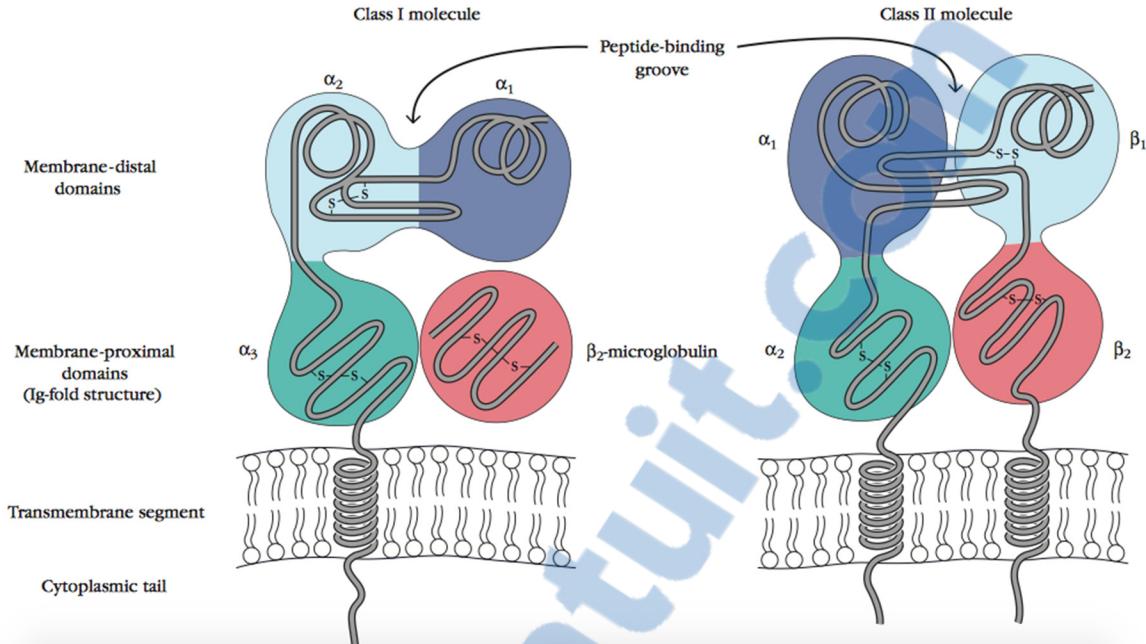


Figure 6 : Structure des molécules HLA de classe I et II. Tiré avec permission du livre Kuby Immunology (2007)

Tel qu'illustre à la figure 6, la molécule HLA de classe I est composée d'une chaîne, α et de la molécule de β -microglobuline. Les gènes de classe I codent pour la chaîne polypeptidique α de la molécule de classe I et c'est elle qui porte les polymorphismes formant la diversité du répertoire immunitaire HLA I. La molécule β est encodée par un gène sur le chromosome 15 qui se nomme β_2 -microglobuline, pour former une chaîne non-polymorphique. La chaîne α est constituée de 5 domaines, deux pour la liaison du peptide (α_1 et α_2), un domaine immunoglobuline (α_3) puis la région transmembranaire et la queue cytoplasmique. Au sein de la région HLA, il y a 20 gènes de classe I dont les plus connus, A, B et C. On retrouve les gènes de classe I exprimés par la plupart des cellules somatiques à différents niveaux dépendamment du tissu^{4, 53, 55, 56}.

L'architecture de la molécule HLA de classe II est différente de celle de classe I. Contrairement aux gènes de classe I, les gènes de classe II codent pour les 2 chaînes α et β qui présentent toutes deux des polymorphismes. Leur désignation sur le locus du chromosome 6 est composée de 3 lettres, par exemple DQA ; la première (D) pour indiquer la classe, la seconde (M, O, P, Q ou R) pour la famille et la troisième (A ou B) indique la chaîne (α et β respectivement). Chaque chaîne de classe II possède 4 domaines, le site de liaison au peptide (α_1 ou β_1), le domaine immunoglobuline (α_2 ou β_2), la région transmembranaire et la queue cytoplasmique.

Contrairement aux gènes de classe I que l'on retrouve dans la plupart des cellules humaines, les gènes de classe II sont restreints à un sous-groupe de cellules immunitaires incluant les cellules B, les cellules T activées, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales du thymus. Les molécules du CMH de classe II sont restreintes à ces cellules en raison de leur rôle hautement spécialisé dans la présentation d'antigène, un mécanisme qui est restreint aux cellules du système immunitaire^{4, 53, 55, 56}. Par contre, d'autres types cellulaires peuvent exprimer des molécules de classe II à leur surface en présence d'inflammation ou de dommage, comme les cellules endothéliales. Le système HLA possède également une classe III qui contient des gènes impliqués dans les composants du complément (C2, C4 et le facteur B), du TNF- α et d'autres molécules impliqués dans l'immunité^{36, 55, 57}. Ceux-ci sont toutefois non pertinents à la transplantation.

Les antigènes HLA-A, HLA-B et HLA-DR ont longtemps été reconnus comme des antigènes impliqués dans le dommage à l'allogreffon⁵⁵. Comme mentionné précédemment, plusieurs études évoquent un rôle plus dommageable des anticorps anti-HLA-II que HLA-I dans le rejet. Une étude d'Everly et al. rapporte que 68% des DSA *de novo* étaient dirigées contre les HLA-II, majoritairement HLA-DQ à 91%⁵⁸. Deux autres études rapportent quant à elles que la majorité des DSA sont contre HLA-DQ. Dans l'étude de Willicombe et al. 54% des DSA *de novo* étaient contre les antigènes HLA-DQ contre 73% dans l'étude de DeVos et al.^{59, 60}. Ainsi, les DSA anti-DQ sont de plus en plus reconnus comme étant les HLA-II produits de façon prédominante suite à une transplantation. Les patients qui ont des DSA HLA-DQ semblent plus à risque de glomérulopathie du transplant (GT)^{39, 61}. Actuellement, il n'y a pas d'hypothèse mécanistique probante expliquant pourquoi les anticorps anti-HLA-II sont plus associés au rejet ABMR et à la GT que les anticorps dirigés contre HLA-I⁶¹. C'est pourquoi il est impératif de comprendre leur mécanisme d'action afin de mieux traiter l'ABMR. Les dommages causés par le rejet de type ABMR sont initiés par les DSA⁶². Dans les trois premières décennies de la greffe, on pensait qu'il ne pouvait y avoir que des DSA préformés qui pouvaient endommager le greffon. Or on sait aujourd'hui que les DSA *de novo* peuvent surgir à tout moment après la transplantation, et ce chez 20 à 30% des patients transplantés^{26, 27, 33}.

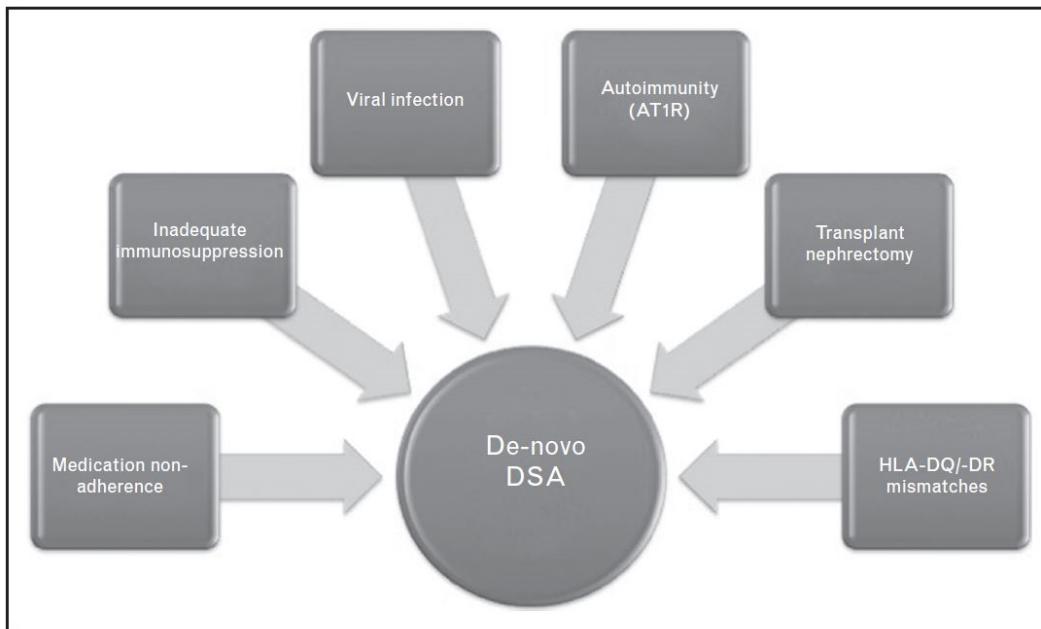


Figure 7 : Facteurs potentiels expliquant le développement des DSA *de novo* Tiré avec permission de *Curr Opin Organ Transplant* (2014), Jordan et al.

Les DSA ne sont pas tous égaux sur le plan de la pathogénicité. Les plus connus sont ceux qui reconnaissent les HLA, mais il faut savoir que les DSA peuvent également reconnaître d'autres molécules cibles à la surface de l'endothélium comme les chaînes A ou B du CMH de classe I (MICA et MICA B)^{8,26}. Plusieurs événements peuvent expliquer comment les DSA apparaissent *de novo*, entre autres ; une réduction excessive du traitement immunsupresseur suite à une infection sévère, à un cancer ou à une toxicité médicamenteuse ; une infection virale comme le virus Epstein-Barr ou le cytomégavirus qui peut précipiter un rejet, ou encore une prise de médication aléatoire par le patient.

Il faut également mentionner que la néphrectomie de transplantation est associée au développement massif d'anticorps anti-HLA. Bien que le mécanisme exact ne soit pas connu, l'hypothèse actuelle est que le tissu greffé agit comme un adsorbant des anticorps anti-HLA chez l'hôte. Son retrait limite donc l'adsorption des DSA. Pour cette raison, un greffon qui devient non fonctionnel n'est pas retiré, à moins d'une complication infectieuse ou un état inflammatoire sévère, ce qui est rare. Enfin, on doit savoir que les reins sont attribués de façon prioritaire selon l'appariement HLA, mais celui-ci n'est pas essentiel ; le temps d'attente constitue le critère d'attribution le plus important au Québec et ailleurs. Ainsi, le problème d'appariement des HLA (appelé communément « mismatch

HLA ») est une cause majeure de développement de DSA à long terme, et il n'a été reconnu que tout récemment (grâce aux nouvelles techniques de détection des DSA) que le problème est particulièrement important pour les classes II DQ et DR. (Figure 7)²⁷. L'allocation des organes est un sujet en soi qui dépasse le cadre de ce mémoire, mais contentons-nous de mentionner que le poids du temps d'attente versus l'appariement HLA est une balance entre les risques de décès dû au temps passé en dialyse versus le risque de rejet chronique dû à l'alloréactivité.

Finalement, il est nécessaire de souligner que ce ne sont pas tous les DSA qui fixent le complément ou qui causent de l'ABMR³¹. Quelles caractéristiques des DSA (concentration sanguine, type, fixation du complément, sous-type d'IgG) déterminent leur pronostic, il s'agit d'un domaine de recherche majeur en transplantation actuellement, auquel nous participons avec ces travaux.

1.6.3 L'endothélium

De par son contact constant avec le flux sanguin, l'endothélium de l'allogreffe constitue le premier contact et la première porte d'entrée pour le système immunitaire du receveur et constitue en soi une cible de dommage tissulaire menant au dysfonctionnement du greffon. Il est donc très important de connaître son état suivant la transplantation⁶³. Nonobstant le contexte de la greffe, les cellules endothéliales endommagées ou inflammées peuvent recruter des cellules immunitaires, augmenter ou initier leur expression d'antigènes HLA, induire l'angiogenèse en sécrétant des facteurs de croissance et initier la fibrose interstitielle⁶⁴. Ces mêmes mécanismes sont en cause dans le processus de rejet. Avant d'aborder le sujet plus en détail, il est important de réviser quelques notions de base sur l'endothélium.

Les cellules endothéliales forment une mince monocouche de cellules qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux du corps humain. Elles forment une barrière semi-perméable entre le sang ou la lymphe contenue à l'intérieur du vaisseau et les tissus environnants^{65, 66}. Dans l'ensemble du corps humain, l'endothélium recouvre plus de 1000 m² et est composé de 1 à 6 x 10¹³ cellules. En plus de son rôle comme barrière physique, l'endothélium possède d'autres fonctions réparties en 3 catégories : trophique, tonique et trafic. La modulation de l'homéostasie métabolique correspond à la *fonction trophique* tandis que la modulation de la dynamique vasculaire représente la *fonction tonique* ; finalement, la perméabilité vasculaire, la coagulation et l'extravasation cellulaire sont des *fonctions de trafic*. Au repos, l'endothélium maintient une balance précise entre la relâche de

facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs comme l'oxyde nitrique, les prostacyclines et l'endothéline afin de maintenir un tonus vasculaire, une pression et une circulation sanguine adéquate⁶⁵.

Un dysfonctionnement des cellules endothéliales tel qu'il peut survenir lors d'un rejet peut mener à une coagulation excessive de surface des microvaisseaux appelée microangiopathie. En effet, l'endothélium possède des mécanismes à la fois anticoagulants et procoagulants. Au repos, l'endothélium empêche l'activation des plaquettes à sa surface et inhibe les voies des facteurs tissulaires afin de permettre la rhéologie normale du flux sanguin⁶⁷. Dans des conditions physiologiques normales, l'endothélium exprime des inhibiteurs de la voie des facteurs tissulaires et de la thrombomoduline, une protéine anticoagulante, ce qui prévient l'activation des molécules coagulantes telles que le facteur X, la thrombine et la fibrine. En situation de stress, l'endothélium va transformer sa surface en un état procoagulant, en activant les facteurs tissulaires et la cascade de coagulation⁶⁵. En situation d'inflammation aiguë ou chronique, la perméabilité est augmentée pour permettre la diapédèse des cellules immunitaires. Par contre, une perméabilité excessive et prolongée peut avoir des effets nuisibles sur le tissu⁶⁵.

Plus précisément, parmi les dommages histologiques induits lors de l'ABMR, il peut y avoir présence de thrombose dans les capillaires et de nécrose fibrinoïde artérielle. Les DSA activent les cellules endothéliales en médiant la dégranulation des corps de Weibel-Palade contenus à l'intérieur des cellules endothéliales menant à la relâche de plusieurs médiateurs inflammatoires tels que la P-sélectine et le facteur de von Willebrand. En plus des DSA, les lymphocytes T CD8+, les macrophages, les neutrophiles, les cellules NK, le système du complément et de coagulation peuvent tous endommager l'endothélium et mener ultimement au rejet.

Il est donc primordial de mieux comprendre les interactions entre les DSA et l'endothélium lors du rejet chronique de type ABMR. Une meilleure compréhension de ces interactions pourrait mener à des améliorations quant à la condition des patients. Pour mon projet de maîtrise, j'ai travaillé plus particulièrement sur une protéine, la thrombomoduline dont les caractéristiques seront définies dans les prochaines sections. Le dernier concept qui reste à définir avant de s'intéresser à cette protéine est la glomérulopathie du transplant.

1.6.4 La glomérulopathie du transplant

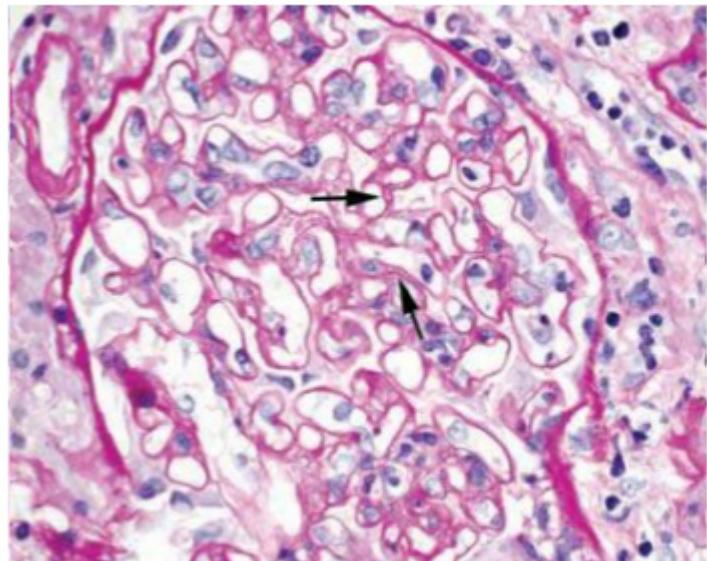


Figure 8 : Glomérulopathie du transplant chronique. Les flèches indiquent des exemples de double-contour. Tiré avec permission de *Am J Transplant* (2007), Solez et al.

La lésion chronique provoquée par un dommage endothérial répété aux glomérules dans le greffon est nommée la glomérulopathie du transplant (GT). Morphologiquement, il s'agit d'une lésion irréversible caractérisée en microscopie optique par une duplication de la membrane basale qu'on appelle « double contour » en néphropathologie (figure 8)^{61, 46, 68}. La duplication de la membrane basale est l'une des conséquences du dommage et de la réparation de l'endothélium ; ce phénomène se produit à l'intérieur des vaisseaux sanguins du glomérule⁶⁹. Elle débute par un changement du gonflement des cellules endothéliales et mésangiales avec une diminution de la perméabilité capillaire. Suite au dommage, l'endothélium se répare en produisant une nouvelle couche cellulaire par-dessus la précédente, ce qui résulte en l'apparition d'une nouvelle couche dans la membrane basale glomérulaire. Ce phénomène peut se produire de multiples fois, ce qui épaissit considérablement l'aspect de la membrane basale au microscope d'où le nom «double contour»^{69, 70}. Un dommage histologiquement similaire à la GT peut également se développer dans un greffon à la suite d'une infection à l'hépatite C ou d'une microangiopathie thrombotique préexistante^{68, 71}. Les lésions sont souvent absentes à la microscopie optique dans les phases précoces de GT, qui sont par ailleurs silencieuses cliniquement, ce qui contribue à retarder le diagnostic^{61, 68}. Par contre, la multilamellation de la membrane basale glomérulaire peut être détectée par microscopie électronique plusieurs mois avant que les lésions soient apparentes en microscopie optique. Ce critère (déttection par microscopie électronique) a été incorporé dans la plus récente édition de la

classification de Banff et il supporte la réalisation de biopsie précoce pour sonder l'allogreffe et observer s'il y a des changements morphologiques⁷².

Cliniquement, les patients greffés souffrant de la GT présentent éventuellement une protéinurie (qui peut même devenir d'ordre néphrotique), de l'hypertension et une détérioration de la fonction rénale du greffon sur quelques mois³⁹. Cette pathologie affecte le fonctionnement de l'allogreffe et mène ultimement à la perte de greffon, forçant ainsi les patients à retourner en dialyse²⁷. La GT possède l'un des pires pronostics des dommages histologiques chroniques, avec un taux de survie 5 ans après la transplantation de moins de 50% à partir du diagnostic⁴⁶. De plus, entre 4 et 20% des patients transplantés auront une GT soit après 1 an et 5 ans après la transplantation respectivement⁶¹.

La GT est un type de microangiopathie thrombotique (MAT) qui présente des lésions similaires avec d'autres pathologies, soit le syndrome hémolytique urémique (SHU) et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)v. Il s'agit de 2 pathologies favorisant une suragrégation plaquettaire qui mène à une microthrombose vasculaire endommageant la paroi des vaisseaux sanguins au même titre que la GT dans le rejet ABMR. Le SHU et le PTT sont actuellement mieux documentés que la GT, mais la similarité entre ces pathologies nous a permis d'analyser une protéine qui était plutôt connues dans le SHU et le PTT.

1.6.5 Les traitements potentiels de l'ABMR

Comme mentionné précédemment, quelques traitements sont disponibles pour désensibiliser et traiter l'ABMR, mais pour l'instant, très peu obtiennent du succès. La plasmaphérèse, l'échange du plasma, et des hautes doses d'immunoglobulines intraveineuses sont des exemples de techniques utilisées qui n'ont malheureusement pas rencontré le succès escompté^{26, 46}. Une des hypothèses pour traiter l'ABMR serait d'agir au niveau des plasmocytes, les lymphocytes B qui produisent les anticorps, cela permettrait de contrôler la production de DSA⁴⁶, par contre une inhibition complète des anticorps systémiques rendrait les patients susceptibles aux infections et aux cancers comme il est déjà le cas en raison des immunosuppresseurs utilisés pour empêcher le développement du rejet cellulaire.

Le marquage du facteur C4d du complément est un outil utilisé pour détecter l'activation du système du complément qui peut être détecté dans les capillaires péri-tubulaires par immunohistochimie. Bien que le marquage du C4d ne soit plus essentiel au diagnostic, il n'en demeure pas moins que le système du complément peut endommager le greffon⁷³. Les chimioattractants C3a et C5a, des facteurs effecteurs du complément, font partie de la cascade qui active le C5b ce qui permet l'assemblage du CAM composé de C5b-C9. Le CAM activé, cause de la nécrose locale et permet le détachement de l'endothélium de la membrane basale^{8, 73}. Pour prévenir les dommages causés par le complément dans le mécanisme de l'ABMR, l'anticorps monoclonal humanisé eculizumab est utilisé. Celui-ci possède une haute affinité pour le facteur C5 du complément ce qui permet de bloquer l'activation terminale du complément. Par contre, cet agent immunosuppresseur est associé à plusieurs effets secondaires comme en autre, une augmentation du risque d'infections⁷³.

Une étude clinique est présentement en cours afin d'évaluer l'utilisation du bortezomib, un inhibiteur des protéasomes déjà utilisé pour traiter le myélome multiple, dans les cas de rejet chronique ABMR. Le bortezomib cause l'apoptose des plasmocytes ce qui permettrait de réduire les DSA préformés en combinaison avec la plasmaphérèse (NCT01873157)⁷³. Une autre étude clinique évalue présentement le rituximab, un agent chimérique anti-CD20, qui est déjà approuvé par la FDA dans les cas de lymphome. Cet anticorps monoclonal est dirigé contre les cellules B ce qui provoque une déplétion des cellules B circulantes (NCT01095172)⁷³. Ces deux agents sont actuellement utilisés de façon « off-label » pour le rejet, c'est-à-dire que leur approbation pour la commercialisation n'a pas été faite pour cette indication précise.

Ainsi, il n'existe pas à ce jour de traitement efficace contre le rejet ABMR, c'est pourquoi il est primordial d'améliorer les connaissances au sujet de ce type de rejet afin de découvrir des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Les prochaines sections présentent une protéine qui pourrait avoir un potentiel thérapeutique dans le rejet ABMR et c'est pourquoi elle a été étudiée durant mon projet de maîtrise.

1.7 La thrombomoduline

La thrombomoduline (TBM), aussi appelée CD141, BDCA3 ou fetomoduline est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 aux propriétés variées au sein de l'organisme. Son mécanisme multimoléculaire régule et intègre différents aspects critiques de plusieurs processus physiologiques importants comme la thrombose-coagulation, l'immunité innée, l'inflammation et la prolifération cellulaire, ce qui lui permet de protéger l'organisme contre les différentes agressions potentielles^{66, 74-76}. Son rôle principal est de servir de récepteur pour la thrombine. La TBM a été découverte dans les années 80, selon des observations datant des années 60, par Charles T. Esmon et Whyte G. Owen., à partir de la protéine C activée (PCA) par la thrombine. Les chercheurs avaient isolé le précurseur de la PCA, la protéine C (PC) ce qui leur a permis de découvrir le cofacteur endothérial essentiel à son activation, la thrombomoduline⁷⁷.

La TBM est exprimée principalement par les cellules endothéliales et on la retrouve à la surface de tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques du corps humain à une densité de 50 000 à 100 000 molécules par cellules. Elle peut également être exprimée par les astrocytes, les cellules mésothéliales, les kératinocytes, les ostéoblastes, les plaquettes, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques d'où le nom BDCA3^{66, 78-80}. Elle est aussi exprimée dans les syncytiotrophoblastes et les trophoblastes du placenta humain⁸⁰. Bien qu'elle soit exprimée par toutes les cellules endothéliales, la concentration de TBM est plus élevée dans les capillaires que les gros vaisseaux sanguins⁷⁵.

Au niveau des cellules endothéliales, l'expression de surface de la TBM augmente en réponse à plusieurs molécules stimulantes : son ligand, la thrombine, l'acide rétinoïque, le VEGF, l'histamine, la HSP et via les agents qui augmentent l'AMPc intracellulaire. Elle diminue en présence d'endotoxines, d'IL-1, de TNF- α , d'homocystéine, de TGF- β et en situation d'hypoxie^{74, 78, 79}.

1.7.1 Régulation de l'expression génique de la thrombomoduline

L'expression génique de la TBM est régulée par le facteur de Krüppel 2 (KLF2) qui régule l'expression de molécules anti-inflammatoires, antithrombotiques et anti-fibrinotiques afin de maintenir les fonctions endothéliales. C'est le flux sanguin qui régule l'expression de KFL2, notamment via le micro-ARN miR-92a⁶⁶. Lorsque KFL2 est activé, il peut lui-même activer

l'expression génique de TBM⁸¹. L'expression de la TBM serait également régulée par le facteur nucléaire érythroïde 2 (NRF2) qui est un facteur de transcription principalement impliquée au niveau du stress oxydatif et qui réduirait l'expression de la TBM^{66,82}.

1.7.2 Organisation structurale

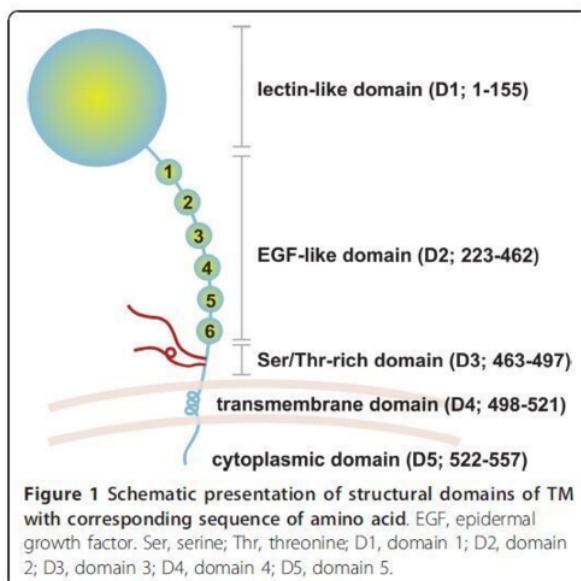


Figure 9 : Structure de la thrombomoduline. Tiré avec libre accès de *J Biomed Sci* (2012), Li et al.

Le gène humain de la TBM est situé sur le chromosome 20, il ne possède pas d'intron et il code pour une protéine d'un poids moléculaire de 70 à 100 kDa (figure 9). Cette glycoprotéine est composée de 557 acides aminés, après la délétion du peptide signal de 18 acides aminés. La protéine est répartie en 5 domaines. L'extrémité N-terminale (NH_2) (D1) est composé de 2 modules formant plus de la moitié du domaine extracellulaire de la protéine. Le module le plus distal par rapport à la surface cellulaire est composé de 155 acides aminées formant un complexe riche en lectines de type C. Le second module est rattaché au domaine suivant et est une région hydrophobe. Des études informatiques révèlent que ce domaine est composé de 2 hélices- α , 2 feuillets- β , un noyau compact hydrophobe et aromatique ainsi que 4 ponts disulfiques. Des études de microscopie électronique suggèrent également que la forme et l'éloignement de ce domaine de la surface membranaire favorisent les interactions efficaces avec d'autres molécules ou cellules immunitaires. Ce domaine

globulaire est principalement impliqué dans l'inflammation, l'adhésion cellulaire et la régulation de la croissance tumérisque⁸³.

Le deuxième domaine (D2), le mieux caractérisé à ce jour, est composé de 6 répétitions du facteur de croissance épidermique (EGF). Ce domaine forme une tige allongée favorisant les interactions protéine-protéine en raison des liens disulfiques présents au niveau de chaque répétition. Il est associé à la prolifération cellulaire et 4 de ces répétitions sont associées aux mécanismes anticoagulants de la TBM.

Le troisième domaine (D3) est composé d'une région riche en sérine et thréonine qui possède 4 sites de post-translation de glycosylation de type O (supporte l'attachement d'une moitié chondroïtine-sulfate) et qui permet l'optimisation des fonctions anticoagulantes de la protéine. Finalement, la TBM est composée d'une région transmembranaire (D4) bien conservée et d'une courte queue cytoplasmique (D5) où une seule cystéine permet la multimérisation de la molécule. La délétion de la région cytoplasmique n'aurait pas d'effet sur le développement fœtal, la survie ou la coagulation^{66, 76, 80, 83, 84}.

1.7.3 Rôles

1.7.3.1 Cascade de coagulation

Le rôle le plus connu de la TBM est à titre de récepteur pour la thrombine et de cofacteur dans l'activation de la PC. La liaison entre la TBM et la thrombine est de haute affinité ($K_d \approx 0.5 \text{ nmol}^{-1}$) et est à la base d'un système anticoagulant physiologiquement important qui protège les microvaisseaux des forces procoagulantes, proapoptotiques, et pro-inflammatoires. Un défaut dans ce système est associé à une augmentation des risques de thrombose. En effet, des études sur des souris transgéniques ayant une délétion spécifique de la TBM endothéliale (souris TBMLox^{-/-}) ont démontré que celles-ci avaient développé des thromboses spontanées sévères dans les artères et les veines avant de décéder^{66, 84, 85}. La PC est produite majoritairement par le foie et circule dans le plasma à une concentration de 3-5 g/mL. Sa forme mature est composée de 3 domaines dont l'un contenant un site de liaison pour le Ca^{2+} puisque l'activation de la PC est dépendante du calcium. La transformation de la PC en PCA est dépendante d'une source renouvelée de thrombine. En effet, lorsque la génération de thrombine cesse, l'activation de la PC cesse également⁸⁰. Lorsque la PC est activée, elle forme un complexe avec la protéine S afin de catalyser la protéolyse des facteurs Va et VIIIa. La dégradation de ces facteurs inhibe la formation de nouvelles molécules de thrombine et empêche la diffusion de la cascade de coagulation^{86, 87}. Ainsi, la thrombine ne peut

plus catalyser la conversion du fibrinogène en fibrine ni activer les facteurs V, VIII et XIII pour activer les plaquettes⁸³. En plus de l'activation de la protéine C, le complexe TBM-thrombine active la procarboxypeptidase B plasmatique, TAFI, un inhibiteur de la fibrinolyse, un processus physiologique qui dissout les caillots sanguins afin d'empêcher la formation de thrombose. La fibrinolyse est inhibée par la suppression des résidus de lysine sur le fibrinogène, ce qui diminue la conversion effective du plasminogène en plasmine⁸⁸.

La liaison de la thrombine à la TBM s'effectue via son exosite 1 aux motifs EGF-5,6. La PC se lie au motif EGF-4 et au domaine riche en sérine et thréonine. La thrombine se lie également à ce domaine via sa moitié chondroitine-sulfate, ce qui rend la liaison TBM-thrombine irréversible. Suite à la liaison de la thrombine, les motifs EGF-3 à 6 apportent un soutien additionnel en activant TAFI^{66, 76, 80, 83, 84}.

1.7.3.2 Inflammation

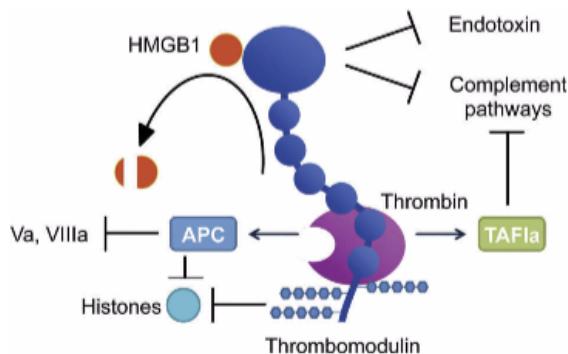


Figure 10 : Fonctions anti-inflammatoires de la thrombomoduline. Tiré avec permission d'*Expert Opin Ther Targets* (2015), Ito et al.

La régulation de la cascade de coagulation est le premier rôle qui a été découvert pour la TBM. Aujourd'hui, on reconnaît également l'implication importante de la TBM dans la régulation de l'inflammation, principalement via son domaine riche en lectine (D1) (figure 10). Les premières expériences *in vivo* qui ont démontré cette association ont été réalisées en 1999 par le groupe de Waugh⁸⁹. Par la suite en 2002, le groupe de Theilmeier a observé que des souris transgéniques avec de la TBM tronquée sans domaine NH₂, avaient un niveau normal de TBM et que celle-ci pouvait toujours activer la PC. Par contre, en présence d'endotoxine, ces souris avaient un taux de

survie diminué. Elles avaient un niveau de cytokines plus élevé, une adhésion et une extravasation des neutrophiles plus marquées causant ainsi plus de dommages tissulaires. Ces premières observations suggéraient un rôle anti-inflammatoire pour l'extrémité distale riche en lectines de la TBM ; depuis, ces observations ont été confirmées à plusieurs reprises^{79, 88}. Par contre, on sait aujourd'hui qu'il existe 2 types de mécanismes anti-inflammatoires pour la TBM, soit dépendant ou indépendant de la PCA. La PCA peut réguler l'inflammation en clivant la portion extracellulaire du récepteur activé de la protéase (PAR-1). Ce clivage provoque l'activation des voies de signalisations extracellulaires dans les cellules endothéliales et les leucocytes, ce qui inhibe des voies pro-inflammatoires et pros apoptotiques, régule simultanément à la hausse les voies anti-inflammatoires et anti-apoptotiques et stabilise la barrière endothéliale. La PCA inactive également les histones extracellulaires qui agissent à titre de médiateurs de la dysfonction endothéliale dans des conditions septiques. Selon la voie indépendante de l'APC, le complexe TBM-thrombine peut également inhiber la réponse en inflammatoire en liant HMGB1, cette liaison est, par contre, réversible contrairement à la thrombine et elle s'effectue via le domaine D1 riche en lectines^{84, 90}. Pour l'instant, les connaissances sur la TBM et l'inflammation ne sont pas aussi exhaustives que celles de son implication dans la coagulation. Par contre, les données actuelles montrent un rôle important de la TBM dans la répression de l'inflammation et il est important d'approfondir le sujet.

1.7.3.3 Système du complément

La TBM est également impliquée dans la régulation du système du complément. Elle peut supprimer le complément en accélérant l'inactivation du fragment C3b médié par le facteur I du complément. Une molécule activée par le complexe TBM-thrombine, TAFI, peut aussi inactiver les facteurs du complément anaphylatoxiques C3a et C5a^{66, 80, 84, 91}. Le domaine D1 riche en lectine serait également impliqué. En effet, chez des souris qui sont déficientes en ce domaine de la TBM, il y a une plus grande déposition de C3 dans le glomérule et ces souris développent un SHU plus sévère que les souris sauvage en réponse à une endotoxine ou la toxine Shiga^{84, 92}. À l'instar de du rôle de la TBM dans l'inflammation, il est important d'approfondir les connaissances sur l'implication de la TBM dans le système du complément.

1.7.3.4 Grossesse

La thrombomoduline est également essentielle au développement utérin, d'où son nom fetomoduline. En effet, des études sur des souris déficientes en TBM ont démontré que les

embryons décédaient *in utero* avant le développement d'un système cardiovasculaire fonctionnel. Sa présence au niveau des trophoblastes est également indispensable, car elle inhibe la coagulation à l'interface entre la mère et le fœtus. Finalement, on la retrouve dans des sites extravasculaires de l'embryon dans le neuroépithélium et l'épithélium du bouton pulmonaire^{66, 78, 83, 84}.

1.7.4 La forme soluble de la thrombomoduline

La TBM existe également sous forme soluble ; elle est clivée à partir de sa forme membranaire. À ce jour, la seule fonction qui lui a été proposée est comme marqueur de dommage endothérial dans le plasma et l'urine qui pourrait être dosé et utilisé dans certaines pathologies. En lien avec ci-dessus, une étude a démontré que la TBM soluble serait un facteur paracrine ayant un rôle important dans la protection endothéliale⁹³. La TBM est clivée en réponse à un stress ou une agression subie par les cellules endothéliales, par exemple l'action des neutrophiles ou des cytokines IL-1β et TNF-α en situation d'inflammation^{88, 94}. Plusieurs protéines ou cellules pourraient cliver le domaine extracellulaire de la TBM. La protéase rhomboïde RHBDL-2 cliverait après le domaine D2 riche en motifs épidermiques⁹⁵. La TBM pourrait également être clivée par des enzymes dérivés des neutrophiles, comme l'élastase, ou des métalloprotéases⁸⁰. Pour une personne en santé, le niveau plasmatique de TBM soluble se situe à 3100 ± 1300 pg/mL. Chez les patients souffrant de problèmes vasculaires, le niveau de TBM soluble peut augmenter entre 3000 et 300 000 pg/mL^{96, 97, 80}. À titre de référence, on retrouve en moyenne entre 50 et 100 000 molécules de TBM par cellule endothéliale vasculaire⁶⁶.

1.7.5 Potentiel thérapeutique

En raison de ses multiples implications au sein de différents systèmes cruciaux de l'organisme, la TBM est une protéine d'intérêt thérapeutique. Il y a actuellement une étude clinique sur une molécule de TBM recombinante comme traitement thérapeutique dans les maladies inflammatoires avec une coagulopathie, comme la coagulation intravasculaire disséminée. Ce traitement est déjà utilisé au Japon depuis 2008 pour les cas de coagulation intravasculaire disséminée. Il est actuellement en phase 3 d'étude clinique aux États-Unis (NCT01598831). Auparavant, il existait une molécule recombinante pour la PCA afin de traiter les pathologies comme la coagulation intravasculaire disséminée, mais elle n'est plus disponible en raison des risques de saignements extrêmes associés. Ces risques ne sont pas associés à la TBM recombinante, car celle-ci nécessite

tout de même la présence de la thrombine afin d'exercer son potentiel anticoagulant, contrairement à la molécule de PCA recombinante.

À l'heure actuelle, la TBM n'est pas une protéine étudiée dans les cas de rejet, mais plutôt dans des maladies au niveau du système de coagulation comme la coagulation intravasculaire disséminée. Par contre, plusieurs observations indirectes soutiennent l'hypothèse que la TBM pourrait jouer un rôle dans le rejet d'allogreffe, particulièrement dans le dommage endothérial que l'on observe dans l'ABMR. En effet dans le SHU atypique, 5% des cas sont causés par des mutations dans le gène de la TBM⁹². Chez ces patients, les mutations du gène TBM entravent la fonction normale de la protéine au sein des systèmes du complément et de la coagulation, menant ainsi à une microangiopathie similaire à la GT observée lors du rejet ABMR. En xénotransplantation, il est reconnu que la thrombose microvasculaire durant le rejet aigu ABMR est un obstacle considérable au succès⁹⁸ et que l'expression de la TBM réduit les risques de rejet⁹⁹. À ce jour, il n'y a pas d'études concernant la relation entre l'expression de la TBM et les anticorps anti-HLA.

En résumé, la transplantation rénale est le meilleur traitement existant pour l'insuffisance rénale terminale. L'insuffisance rénale chronique qui mène à l'insuffisance rénale terminale est en croissance dans le monde ce qui augmente le nombre de patients des listes d'attentes pour une transplantation. Par ailleurs, le rejet de greffe prématûr^{re} représente un problème pour le patient, puisque cela diminue sa survie. Il s'agit également d'un problème pour la société en raison des coûts importants engendrés par la dialyse. La principale cause de perte du greffon demeure le rejet, particulièrement le rejet ABMR chronique. Ainsi, il est donc primordial d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques pour prévenir le dommage du greffon en rejet ABMR. La prévention du dommage endothérial semble une voie intéressante puisque dans la physiopathologie du SHU-PTT, le dommage endothérial est prépondérant et cette maladie présente des similarités histologiques avec la GT. Par ailleurs, la TBM est une cible intéressante puisque l'on connaît déjà son implication dans le SHU. On ne connaît pas encore les effets directs des anticorps anti-HLA-II, mais on sait qu'ils sont associés à un moins bon pronostic clinique. Ainsi, il semblait tout naturel d'étudier les effets des anticorps anti-HLA-I versus anti-HLA-II sur la TBM afin de prévenir le dommage endothérial de type ABMR.

2. Objectif et hypothèse

La perte prématûrée du greffon est un obstacle majeur au succès de la transplantation souvent occasionnée par le rejet ABMR chronique pour lequel il n'existe pas de traitement efficace. La classification de Banff, modifié en 2013, suggère que le rejet ABMR chronique endomme l'endothélium glomérulaire par : (1) le développement de DSA *de novo* contre le donneur, (2) des évidences d'interaction entre les DSA et l'endothélium vasculaire, soit une inflammation microvasculaire ou la présence de C4d dans les capillaires péri-tubulaires ou une augmentation de l'expression de gènes associés au dommage endothéial et (3) des évidences morphologiques de dommage tissulaire chronique comme la glomérulopathie du transplant. Les DSA qui sont impliqués dans le rejet ABMR sont majoritairement des anticorps anti-HLA de classe I ou II. Les anticorps anti-HLA-II seraient associés à un plus grand dommage glomérulaire, mais pour l'instant le mécanisme sous-jacent est inconnu.

Mon projet de maîtrise propose une nouvelle approche pour expliquer le rejet ABMR. L'hypothèse générale est que les anticorps anti-HLA sont suffisants pour perturber l'hémostase de surface de l'endothélium glomérulaire ; il s'agit d'un mécanisme indépendant du complément, contrairement aux autres mécanismes de dommages tissulaires dus aux anticorps, notamment l'inflammation. Pour mon projet, j'ai étudié plus particulièrement les effets des anticorps anti-HLA I et II sur l'expression de la TBM, une glycoprotéine transmembranaire qui régule négativement la cascade de coagulation, participe au contrôle de l'inflammation et régule l'activation du système du complément. Une diminution de l'expression extracellulaire de la TBM pourrait mener aux lésions endothéliales glomérulaires associées à la glomérulopathie du transplant. Par ailleurs, nous croyons que cette diminution serait plus importante à la suite d'une stimulation avec des anticorps anti-HLA-II. L'intérêt pour cette protéine provient de son rôle dans le SHU atypique où des mutations sur le gène de la TBM bloquent les fonctions protectrices de la protéine occasionnant des lésions microangiopathiques semblables à celles retrouvées dans la glomérulopathie du transplant. Pour évaluer cette hypothèse mécanistique, j'ai utilisé un modèle *in vitro* d'endothélium glomérulaire humain et du sérum de patients transplantés rénaux.

L'objectif principal de mon projet est d'étudier l'expression de la TBM dans un modèle *in vitro* d'endothélium glomérulaire humain où les cellules expriment des HLA de classe I et II. Il permettra d'ajouter des connaissances pour déterminer si le moins bon pronostic des patients ayant des DSA

anti-HLA-II par rapport aux patients ayant des anti-HLA-I est dû à une différence dans le dommage endothérial glomérulaire occasionné directement par ces anticorps.

3. Résultats

3.1 Article

La thrombomoduline est une protéine anticoagulante et anti-inflammatoire exprimée par l'endothélium. Les DSA anti-HLA sont responsables du dommage endothérial de l'allogreffe durant l'ABMR. Nous avons caractérisé les différents effets des anticorps anti-HLA-I et II sur l'expression de la thrombomoduline. À l'aide d'un modèle *in vitro* d'endothélium glomérulaire humain, nous avons observé une augmentation membranaire de thrombomoduline avec les anti-HLA-I, mais pas les anti-HLA-II. Nous avons également observé une accumulation cytosolique avec les anti-HLA-II. Avec du sérum de patients transplantés, nous avons observé une association significative entre la présence de DSA anti-HLA-II et un faible taux de TBM sérique. Ces résultats indiquent que la liaison des anticorps anti-HLA-I et II produit des effets différents sur l'expression endothéiale de la TBM et également sur les taux sériques de TBM chez les patients transplantés.

Titre: Effects of anti-HLA antibodies on endothelial expression and serum levels of thrombomodulin in transplant recipients

Auteurs : Stéphanie Béland, Patrice Vallin, Olivier Désy et Sacha A. De Serres

Reconnaissance

Nous remercions tous les patients qui ont participé à cette étude. Nous remercions également Roth-Visal Ung pour son assistance technique.

Contribution des auteurs

Mme Stéphanie Béland a participé à l’élaboration du projet et réalisé les expériences. Elle a analysé et interprété les résultats obtenus. Elle a également participé à la rédaction de cet article.

M. Patrice Vallin a participé à l’élaboration du projet et l’interprétation des données.

Dr Olivier Désy a participé à l’élaboration du projet, à la réalisation des expériences, à l’analyse de données et à l’écriture de cet article.

Dr Sacha De Serres a participé à l’élaboration du projet, a supervisé l’analyse et l’interprétation des données et a participé à l’écriture de cet article.

TITLE**Effects of anti-HLA antibodies on endothelial expression and serum levels of thrombomodulin in transplant recipients**

Stéphanie Béland BSc, Patrice Vallin MSc, Olivier Désy PhD and Sacha A. De Serres MD SM FRCPC

Transplantation Unit, Renal Division, Department of Medicine, CHU de Québec, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

Address for Correspondence:

Sacha A. De Serres, MD SM FRCPC
Transplantation Unit, Renal Division
Department of Medicine
University Health Center of Quebec
Faculty of Medicine, Université Laval
11 Côte du Palais
Québec, QC, Canada G1R 2J6
Tel: 418-691-5464
Fax: 418-691-5757
sacha.deserres@crchudequebec.ulaval.ca

Running head: Endothelial thrombomodulin and anti-HLA antibodies

Word count: 248 (abstract), 3974 (main text)

Tables and Figures: 1 table, 5 Figures (3 color figures), 3 Supplemental Figures

Reference count: 63 references

Scientific category: Translational study – transplantation biology

KEY POINTS

- Anti-HLA I antibodies increase surface expression of endothelial thrombomodulin, while anti-HLA II leads to its intracellular accumulation.
- Transplant recipients with anti-HLA II donor antibodies have lower serum levels of thrombomodulin than do those with anti-HLA I.

ABSTRACT

Thrombomodulin (TBM) is an anticoagulant and anti-inflammatory transmembrane protein expressed on endothelial cells. Circulating donor-specific antibodies, particularly those against anti-human leukocyte antigen (HLA) class II, are an important feature of endothelial allograft damage during antibody-mediated rejection. Thus far, the effects of anti-HLA antibodies on the surface expression of TBM, and in particular, the differential effects of anti-HLA class I compared with those of anti-HLA class II, have not been well characterized. Here, we used human glomerular microvascular endothelial cells to examine TBM expression on anti-HLA-treated cells, and we tested sera from transplant recipients for soluble TBM. We found that whereas membrane TBM expression increased in a dose-dependent manner in the presence of anti-HLA-I antibodies, treatment with anti-HLA class II led to very little TBM expression on the endothelial surface. Neither stimulation with anti-HLA class I nor class II increased TBM levels in cell culture supernatants. However, when intracellular TBM was measured, we observed a cytosolic accumulation upon stimulation with anti-HLA class II. Furthermore, we found a significant association between the presence of circulating anti-HLA class II antibodies in transplant recipients and low serum levels of TBM. These results indicate that binding of anti-HLA class I and II produces different effects on the endothelial expression of TBM and on serum levels of TBM in transplant recipients. Anti-HLA class II antibodies may be associated with a prothrombotic state, which could explain the higher occurrence of microangiopathic lesions in the allograft and the poor outcomes observed in patients with these antibodies.

INTRODUCTION

Transplantation is the best treatment for end-stage renal disease.¹ The development of new therapeutic treatments has reduced acute rejection, but unfortunately has not had a major impact on long-term outcomes.^{2,3} The most important cause of early graft loss is chronic antibody-mediated rejection (ABMR),⁴ which is characterized by (1) circulating donor-specific antibodies (DSAs) (2) evidence of interaction between these antibodies and the glomerular endothelium as evidenced by light or fluorescence microscopy and (3) histological evidence of glomerular damage, such as glomerulitis or transplant glomerulopathy.⁵ Transplant glomerulopathy, the cardinal sign of chronic ABMR,⁶ is morphologically similar to the thrombotic microangiopathy observed in hemolytic-uremic syndrome (HUS).

Anti-HLA antibodies, the most frequent form of DSA, have a heterogeneous degree of pathogenicity. Clinically, DSAs directed against HLA-II (anti-HLA-II) are more frequently associated with ABMR and portend a poorer prognosis than DSAs against HLA class I (anti-HLA-I).⁷ Histologically, anti-HLA-II are more likely to be found in patients with transplant glomerulopathy.^{8,9} Blocking the complement system with an anti-C5 agent has recently been tested to prevent allograft damage caused by anti-HLA. Complement blockade at this level effectively abrogated the chemotaxis of leukocytes and their infiltration into the tissue in most patients, but it had a limited effect in the long-term prevention of transplant glomerulopathy.^{10, 11} These observations indicate the importance of the direct damage caused by anti-HLAs on endothelial cells, which has been poorly studied thus far.

Thrombomodulin (TBM, CD141, or BDCA3 fetomoduline) is a transmembrane glycoprotein expressed by a variety of cells including monocytes, neutrophils, dendritic cells, and endothelial cells.^{12,13} This multidomain protein is present in both membrane and soluble forms. Because of its unique structure, TBM is involved in the regulation of coagulation, complement, inflammation and cell proliferation.¹³. At the surface of the endothelium, TBM acts as a receptor for thrombin and blocks the coagulation cascade by modifying thrombin from a pro-coagulant to an anticoagulant state and activating protein C, which in turn inactivates several prothrombotic factors.^{14, 15}

Several indirect observations suggest that TBM may play a role in allograft rejection and in particular in the endothelial damage observed during ABMR. Five percent of cases of atypical HUS are due to a mutation in TBM.¹⁶ In these patients, mutations in the TBM gene hampers the normal

functioning of the protein against the complement system and the coagulation cascade, leading to a microangiopathy similar to transplant glomerulopathy. In xenotransplantation, microvascular thrombosis during acute ABMR is a major barrier to success,¹⁷ and TBM expression reduces the risk of rejection.¹⁸ To date, the effects of anti-HLA antibodies on human TBM are not well defined. We hypothesized that during the anti-HLA-mediated allograft rejection, the microangiopathic lesions observed could be related to their direct effect on TBM expression on glomerular endothelial cells. Therefore, we first examined the effect of anti-HLA-I and II on thrombomodulin expression in human glomerular endothelial cells. Second, we used a cohort of transplant recipients to determine the relationships among serum levels of TBM, allograft rejection and circulating anti-HLAs.

METHODS

Endothelial Cell Cultures

Microvascular endothelial cell lines. Primary human glomerular microvascular endothelial cells (GMVECs) were purchased from Cell Systems (Kirkland, WA), and primary human renal glomerular endothelial cells (HRGECs) were purchased from ScienCell (San Diego, CA). Briefly, endothelial cells were seeded on 9 mm by 9 mm glass coverslips (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ) coated with 1% gelatin in flat bottom 24-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) in Endothelial Cell Growth Medium MV (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS, PromoCell). Three days after plating, the cells were incubated with low serum medium MV (0.5% FCS) for 4 hours and then stimulated with IFN- γ (PeproTech, Rocky Hill, NJ) at 500 U/mL for 48 h to upregulate the surface expression of HLA-II antigens. Finally, the cells were washed and placed in low serum medium for 48 h before treatment with anti-HLA antibodies. Cells with passage number 4 were used in the experiments. Figure 1 illustrates a flow cytometry test conducted to determine the time period after IFN- γ stimulation at which HLA-II antigens were optimally expressed on the surfaces of the endothelial cells.

Treatment of endothelial cells with anti-HLA antibodies. For HLA-I treatment, the cells were treated with mouse IgG2a anti-human monoclonal HLA class I antibody clone W6/32 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). For HLA-II treatment, the cells were treated with mouse IgG2a anti-human monoclonal HLA-DR, DP, and DQ clone Tü39 (BD Biosciences, San Diego, CA) or clone WR18 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). The cells were treated with various concentrations of anti-HLA antibodies (0.1, 0.5, 1.0 or 2.0 μ g/mL) for 24 h. Treatment with TNF- α (PeproTech) at

10 ng/mL for 24 h was used as a positive control because this condition is known to down-regulate surface expression and increase the release of TBM.^{19,20} Culture supernatants were collected at the end of the experiment for all samples.

Fluorescence microscopy

Cells were grown and treated as described above and fixed with 3% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS for 10 min at room temperature. For intracellular staining, the cells were permeabilized with 0.5% saponin in TBS for 10 min at room temperature after fixation. After three washes in TBS, the cells were treated with blocking solution (TBS with 1% bovine serum albumin and 2% fetal bovine serum) for 30 min at room temperature. After the removal of the blocking solution, the cells were incubated with a mouse anti-human CD141 (clone 1A4 from BD Biosciences or clone M80 from BioLegend, San Diego, CA) at a dilution of 1:25 for 30 min at room temperature. The cells were then washed in TBS three times and stained with the secondary antibody, which was an Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA), at a dilution of 1:500 for 30 min at room temperature. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (1:1000; Invitrogen) for 20 min at room temperature. Coverslips were mounted in mounting medium (60% glycerol and 40% glycine buffer) on the microscope slides (Leica Biosystems, Ontario, Canada) and sealed with nail polish. For each condition, three photomicrographs were taken after a complete scan of the coverslip at 40X magnification using the IX83 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with an Olympus DP80 camera. All images were acquired using the cellSens Olympus software.

Flow cytometry

The cells were grown in flat bottom 6-well plates (Sarstedt) and treated as described above. Treated cells were detached with Accutase (BD Biosciences) at 37°C and resuspended in staining buffer (1% FBS/0.09% sodium azide in PBS) in a round bottom 96-well plate (Corning Inc., Corning, NY). Fc-receptors were blocked by adding FcR-Blocking Reagent (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) for 15 min at 4°C, and the cells were stained with FITC mouse anti-human HLA-DR, DP, and DQ (BD Biosciences) and APC mouse anti-human HLA-A, B, C (eBioscience, San Diego, CA) for 30 min at 4°C. The cells were acquired on an LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences). Analysis of the data was conducted using FlowJo version 10 (FlowJo LLC, Ashland, OR).

TBM measurement by Western Blot

First, membrane and cytosolic proteins were differentially extracted using the ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction kit according to manufacturer's protocol (Millipore, Billerica, MA). Extracts were dosed using BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific). Protein extracts were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The following primary antibodies and dilutions were used for analysis: mouse monoclonal TBM 1:500 (Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal β -actin 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and rabbit polyclonal PECAM 1:500 (Abcam). Immunostaining was done with goat anti-mouse 800 1:7500, goat anti-mouse 680 1:10000 and goat anti-rabbit 680 1:10000, all from Mandel Scientific, Guelph, ON. Membranes were detected with an Odyssey Imaging Systems (Li-Cor Biotechnology, Lincoln, NE). Image Studio Lite version 5.2 (Li-Cor) was used for the quantification.

TBM in kidney transplant recipients

Study population and sample collection. A total of 55 patients were enrolled in a single-center, observational cohort study with prospective collection of biological samples and clinical data. The participants were recruited between January 2012 and January 2015. They were invited to provide a blood sample at the time of a graft biopsy. Serum samples were obtained by centrifugation of the blood tube at 3100 rpm for 10 min at 4°C and stored at -80°C. For the purposes of this analysis, 37 patients were included, based on the presence of the three following histological diagnoses: ABMR, T-cell mediated rejection (TCMR) and non-rejection. Three patients with infections were used as positive controls. Table 1 describes the study population. This protocol was approved by the institutional ethics committee. All participants gave written informed consent at the time of enrollment. The clinical and research activities being reported are consistent with the Principles of the Declaration of Istanbul.

Histological and HLA antibody assessment. The biopsies were graded by the local attending kidney pathologists according to the Banff 1997 Classification of renal allograft pathology, which has since been updated.^{5, 21, 22} Pathologists were blinded to the results of the TBM measurements. Serum samples were screened for anti-HLA antibodies using Flow PRA beads (One Lambda Inc., Canoga Park, CA). Whenever the antibody screening was positive, the samples were tested for anti-HLA antibodies using flow cytometry with single antigen beads up to 2012 and Luminex single antigen beads from 2012 to present.

TBM measurements in cell supernatants and serum. Soluble TBM was measured in cell supernatants and patient sera at 1:1 and 1:50 dilutions, respectively, using the Human Thrombomodulin-BDCA-3 Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical analysis

TBM levels between groups were compared using the t-test or Mann-Whitney test. Statistical analyses were performed using SPSS Statistics version 23 (IBM, Armonk, NY, USA). All tests were two-tailed, and a P less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Endothelial TBM surface expression following anti-HLA treatment

To study the effect of anti-HLAs on the membrane expression of TBM, we first treated human glomerular microvascular endothelial cells (GMVECs) with IFN- γ for 48 h to induce expression of HLA-II on the cell surface. We confirmed the presence of both HLA-I and HLA-II on GMVECs following an additional 48 h of incubation under resting conditions (Figure 1). The cells were then treated with an anti-HLA-I or anti-HLA-II at concentrations that ranged from 0.1 to 2 μ g/mL, which are expected physiologic concentrations of circulating DSAs in patients.²³ Following treatment, GMVECs were stained to examine the surface expression of TBM by immunofluorescence.

Upon treatment with anti-HLA-I, TBM expression increased in a dose-dependent manner up to 1 μ g/mL (Figure 2A-B). By contrast, TBM expression was not significantly increased on GMVECs treated with anti-HLA-II, even at a concentration of 2 μ g/mL (Figure 2A-B). We observed a similar response when another human glomerular endothelial cell line was used (Supplemental Figure 1). Similar results were also found using a different detection antibody (Supplemental Figure 2) and another anti-HLA-II antibody (Supplemental Figure 3).

Next, membrane proteins were differentially extracted from GMVECs using non-denaturing conditions,²⁴ and TBM was measured on the membrane fraction by Western blot. Quantitative densitometry confirmed that treatment with anti-HLA-I produced a large amount of the protein, whereas only a minimal amount was found on the membrane lysates from anti-HLA-II-treated cells (Figure 2 C-D). We did not find TBM neither on the membrane of untreated, on isotype-treated nor on TNF- α -treated cells. Of note, we observed that the molecular weight of the protein isolated from anti-HLA-II-treated cells was 4-5K higher than with anti-HLA-I treatment. We also noted a second large band near 160 K in the well of the anti-HLA-I-treated cells. This band has been identified in the past as chondroitin sulfate bound to the TBM,²⁵ and it has been suggested that this sulfate group

enhances the antithrombin-dependent anticoagulant function of TBM.^{26, 27} Taken together, these data indicate that treatment with anti-HLA-I increased membrane TBM, whereas anti-HLA-II treatment had only a minimal effect.

Endothelial TBM release following anti-HLA treatment

To determine whether the difference in TBM expression on the endothelial surface observed between anti-HLA-I and II treatments was due to a release of TBM from the cells following treatment, we measured soluble TBM in the culture supernatants. As displayed in Figure 3, treatment with low concentration of anti-HLA-I led to a non-significant increase in soluble TBM, whereas treatments at higher concentrations produced levels similar to untreated cells. Treatment with anti-HLA-II at any concentration had no effect on soluble TBM levels. Treatment with TNF- α induced a significant release of TBM ($p<0.05$). Overall, these observations suggest that treatment of glomerular endothelial cells with either anti-HLA-I or anti-HLA-II had little effect on TBM secretion. Furthermore, the difference observed in supernatants collected after treatment with anti-HLA-II and TNF- α indicate that the absence of TBM found on the endothelial cell surface with both treatments (Figure 2) occurs through different mechanisms.

Endothelial intracellular TBM expression following anti-HLA treatment

Because we detected neither membrane nor soluble TBM in response to treatment with anti-HLA-II, we sought to explore whether TBM could be detected intracellularly. GMVECs were treated as above and permeabilized prior to staining for TBM. Figure 4 (A-D and H) shows that intracellular TBM expression in GMVECs increases at a concentration of anti-HLA-II up to 1.0 μ g/mL. The photomicrograph in Figure 4E shows little intracellular TBM in untreated cells. In contrast to the results observed with anti-HLA-II, treatment with TNF- α did not induce expression of TBM inside the cells (Figure 4F). Isotype control was negative (Figure 4G). To quantify intracellular TBM, we repeated the differential extraction procedure on GMVECs and collected the supernatant enriched in cytosolic proteins. For anti-HLA-I and anti-HLA-II treatments, Western blot analysis revealed bands similar to those found previously on the membrane extracts. However, the amount of protein following anti-HLA-II treatment here was significantly higher than the untreated condition and not different from the anti-HLA-I treatment (Figure 4 I-J). We found negligible TBM with IgG isotype and TNF- α . Staining for PECAM confirmed that there was no contamination between cytosolic and membrane fractions during the extraction. Taken together, these results indicate that anti-HLA-II treatment increases TBM that remains sequestered intracellularly.

Serum TBM in kidney transplant recipients

To study the clinical relevance of these *in vitro* findings, we measured serum TBM levels in 37 kidney allograft recipients who underwent serum collection and had circulating DSAs detected concurrently to a graft biopsy. Specifically, sera from 12 patients with histologic diagnoses of ABMR were compared with those from 12 patients with TCMR and 10 non-rejectors. Three additional patients with concurrent infection at the time of blood collection were used as controls for the study. Patients with ABMR, TCMR and non-rejectors were further classified according to the presence of circulating HLA-I and HLA-II antibodies. Patient baseline characteristics and DSA statuses are displayed in Table 1. The subjects were mostly middle-aged first transplant recipients undergoing triple immunosuppression maintenance regimen.

We first compared TBM levels among the ABMR, TCMR and non-rejector groups (Figure 5A). TBM levels of 3100 ± 1300 pg/mL have been reported in healthy volunteers and a range of 3000 and 300 000 pg/mL TBM has been observed in patients with myocardial infarction.^{13, 28, 29} Levels in the present cohort ranged between 7 243 and 22 805 pg/mL. Patients with ABMR had levels similar to those of non-rejectors but lower than those observed in patients with TCMR ($p<0.05$). We next compared TBM levels according to the DSA status. As shown in Figure 5B, TBM levels were lower in patients with anti-HLA-II compared with those in both patients with no DSAs or those with anti-HLA-I ($p<0.05$). Only one patient had both anti-HLA-I and II detected in his serum. His TBM level was similar to that of patients with anti-HLA-II only. Taken together, these data suggest that circulating anti-HLA-II DSAs are associated with lower serum levels of TBM when compared with TBM levels in patients without DSA or in patients with circulating anti-HLA-I.

DISCUSSION

In this report, we demonstrate that anti-HLA-I and anti-HLA-II have different effects on TBM expression in human glomerular endothelial cells. Specifically, we observed that treatment with anti-HLA-II led to intracellular TBM accumulation with little expression on the cell surface and no release into the culture supernatant. On the other hand, anti-HLA-I treatment produced a large and dose-dependent increase in the expression of membrane TBM. TBM inhibits the procoagulant activity of its ligand thrombin and is the cofactor of protein C. Therefore, it has one of the most potent antithrombotic activities on the endothelial surface, which we will try to work on in the next few months, using a flow chamber.^{30, 31} It is also involved in several inflammatory mechanisms in accordance with its various extracellular domains.^{16, 32} Our results suggest that anti-HLA-I can promote TBM expression, which can somewhat counteract the damaging effects of these antibodies

on endothelial cells. By contrast, data indicated that ligation of anti-HLA-II on the glomerular endothelium promotes the hemostatic balance toward pro-thrombosis, which may explain the predominance of microangiopathic lesions, including the so-called transplant glomerulopathy, observed with this class of antibodies.

To determine whether the absence of membrane TBM upon treatment with anti-HLA-II could be due to an increased cleavage from the cell surface, ELISA experiments were first performed. Our results suggest that the treatment of glomerular endothelial cells by anti-HLA-I or II does not significantly impact the concentration of soluble TBM in culture supernatants. Soluble TBM is not secreted by the endothelium but is cleaved upon cellular damage,³³ which is what we and others observed with TNF- α treatment.¹⁹ Because anti-HLA-II appeared to have no effect on the membrane TBM, we tested the hypothesis that it prevented the transport of TBM to the cell surface or increases its synthesis. Indeed, we observed that in anti-HLA-II-treated cells, TBM was confined intracellularly; suggesting an effect different from what was observed with anti-HLA-I.

These findings are novel because they characterize the effect of anti-HLA-I compared with anti-HLA-II on TBM, a component of the vascular endothelium that has not been well studied in this context. DSAs can generate endothelial damage through different mechanisms, the most studied being complement-mediated cytotoxicity and the recruitment of leukocytes leading to tissue infiltration and endothelial injury.^{34, 35} In recent years, the direct effect of anti-HLAs on the endothelial surface has focused on the exocytosis of vWF and P-selectin by anti-HLA-I.^{36, 37} Following anti-HLA-I stimulation, aortic and dermal endothelial cells release large amounts of vWF and P-selectin, which leads to monocyte recruitment.³⁶ However, the direct effect of anti-HLAs on TBM expression has not yet been reported.

Furthermore, we demonstrated that soluble TBM levels are low in kidney recipients with circulating DSAs, which adds clinical relevance to the *in vitro* data. In patients, we found lower levels of serum TBM in the presence of circulating anti-HLA-II. Although TBM levels have been used as a marker of injury,³³ it has been postulated that endothelial injury produces a focal loss of TBM, resulting in a local pro-thrombotic tendency.³⁸ Several potential therapeutic applications of recombinant TBM are currently being tested.³⁹ Studies have shown the importance of the TBM in multiple microangiopathic pathologies reminiscent of the endothelial lesions observed in transplant glomerulopathy. Missense mutations that prevent normal function of TBM have been associated with the microangiopathic anemia of atypical HUS.¹⁶ In meningococcal sepsis, endothelial TBM is down-regulated.⁴⁰ TBM seems to be a promising therapeutic target, and a clinical study is underway to assess the use of soluble recombinant TBM in cases of sepsis and coagulopathy (NCT01598831). Recent reports have described the use of recombinant TBM to prevent TMA or veno-occlusive

disease following bone marrow and liver transplantation.⁴¹⁻⁴⁴ In rat models of ischemic renal and liver injury (IRI), pre-treatment with soluble TBM markedly reduced endothelial permeability and leukocyte adhesion, improved microvascular red blood cells rheology and prevented organ dysfunction.⁴⁵⁻⁴⁷ In another rat model, recombinant TBM improved maternal death during pre-eclampsia, which can present with renal TMA.⁴⁸

The various effects of anti-HLA-I on the endothelium and the pathways involved are beginning to be unveiled.^{35, 49} The interaction between antigens and anti-HLA-I causes the phosphorylation and activation of several kinases and G proteins, including Rho, Src kinase and focal adhesion kinase (FAK). Activation of Src activates the PI3K/Akt pathway involved in cell proliferation and survival through mTOR.⁵⁰ Activation of Rho has been shown to lead to neointima formation and transplant vasculopathy.⁵¹ The effect of anti-HLA-I on the release of vWF and P-selectin seems to be related to calcium-mediated exocytosis of granules stored in Weibel-Palade bodies.³⁶ Anti-HLA-I also triggers the production of VEGF, which acts in an autocrine fashion to activate endothelial cells.⁵² Because it has been reported that VEGF induces TBM expression in a concentration-dependent-manner on the endothelial cell surface, via an increase of thrombin-dependent activated protein C, the effect observed here could be mediated by VEGF.⁵³ Whether TBM is upregulated via ERK is still not well defined. However, it is known that activating protein-1 (AP-1), a transcription factor downstream of the MAP kinases, is necessary for the transcription of TBM.¹⁵ Of note, the effect observed with TNF- α is due to a shutdown of TBM synthesis by a transcriptional mechanism involving NF- κ B, which does not seem to be at play for anti-HLAs.¹⁹

The interaction between anti-HLA-II and endothelial cells has been less well characterized. Thus far, the signaling of HLA-II has been mostly examined in antigen-presenting cells rather than in endothelial cells.⁵⁴ The HLA-II molecules have a short cytoplasmic tail without known signaling motifs, so that in B cells, signal transduction occurs following association with the Ig- α /Ig- β (CD79a/CD79b) heterodimer, leading to activation of the protein tyrosine kinase Syk.⁵⁵ Early studies on B and T cells demonstrated that incubation with anti-HLA-II triggered intracellular calcium flux, activation of phospholipase C and activation of the Src and Syk family, with some controversy concerning Src.^{56, 57} Recently, Lion *et al.* reported that, similar to anti-HLA-I, stimulation of endothelial cells with anti-HLA-II leads to the phosphorylation of Akt, ERK and MEK.⁵⁸ It is tempting to speculate that activation of the ERK pathway is responsible for the increase in TBM observed within the glomerular endothelial cells.

It has been shown that internalization of TBM by endocytosis, directed by the lectin-like domain of the molecule, can regulate its surface expression.^{59, 60} Thus, the accumulation of TBM observed intracellularly, without expression on the cell surface, could be due to an effect of anti-HLA-II on

this process. Early studies on TBM reported that homocysteine increases TBM mRNA and synthesis but disrupts its transit to the cell surface by an undefined mechanism.²⁵

In this regard, we observed that the protein produced following anti-HLA-II stimulation has a different molecular weight from that produced with anti-HLA-I treatment. We also noted that anti-HLA-I stimulation produces a 160 KD protein, previously identified as chondroitin sulfate glycan,²⁵ suggesting that an effect on glycosylation of TBM may be responsible for the difference observed. We may speculate that an alteration in either the glycosylation of the chondroitin sulfate glycosaminoglycan, or of the TBM proteoglycan itself, is related to the lack of transport to the membrane. Examination of the effect of anti-HLA-II on secretory pathways is underway.

This work has some limitations. The evidence presented here is based on *in vitro* data. However, we used patient samples from a well-defined prospective cohort and found a significant association between anti-HLA-II and TBM, which supports our experimental findings. Moreover, the experiments were robust across different cell lines, anti-HLA-II stimulation antibodies, TBM detection antibodies and experimental approaches. It would be difficult to use an animal model to test the hypotheses herein, in particular to compare the effect of anti-HLA-I with those of anti-HLA-II. TBM gene-deficient mice die at the embryonic stage.⁶¹ Still, viable homozygous mutant mice, the TBM^{pro/pro} mice, have been created and could potentially have been used since they exhibit a 100-fold decrease in the binding of thrombin when compared with wild-type mice.⁶² More importantly, however, there is currently no adequate *in vivo* model of MHC class II mismatch in transplantation to specifically study the effect of DSAs against this class *in vivo*.

In conclusion, these data suggest that anti-HLA-I and II have different effects on the surface expression of TBM in human glomerular endothelial cells, which could explain why the microangiopathic lesions seen in transplant glomerulopathy are predominantly observed in patients with anti-HLA-II. This study provides a rationale to further investigate the pathways involved in TBM expression following stimulation with anti-HLAs and to test TBM as a potential non-immunologic therapeutic target to prevent allograft rejection.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients who participated in the study. We would also like to thank Roth-Visal Ung for his technical support. S.A.D.S. was supported by a Kidney Research Scientist Core Education and National Training (KRESCENT) New Investigator Award from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Kidney Foundation of the Canada (KFOC) and a scholarship from the Fonds de la Recherche Québec Santé (FRQS). S.B. is the recipient of a

scholarship from CIHR and FRQS. This work received support from CIHR through the Operating Grant 201309 PCL-134068 and Canada Found for Innovation Grant 31981.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

S.B. performed research, analyzed data and wrote the paper. O.D. performed research and wrote the paper. P.V. managed human samples and performed research. S.A.D.S. designed the research, analyzed the data and supervised the research.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

Statement of conflicting interests: None

REFERENCES

- [1] Sayegh MH, Carpenter CB: Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004, 351:2761-6.
- [2] Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Schnitzler MA, Stewart DE, Cherikh WS, Wainright JL, Snyder JJ, Israni AK, Kasikie BL: OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant* 2014, 14 Suppl 1.
- [3] CORR: 2014 CORR Annual Report: Treatment of End-Stage Organ Failure in Canada, 2003 to 2012. <https://securecihica.estore/productFamilyhtm?locale=en&pf=PFC2481> 2014.
- [4] Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF: Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012, 12:388-99.
- [5] Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, Castro MC, David DS, David-Neto E, Bagnasco SM, Cendales LC, Cornell LD, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Farris AB, 3rd, Gibson IW, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nickeleit V, Randhawa P, Rodriguez ER, Rush D, Smith RN, Tan CD, Wallace WD, Mengel M, Banff meeting report writing c: Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014, 14:272-83.
- [6] Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, Park WD, Moore SB, DeGoey S, Griffin MD, Larson TS, Cosio FG: Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant* 2007, 7:2124-32.
- [7] Loupy A, Hill GS, Jordan SC: The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol* 2012, 8:348-57.
- [8] Issa N, Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Dean PG, Moore SB, DeGoey S, Stegall MD: Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* 2008, 86:681-5.
- [9] Lesage J, Noël R, Lapointe I, Côté I, Wagner E, Désy O, Caumartin Y, Aghazaiii M, Batal I, Houde I, De Serres SA: Donor-specific Antibodies, C4d and Their Relationship with the Prognosis of Transplant Glomerulopathy. *Transplantation* 2015, 99(1):69-76.
- [10] Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, Cosio FG, Gandhi MJ, Kremers W, Gloor JM: Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2011, 11:2405-13.
- [11] Burbach M, Suberbielle C, Brocheriou I, Ridet C, Mesnard L, Dahan K, Rondeau E, Hertig A: Report of the inefficacy of eculizumab in two cases of severe antibody-mediated rejection of renal grafts. *Transplantation* 2014, 98:1056-9.
- [12] Esmon CT, Owen WG: The discovery of thrombomodulin. *J Thromb Haemost* 2004, 2:209-13.
- [13] Conway EM: Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin Immunopathol* 2012, 34:107-25.
- [14] Chao TH, Tsai WC, Chen JY, Liu PY, Chung HC, Tseng SY, Kuo CH, Shi GY, Wu HL, Li YH: Soluble thrombomodulin is a paracrine anti-apoptotic factor for vascular endothelial protection. *Int J Cardiol* 2014, 172:340-9.
- [15] Martin FA, Murphy RP, Cummins PM: Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013, 304:H1585-97.
- [16] Delvaeye M, Noris M, De Vriesse A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del-Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zoja C, Remuzzi G, Conway EM: Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 2009, 361:345-57.
- [17] Cowan PJ: Coagulation and the xenograft endothelium. *Xenotransplantation* 2007, 14:7-12.

- [18] Kim H, Hawthorne WJ, Kang HJ, Lee YJ, Hwang JI, Hurh S, Ro H, Jeong JC, Cho B, Yang J, Ahn C: Human thrombomodulin regulates complement activation as well as the coagulation cascade in xeno-immune response. *Xenotransplantation* 2015, 22:260-72.
- [19] Sohn RH, Deming CB, Johns DC, Champion HC, Bian C, Gardner K, Rade JJ: Regulation of endothelial thrombomodulin expression by inflammatory cytokines is mediated by activation of nuclear factor-kappa B. *Blood* 2005, 105:3910-7.
- [20] Boehme MW, Deng Y, Raeth U, Bierhaus A, Ziegler R, Stremmel W, Nawroth PP: Release of thrombomodulin from endothelial cells by concerted action of TNF-alpha and neutrophils: in vivo and in vitro studies. *Immunology* 1996, 87:134-40.
- [21] Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al.: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999, 55:713-23.
- [22] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M: Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008, 8:753-60.
- [23] McMurtrey C, Lowe D, Buchli R, Daga S, Royer D, Humphrey A, Cate S, Osborn S, Mojsilovic A, VanGundy R, Bardet W, Duty A, Mojsilovic D, Jackson K, Stastny P, Briggs D, Zehnder D, Higgins R, Hildebrand W: Profiling antibodies to class II HLA in transplant patient sera. *Hum Immunol* 2014, 75:261-70.
- [24] Bunger S, Roblick UJ, Habermann JK: Comparison of five commercial extraction kits for subsequent membrane protein profiling. *Cytotechnology* 2009, 61:153-9.
- [25] Lentz SR, Sadler JE: Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 1991, 88:1906-14.
- [26] Bourin MC, Lundgren-Akerlund E, Lindahl U: Isolation and characterization of the glycosaminoglycan component of rabbit thrombomodulin proteoglycan. *J Biol Chem* 1990, 265:15424-31.
- [27] Nawa K, Sakano K, Fujiwara H, Sato Y, Sugiyama N, Teruuchi T, Iwamoto M, Marumoto Y: Presence and function of chondroitin-4-sulfate on recombinant human soluble thrombomodulin. *Biochemical and biophysical research communications* 1990, 171:729-37.
- [28] Califano F, Giovannillo T, Pantone P, Campana E, Parlapiano C, Alegiani F, Vincentelli GM, Turchetti P: Clinical importance of thrombomodulin serum levels. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2000, 4:59-66.
- [29] Ohlin AK, Morser J, Ohlin H: Soluble thrombomodulin antigen in plasma is increased in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Thromb Res* 1996, 82:313-22.
- [30] Weiler H, Isermann BH: Thrombomodulin. *J Thromb Haemost* 2003, 1:1515-24.
- [31] Dargaud Y, Scoazec JY, Wielders SJ, Trzeciak C, Hackeng TM, Negrier C, Hemker HC, Lindhout T, Castoldi E: Characterization of an autosomal dominant bleeding disorder caused by a thrombomodulin mutation. *Blood* 2015, 125:1497-501.
- [32] Ito T, Kakihana Y, Maruyama I: Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2015:1-8.
- [33] Luft T, Dietrich S, Falk C, Conzelmann M, Hess M, Benner A, Neumann F, Isermann B, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P: Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood* 2011, 118:1685-92.

- [34] Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M: Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant* 2014, 14:255-71.
- [35] Zhang X, Reed EF: Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009, 9:2459-65.
- [36] Yamakuchi M, Kirkiles-Smith NC, Ferlito M, Cameron SJ, Bao C, Fox-Talbot K, Wasowska BA, Baldwin WM, 3rd, Pober JS, Lowenstein CJ: Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:1301-6.
- [37] Valenzuela NM, Hong L, Shen XD, Gao F, Young SH, Rozengurt E, Kupiec-Weglinski JW, Fishbein MC, Reed EF: Blockade of p-selectin is sufficient to reduce MHC I antibody-elicited monocyte recruitment in vitro and in vivo. *Am J Transplant* 2013, 13:299-311.
- [38] Dusse L, Godoi L, Kazmi RS, Alpoim P, Petterson J, Lwaleed BA, Carvalho M: Sources of thrombomodulin in pre-eclampsia: renal dysfunction or endothelial damage? *Semin Thromb Hemost* 2011, 37:153-7.
- [39] Ito T, Kakihana Y, Maruyama I: Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2015, 20:151-8.
- [40] Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Laszik Z, Esmon CT, Heyderman RS: Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* 2001, 345:408-16.
- [41] Fujiwara H, Maeda Y, Sando Y, Nakamura M, Tani K, Ishikawa T, Nishimori H, Matsuoka KI, Fujii N, Kondo E, Tanimoto M: Treatment of thrombotic microangiopathy after hematopoietic stem cell transplantation with recombinant human soluble thrombomodulin. *Transfusion* 2015.
- [42] Ito D, Akamatsu N, Ichida A, Kaneko J, Arita J, Hasegawa K, Sakamoto Y, Kokudo N: Possible efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin for the treatment of thrombotic microangiopathy after liver transplantation. *Liver Transpl* 2016.
- [43] Yamamoto S, Yagawa A, Toyama D, Akiyama K, Hayashi M, Mabuchi M, Shimizu T, Ikeda H, Isoyama K: Successful treatment of hepatic sinusoidal obstructive syndrome after hematopoietic stem cell transplantation in a child using recombinant thrombomodulin. *Acta haematologica* 2013, 129:62-4.
- [44] Ohwada C, Takeuchi M, Kawaguchi T, Tsukamoto S, Sakai S, Takeda Y, Abe D, Sakaida E, Shimizu N, Yokote K, Iseki T, Nakaseko C: Successful treatment with recombinant soluble thrombomodulin of two cases of sinusoidal obstructive syndrome/hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *American journal of hematology* 2011, 86:886-8.
- [45] Sharfuddin AA, Sandoval RM, Berg DT, McDougal GE, Campos SB, Phillips CL, Jones BE, Gupta A, Grinnell BW, Molitoris BA: Soluble thrombomodulin protects ischemic kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20:524-34.
- [46] Ozaki T, Anas C, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ito Y, Gotoh M, Yuzawa Y, Matsuo S: Intrarenal administration of recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2008, 23:110-9.
- [47] Kashiwadate T, Miyagi S, Hara Y, Akamatsu Y, Kawagishi N, Sekiguchi S, Satomi S: Recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) prevents warm ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donors. *Transplant Proc* 2012, 44:369-72.
- [48] Shin M, Hino H, Tamura M, Ishizuka B, Tanaka M, Suzuki N, Tateda T: Thrombomodulin improves maternal and fetal conditions in an experimental pre-eclampsia rat model. *J Obstet Gynaecol Res* 2014, 40:1226-34.
- [49] Jin YP, Korin Y, Zhang X, Jindra PT, Rozengurt E, Reed EF: RNA interference elucidates the role of focal adhesion kinase in HLA class I-mediated focal adhesion complex formation and proliferation in human endothelial cells. *J Immunol* 2007, 178:7911-22.
- [50] Tsai EW, Reed EF: MHC class I signaling: new functional perspectives for an old molecule. *Tissue Antigens* 2014, 83:375-81.

- [51] Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, Hiroki J, Mukai Y, Kaibuchi K, Takeshita A: Long-term treatment with a specific Rho-kinase inhibitor suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Circ Res* 2004, 94:46-52.
- [52] Bieri M, Oroszlan M, Farkas A, Ligeti N, Bieri J, Mohacsi P: Anti-HLA I antibodies induce VEGF production by endothelial cells, which increases proliferation and paracellular permeability. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2009, 41:2422-30.
- [53] Calnek DS, Grinnell BW: Thrombomodulin-dependent anticoagulant activity is regulated by vascular endothelial growth factor. *Experimental cell research* 1998, 238:294-8.
- [54] Al-Daccak R, Mooney N, Charron D: MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 2004, 16:108-13.
- [55] Lang P, Stolpa JC, Freiberg BA, Crawford F, Kappler J, Kupfer A, Cambier JC: TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig-alpha/beta dimers. *Science* 2001, 291:1537-40.
- [56] Mooney NA, Grillot-Courvalin C, Hivroz C, Ju LY, Charron D: Early biochemical events after MHC class II-mediated signaling on human B lymphocytes. *J Immunol* 1990, 145:2070-6.
- [57] Tabata H, Matsuoka T, Endo F, Nishimura Y, Matsushita S: Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *J Biol Chem* 2000, 275:34998-5005.
- [58] Lion J, Taflin C, Cross AR, Robledo-Sarmiento M, Mariotto E, Savenay A, Carmagnat M, Suberbielle C, Charron D, Haziot A, Glotz D, Mooney N: HLA class II antibody activation of endothelial cells promotes Th17 and disrupts regulatory T lymphocyte expansion. *Am J Transplant* 2015.
- [59] Teasdale MS, Bird CH, Bird P: Internalization of the anticoagulant thrombomodulin is constitutive and does not require a signal in the cytoplasmic domain. *Immunol Cell Biol* 1994, 72:480-8.
- [60] Conway EM, Pollefeyt S, Collen D, Steiner-Mosonyi M: The amino terminal lectin-like domain of thrombomodulin is required for constitutive endocytosis. *Blood* 1997, 89:652-61.
- [61] Healy AM, Rayburn HB, Rosenberg RD, Weiler H: Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:850-4.
- [62] Weiler-Guettler H, Christie PD, Beeler DL, Healy AM, Hancock WW, Rayburn H, Edelberg JM, Rosenberg RD: A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *J Clin Invest* 1998, 101:1983-91.

TABLES.

Table 1. Clinical characteristics of transplant recipients

	ABMR (n=10)	TCMR (n=12)	Non-rejectors (n=12)
Recipient			
Age (yr)	45 ± 12	50 ± 11	44 ± 21
Male gender	7 (70)	4 (33)	4 (40)
First transplant	8 (80)	11 (92)	10 (100)
Time post-transplant (mo)	110 [78,321]	71 [16,238]	63 [20,134]
HLA A-B-DR mismatch	2.7 ± 0.6	3.6 ± 2.3	2.6 ± 1.1
HLA DR mismatch	0.7 ± 0.6	1.2 ± 0.8	0.4 ± 0.6
DSA status			
Anti-HLA-I only	1 (10)	0 (0)	0 (0)
Anti-HLA-II only	3 (30)	1 (8)	1 (10)
Anti-HLA I and II	1 (10)	0 (0)	0 (0)
Immunosuppression at biopsy			
Number of maintenance agents	2.4 ± 1.0	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.5
Corticosteroids	8 (80)	12 (100)	9 (90)
Prednisone dose (mg)	7.8 ± 2.0	8.1 ± 3.9	6.7 ± 3.3
Calcineurin inhibitor	7 (70)	11 (92)	10 (100)
Tacrolimus T ₀ level (ng/dL)	4.9 ± 2.6	5.4 ± 2.3	5.5 ± 1.8
Antimetabolite	9 (90)	9 (75)	8 (80)
Mycophenolate	9 (90)	8 (67)	7 (70)
Mycophenolate dose (mg) ^a	1219 ± 209	1218 ± 452	1094 ± 517
Azathioprine	0 (0)	1 (8)	1 (10)

^a in mycophenolate mofetil equivalent.

Data are provided as mean ± standard deviation, n (%) or median [25th, 75th percentiles].

ABMR, antibody-mediated rejection; TCMR, T-cell mediated rejection; DSA, donor-specific antibody

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of HLA antigens on GMVECs. (A) Expression of HLA-I antigen was analyzed with unstimulated and unlabeled cells (solid light black line) and non-stimulated cells (thick black line) using Flow cytometry. (B) Cells were first stimulated for 48 h with IFN- γ 500 U/mL. Expression of HLA-II antigen was then measured after the following resting times: 0 h (dotted line); 24 h (dashed line) and 48 h (thick black line) with corresponding isotypes (0 h, solid thin black line; 24 h, solid gray line; 48 h, solid light gray line).

Figure 2. Expression of membrane thrombomodulin after stimulation of GMVECs with increasing concentrations of anti-HLA antibodies for 24 h. (A) Cells were labeled using mouse anti-human thrombomodulin IgG and goat anti-mouse IgG-Alexa Fluor 594 to detect membrane thrombomodulin. Nuclei were stained blue with DAPI. The cells were fixed in 3% paraformaldehyde prior to labeling. GMVECs were at passage 4. Illustrative photomicrographs taken on an Olympus IX83 ($\times 40$ for all panels) equipped with an Olympus DP80 camera and acquired using cellSens software. (B) Summarized data (mean \pm SEM) of mean fluorescence intensity (FI) analyzed using cellSens (n=6-8). Anti-HLA concentrations are in $\mu\text{g}/\text{mL}$. (C) Membrane proteins were extracted, subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunostaining was done with goat anti-mouse 800, goat anti-mouse 680 and goat anti-rabbit 680. Membranes were detected with an Odyssey Imaging Systems. This micrograph is representative of 3 experiments. (D) Summarized data (mean \pm SEM) of the ratio TBM/CD31 (PECAM) (n=3). *, p<0.05; **, p<0.01; NS, non-stimulated; IgG, isotype control.

Figure 3. Thrombomodulin levels in cell culture supernatants after 24 h stimulation with increasing concentrations of anti-HLA antibodies. Thrombomodulin concentrations were measured by ELISA. Bars represent mean \pm SEM (n= 5). Anti-HLA concentrations are expressed as $\mu\text{g}/\text{mL}$. *, p<0.05 vs. NS; NS, non-stimulated cells.

Figure 4. Expression of intracellular thrombomodulin after stimulation with increasing concentrations of anti-HLA antibodies for 24 h. (A-G) GMVECs were labeled, fixed and permeabilized as described in Figure 2. Cells were at passage 4. Illustrative photomicrographs taken on an Olympus IX83 ($\times 40$ for all panels) equipped with an Olympus DP80 camera and acquired using cellSens software. (H) Summarized data (mean \pm SEM) of mean fluorescence intensity (FI) analyzed using cellSens (n=4-5) (I) Membrane and cytosolic proteins were

differentially extracted. Cytosolic extracts were treated as described in Figure 2. Membranes were detected with an Odyssey Imaging Systems. This micrograph is representative of 3 experiments. (J) Summarized data (mean \pm SEM) of the ratio TBM/ β -actin (n=3). *, p<0.05; NS, non-stimulated; IgG, isotype control.

Figure 5. Thrombomodulin levels in the sera of kidney transplant recipients. (A) According to rejection status and (B) According to DSA status. Thrombomodulin concentrations were measured by ELISA. Bars represent mean \pm SEM. Serum was collected on the day of the allograft biopsy. *, p<0.05; ABMR, antibody-mediated rejectors; TCMR, T-cell mediated rejectors; DSA, donor-specific antibodies.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS.

Supplemental Figure 1. Expression of membrane thrombomodulin after stimulation of HRGECs with anti-HLA antibodies for 24 h.

(A-H) Cells were labeled using mouse anti-human thrombomodulin IgG and goat anti-mouse IgG-Alexa Fluor 594 to detect membrane thrombomodulin. Nuclei were stained blue with DAPI. Cells were fixed in 3% paraformaldehyde prior to the labeling. HRGECs were at passage 4. Each photomicrograph is representative of 2 experiments taken on an Olympus IX83 (X 40 for all panels) equipped with an Olympus DP80 camera and acquired in the CellSens software.

Supplemental Figure 2. Expression of membrane thrombomodulin after stimulation of GMVECs with anti-HLA antibodies for 24 h and using a different detection antibody.

(A-H) Cells were labeled using mouse anti-human thrombomodulin IgG (BioLegend) and goat anti-mouse IgG-Alexa Fluor 594 to detect membrane thrombomodulin. In contrast, the primary anti-human thrombomodulin IgG used in Figure 1 was from BD. Nuclei were stained blue with DAPI. Cells were fixed in 3% paraformaldehyde prior to the labeling. GMVECs were at passage 4. Each photomicrograph is representative of 2 experiments taken on an Olympus IX83 (X 40 for all panels) equipped with an Olympus DP80 camera and acquired in the CellSens software.

Supplemental Figure 3. Expression of membrane thrombomodulin after stimulation of GMVECs with a different anti-HLA-II antibody for 24 h. (A-D) Cells were labeled using mouse anti-human thrombomodulin IgG and goat anti-mouse IgG-Alexa Fluor 594 to detect membrane thrombomodulin. Nuclei were stained blue with DAPI. Cells were fixed in 3% paraformaldehyde prior to the labeling. In contrast to figure 2, a different anti-HLA-II antibody was used (Thermo Fisher Scientific). GMVECs were at passage 4. Each photomicrograph is representative of 2 experiments taken on an Olympus IX83 (X 40 for all panels) equipped with an Olympus DP80 camera and acquired in the CellSens software.

Figure 1.

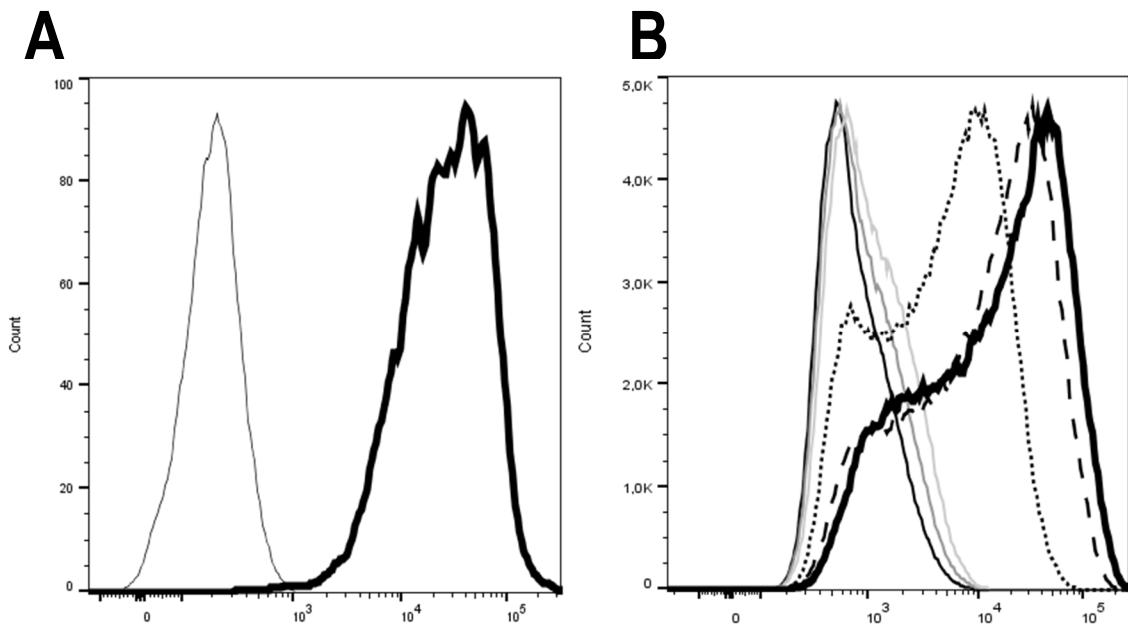


Figure 2.

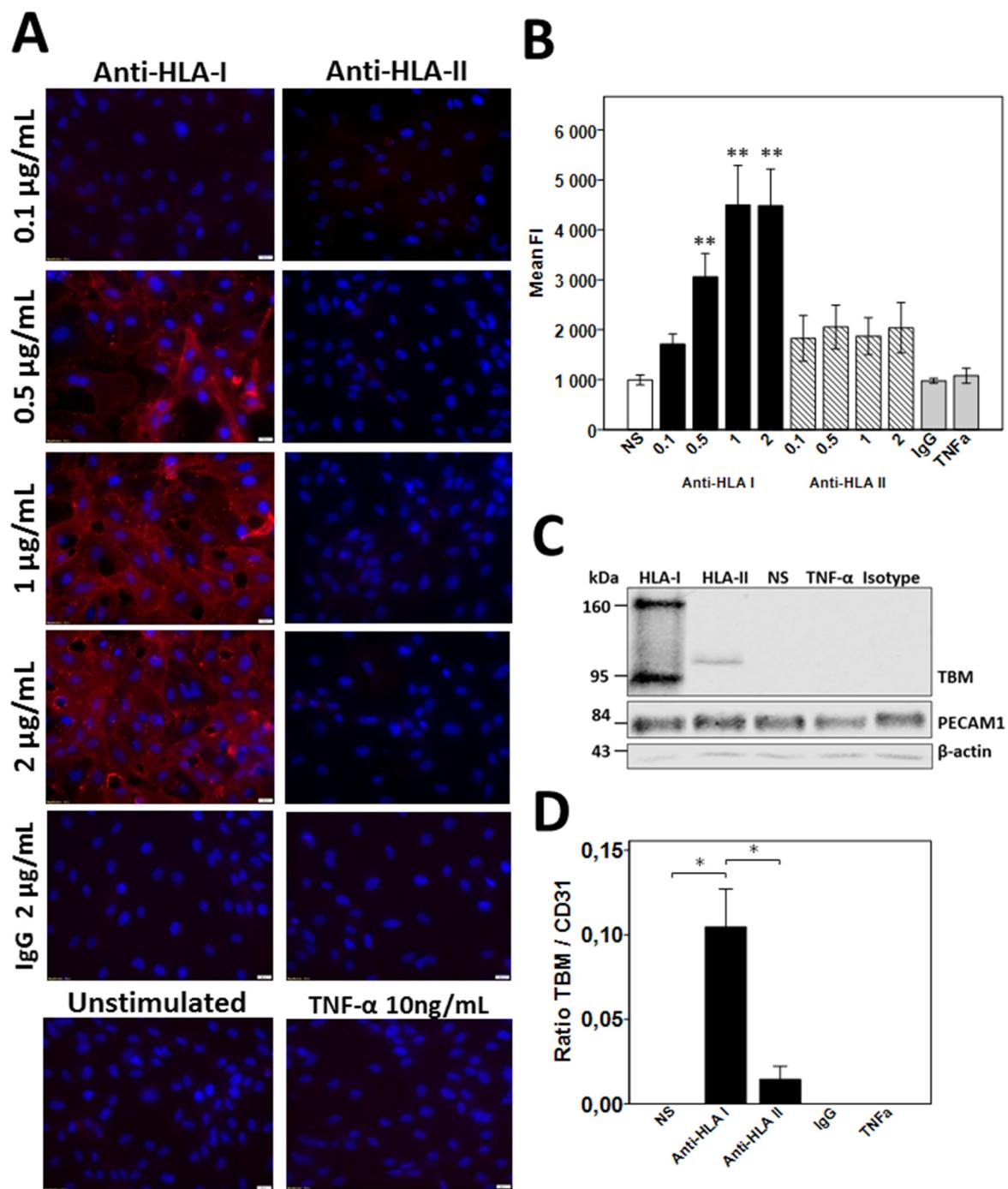


Figure 3.

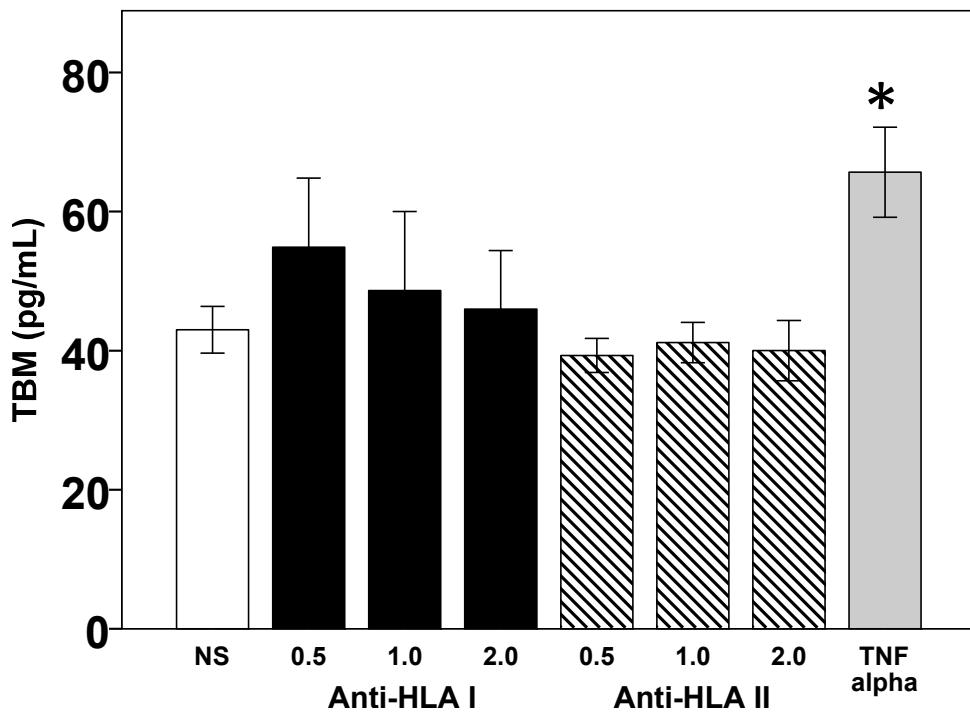


Figure 4.

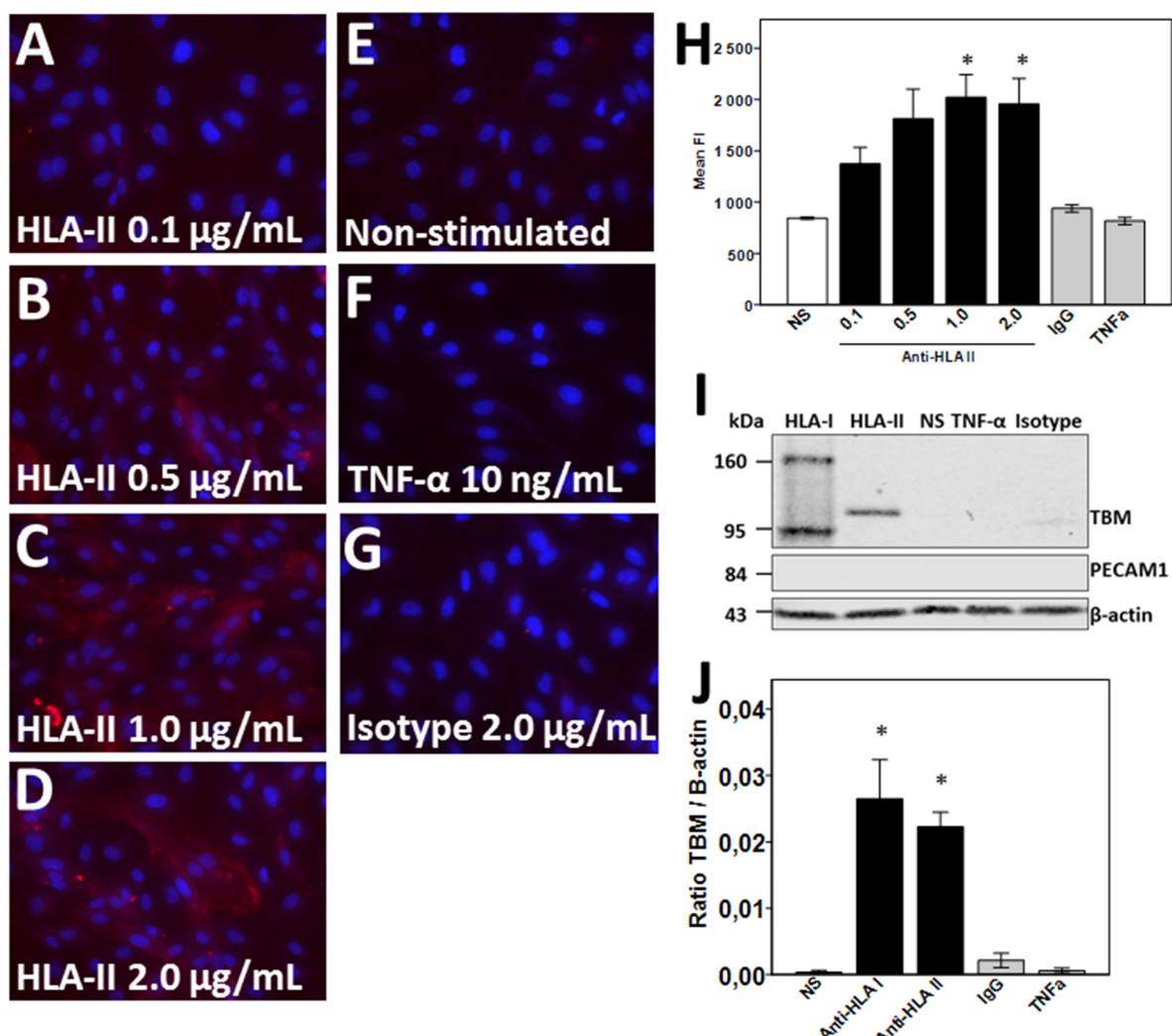
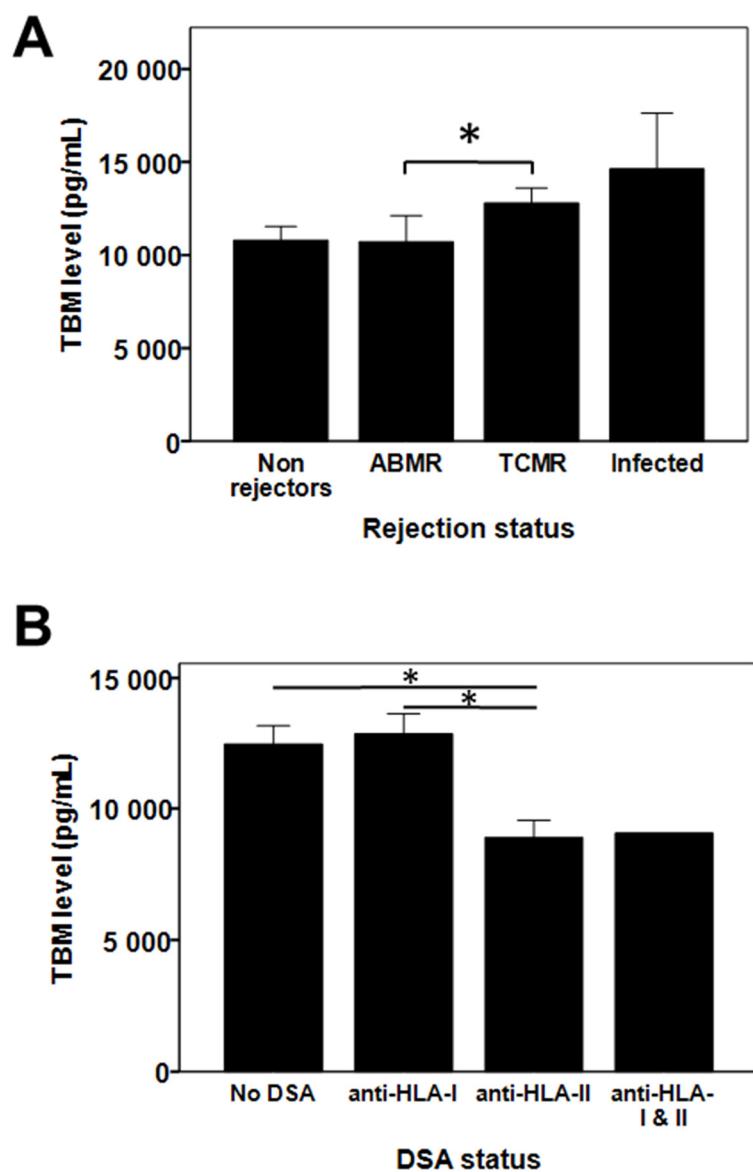
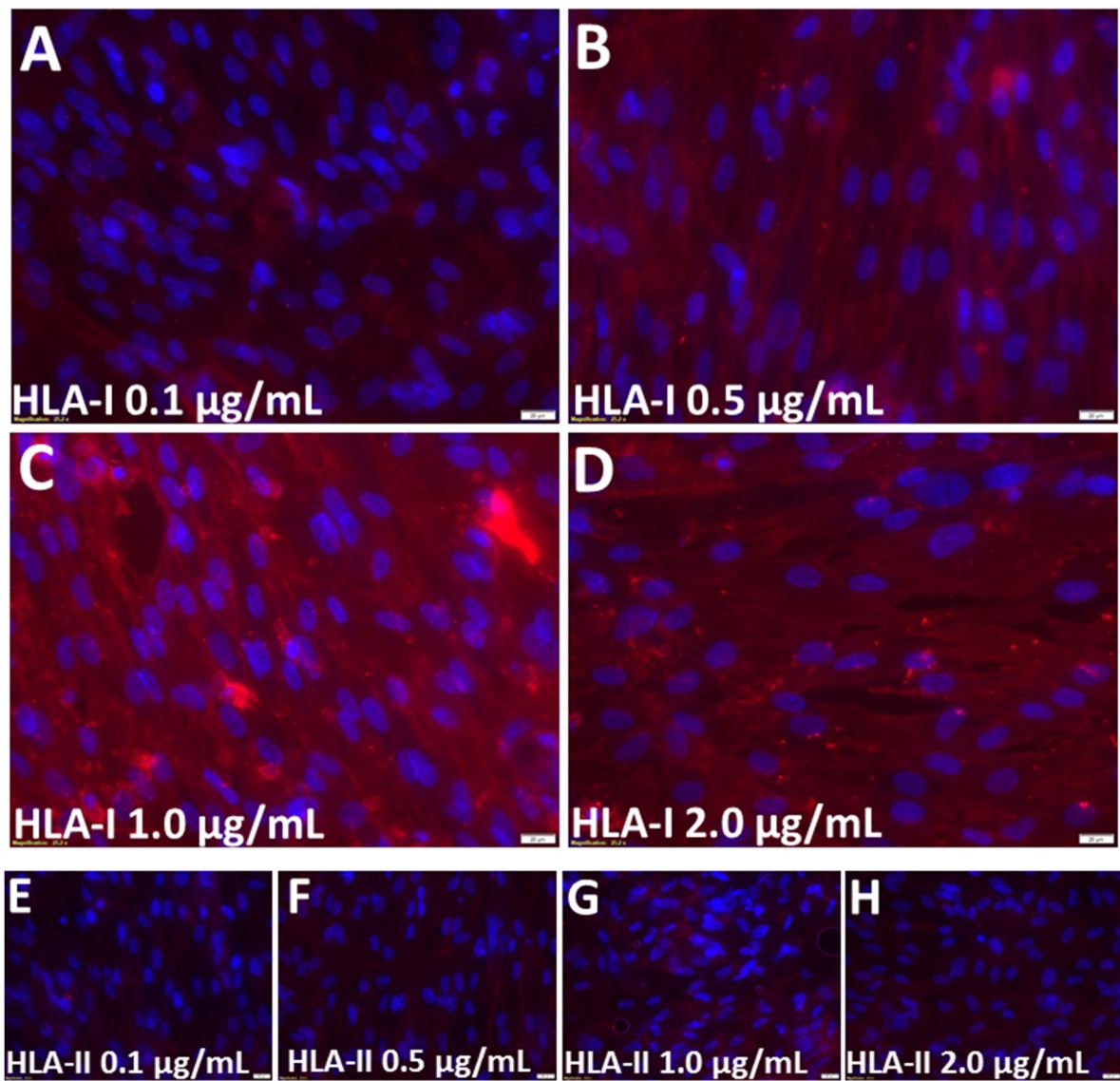


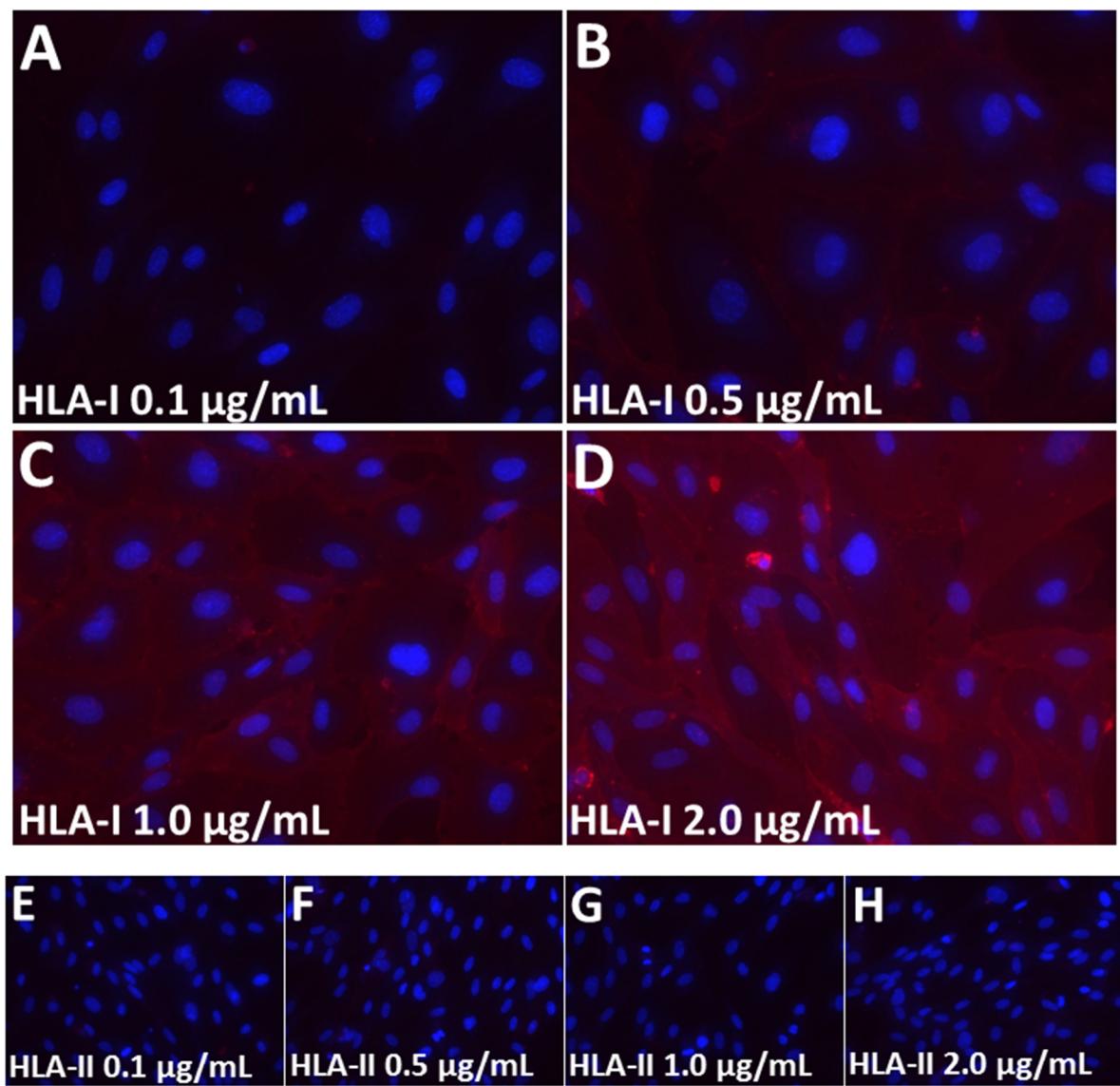
Figure 5.



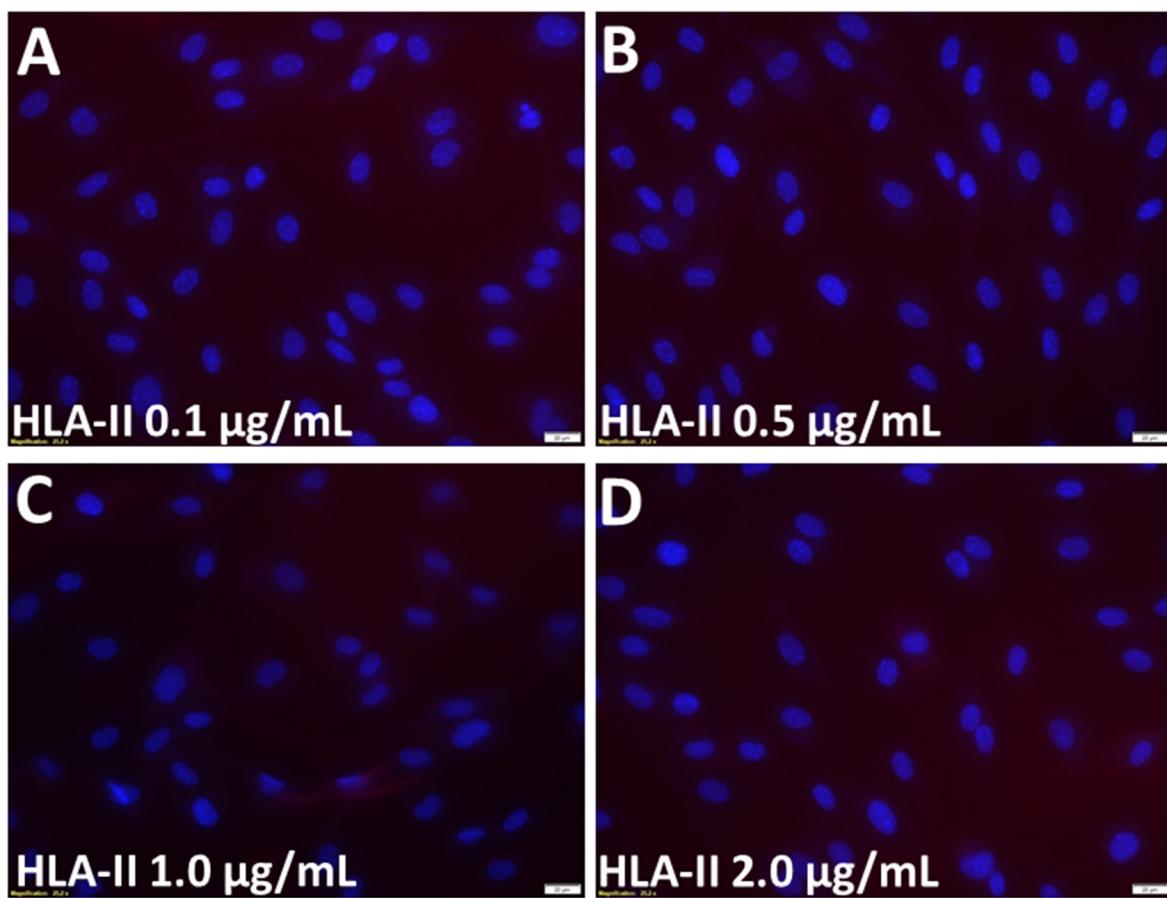
Supplemental figure 1.



Supplemental figure 2.



Supplemental figure 3.



4. Discussion

Le rejet ABMR est un obstacle majeur au succès de la transplantation rénale. Les effets cliniques néfastes des DSA *de novo* circulants dans l'ABMR ont été bien démontrés, par contre le mécanisme par lequel les DSA engendrent ces manifestations cliniques n'est pas très bien caractérisé. Actuellement, on sait que les anticorps anti-HLA-II sont plus associés au dommage endothéial glomérulaire et à la glomérulopathie du transplant. Nous croyons que les DSA seuls peuvent perturber l'hémostase locale de l'endothélium glomérulaire. Ainsi, le but de mon projet de maîtrise était de caractériser les effets des anticorps anti-HLA de classe I et II sur l'expression de la TBM, une glycoprotéine transmembranaire qui inhibe différents systèmes, dont le complément, la cascade de coagulation et l'inflammation, des processus qui peuvent tous être impliqués dans le dommage endothéial glomérulaire. Nous croyons que les anticorps anti-HLA, plus particulièrement anti-HLA-II, diminuent l'expression de la TBM, engendrant des lésions microangiopathiques similaires à celles retrouvées dans la glomérulopathie du transplant.

Les résultats que nous avons obtenus ont montré que les anticorps anti-HLA modulent l'expression de la TBM endothéliale dans notre modèle. En effet, lorsqu'on augmente la concentration en anticorps anti-HLA-I on observe une augmentation de l'expression de la TBM membranaire (Figure 2, article), ce qui, dans ce cas bien précis, suggère un contre-balancier des effets néfastes et connus des anticorps anti-HLA-I. Cela pourrait en partie expliquer pourquoi les anticorps anti-HLA-I sont moins associés à la glomérulopathie du transplant que les anticorps anti-HLA-II. À l'opposé, en présence des anticorps anti-HLA-II nous n'observons pas de TBM à la surface, sans égard à la concentration utilisée expérimentalement. Au niveau de l'expression soluble de TBM, nous avons observé une diminution non significative des niveaux de TBM avec l'augmentation de la concentration des anticorps anti-HLA-I alors que lors de la stimulation avec les anticorps anti-HLA-II, les niveaux sont demeurés similaires aux cellules non-stimulées. Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-HLA-II n'affectent pas l'expression soluble de TBM et que son absence au niveau membranaire n'est pas palliée par un plus grand relargage dans le surnageant. Puisque les anticorps de classe II ne semblaient pas avoir d'effet sur l'expression extracellulaire de la TBM, nous avons regardé l'expression intracellulaire. Pour les anticorps anti-HLA-I, nous avons observé une augmentation constante, à l'instar de l'expression membranaire. Pour les anticorps anti-HLA-II, nous avons également observé une augmentation intracellulaire de la TBM en fonction de la concentration. Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-HLA-II n'agissent pas en diminuant

la production de TBM, contrairement au TNF- α qui était le contrôle. Selon un mécanisme qui reste à déterminer, les anticorps anti-HLA-II semblent inhiber le transport membranaire de la TBM en restreignant celle-ci à l'intérieur de la cellule. De cette manière, la TBM n'est plus en mesure d'effectuer ses multiples rôles protecteurs, ce qui pourrait favoriser le dommage endothéial glomérulaire.

Finalement, nous avons eu l'occasion d'analyser des données cliniques obtenues à partir du sérum de patients transplantés rénaux. Nous avons observé que les anticorps anti-HLA-II sont associés à des concentrations sériques plus faibles de TBM chez les patients en situation de rejet de type ABMR comparativement à des patients en rejet ABMR avec seulement des DSA contre HLA-I ou sans DSA.

L'étude de l'effet des anticorps anti-HLA sur l'expression endothéliale de TBM étant un sujet nouveau, il y a actuellement peu de données à ce sujet dans la littérature. Une étude a utilisé 2 lignées cellulaires, dont les GMVEC, afin évaluer les effets d'une exposition à des anticorps anti-HLA préformés chez le receveur. Les GMVEC étaient utilisées aux passages 4 à 7, tandis que dans mon projet j'ai utilisé des GMVEC seulement à passage 4. La source de leurs anticorps anti-HLA était le sérum d'un seul patient prétransplanté contenant des anticorps anti-HLA I et II qui correspondaient à des antigènes phénotypés à la surface des cellules GMVEC, donc agissant immunologiquement comme des DSA. Pour activer les cellules endothéliales, elles ont été stimulées avec de l'IFN- γ et du TNF- α avec ou sans les anticorps anti-HLA pour une durée de 8 heures. J'ai également utilisé l'IFN- γ durant mon protocole de croissance. Toutefois, il était utilisé préalablement aux stimulations avec les anticorps anti-HLA, pour une durée de 48 heures, suivi de 48 heures de repos. Il s'agissait d'un préconditionnement afin que les cellules endothéliales expriment les antigènes HLA-II, qui sont absents sur les cellules non activées. Dans l'étude de Mannam et al., les différentes stimulations ont été séparées en 3 groupes; (1) groupe contrôle de cellules cultivées seulement avec du milieu de culture, (2) groupe de cellules incubées avec le sérum de patient et finalement (3) groupe de cellules incubées avec le sérum et les cytokines IFN- γ et TNF- α . Leurs résultats ont montré que l'expression du gène de la TBM était significativement augmentée pour les cellules des groupes 2 et 3 comparativement au groupe contrôle 1¹⁰⁰. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes 2 et 3. Cette étude présente certaines limitations. Contrairement à mon projet où j'ai séparé les stimulations avec les anticorps anti-HLA I et II, ils ont stimulé les cellules avec les 2 classes d'anticorps simultanément, ce qui ne permet

pas de déterminer quelle classe d'anticorps modifie l'expression génique de la TBM. Également, la stimulation concomitante avec les anticorps anti-HLA et les cytokines posent un problème en ce sens où l'expression des antigènes HLA-II par les GMVEC est induite par l'IFN- γ et dans ce modèle elle se produit au même moment que la stimulation par des anticorps anti-HLA-II. L'expression des antigènes HLA-II n'est probablement pas stable et maximale après seulement 8 heures de stimulation. L'utilisation de cellules à passages variables peut aussi influencer les résultats ; plus le passage est élevé, plus les risques sont élevés pour les cellules de subir des modifications cellulaires telles qu'un taux de croissance variable, des dommages à l'ADN ou une grande amplitude de réaction à des molécules. En somme, cet article apporte un point commun à mon projet soit l'étude de l'expression de la TBM en présence d'anticorps anti-HLA, mais plusieurs aspects du modèle ne permettent pas de tirer des conclusions convenables.

Durant les prochaines sections de la discussion, différentes hypothèses seront présentées pour expliquer les résultats de mes expériences sur l'expression de la TBM en réponse aux anticorps anti-HLA.

Trois hypothèses seront abordées :

- Les anticorps anti-HLA I et II activent plusieurs voies de signalisation qui pourraient moduler l'expression de TBM.
- Les anticorps anti-HLA peuvent agir directement au niveau des facteurs de transcriptions associés au gène de TBM.
- Les anticorps anti-HLA peuvent modifier l'état de glycosylation de TBM et modifier par le fait même son expression.

4.1 Les voies de signalisation des anticorps anti-HLA

4.1.1 Les voies de signalisation des anticorps anti-HLA-I

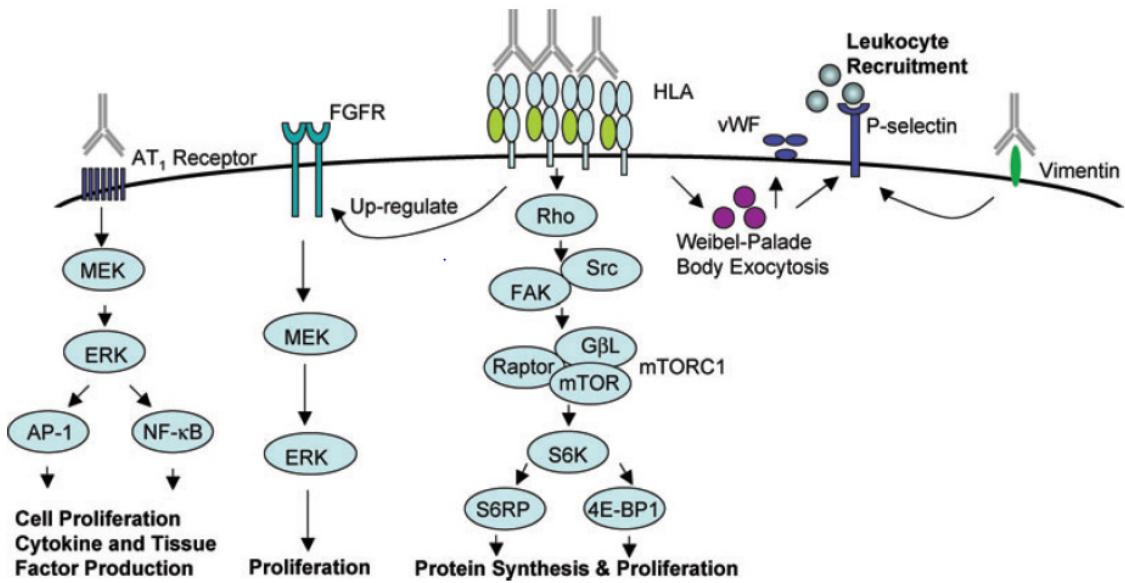


Figure 11 : Voies de signalisation des anticorps anti-HLA-I impliquées dans l'activation endothéiale Tiré avec permission d'*Am J Transplant* (2009), Zhang et al.

Les voies de signalisation des anticorps anti-HLA-I commencent peu à peu à être révélées, contrairement aux anticorps anti-HLA-II pour lesquels il existe peu de littérature. Les anticorps anti-HLA-I activent plusieurs molécules dans différentes voies de signalisation au sein des cellules endothéliales (Figure 11), dont celles impliquées dans la prolifération cellulaire (Erk), la production de cytokines (Erk) et la synthèse protéique (Rho, FAK, Src, mTOR, S6K, S6RP). Ces protéines qui sont activées en réponse aux anticorps anti-HLA-I peuvent toutes être potentiellement dommageables pour les cellules endothéliales, même en l'absence de plusieurs facteurs de croissances exogènes¹⁰¹. Une description plus précise de leurs rôles dans les différentes voies de signalisation permettra de comprendre les effets des anticorps anti-HLA-I sur l'endothélium et dans l'ABMR.

Tout d'abord, la voie Rho est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette. L'activation de Rho GTPase et Rho kinase médient la prolifération cellulaire dépendante de PI3K via la formation d'actine à l'aide de Src¹⁰¹. La phosphorylation de PI3K/Akt active mTOR (composé de mTORC1 et mTORC2). mTORC1 active à son tour SK6, S6RP et 4EBP1, qui sont impliqués dans la synthèse protéique et la prolifération, tandis que mTORC2 régule ERK1/2¹⁰¹.

Plus particulièrement au niveau de la transplantation, des études *in vivo* à l'aide de modèles animaux ont confirmé les données au sujet de l'activation endothéliale par les anticorps anti-HLA-I¹⁰¹. En général, les données ont démontré que la phosphorylation des effecteurs de mTOR, S6RP et S6K, était augmentée dans les biopsies de sujets transplantés rénaux, cardiaques et pulmonaires avec un rejet d'allogreffe de type ABMR¹⁰²⁻¹⁰⁴. Un inhibiteur de mTOR, le sirolimus, peut inhiber les effets en réponse aux anticorps anti-HLA-I. En effet, des résultats *in vitro* sur un modèle primate de transplantation cardiaque ont démontré que la monothérapie au sirolimus à partir du moment de la greffe pouvait prévenir l'apparition de la maladie vasculaire du greffon, histologiquement similaire à la vasculopathie de l'allogreffe chez l'humain¹⁰⁵.

Il existe d'autres voies de signalisation activées par les anticorps anti-HLA-I qui ont déjà été abordés dans la discussion de l'article que je ne répéterai pas ici soit l'exocytose calcium dépendant du facteur de von Willebrand et de la P-sélectine ainsi que la production de VEGF.

De plus, bien que les anticorps anti-HLA-I soient associés au rejet du greffon, mes résultats suggèrent qu'ils peuvent parfois contrecarrer leurs effets néfastes en augmentant une protéine antithrombotique telle que la TBM. À ce sujet, la littérature documente plusieurs effets accommodateurs au niveau du greffon par les anticorps anti-HLA-I, à faible concentration, en régulant à la hausse les gènes anti-apoptotiques Bcl-xL, Bcl-2 et HO-1 via la voie PI3K/Akt. Cette même voie est impliquée dans la prolifération cellulaire et le dommage endothéial^{106, 107}. Cette voie de signalisation pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de la TBM en réponse aux anticorps anti-HLA-I. Il est possible que les anticorps anti-HLA-I activent à la hausse la voie PI3K/Akt, ce qui augmenterait l'expression du gène de la TBM. Une autre hypothèse est que la régulation à la hausse de cette voie qui augmente l'expression des gènes Bcl-xL, Bcl-2 et HO-1 stimulerait également l'expression du gène de TBM.

4.1.2 Les voies de signalisation des anticorps anti-HLA-II

Tel que mentionné précédemment dans l'article, l'interaction entre les anticorps anti-HLA-II et les cellules endothéliales est bien moins définie que celle avec les anticorps anti-HLA-I. Ce sujet est également discuté dans le manuscrit. Brièvement, des études sur les cellules B et T ont montré une activation de Syk, Src et PLC en réponse aux anticorps anti-HLA-II. Une étude sur les cellules endothéliales a rapporté que les anticorps anti-HLA-II phosphorylaient Akt, ERK et MEK. Il s'agit de l'ensemble des données actuellement disponibles concernant les voies de signalisation des anticorps anti-HLA-II. Les différentes voies mentionnées ci-haut sont décrites plus en détail dans la section discussion de l'article.

Au cours de mon projet de maîtrise, les résultats obtenus avec les anticorps anti-HLA-II ont fait en sorte que je me suis intéressée à la voie de signalisation du TNF- α . À la suite des résultats d'immunofluorescence membranaire où nous ne détection pas de TBM à la surface endothéliale des cellules stimulées par les anticorps anti-HLA-II et le TNF- α , nous avons supposé que ces molécules pouvaient agir via la même voie de signalisation.

Le TNF- α est une cytokine inflammatoire qui agit au niveau de l'expression soluble de la TBM, en promouvant le clivage protéolytique de la protéine, mais également au niveau de son expression génique. En effet, cette cytokine active le facteur de transcription nucléaire NF- κ B¹⁰⁸. Au repos, NF- κ B est lié à la protéine inhibitrice I κ B α dans le cytoplasme. La stimulation avec le TNF- α induit la phosphorylation et la dégradation subséquente d'I κ B α ce qui permet la translocation de NF- κ B au noyau où il agit comme répresseur transcriptionnel indirect en compétitionnant pour les coactivateurs transcriptionnels p300 et CBP au niveau du promoteur du gène de TBM¹⁰⁸. Cette piste aurait pu être très intéressante pour expliquer un plus grand dommage endothérial pour les anti-HLA-II qu'anti-HLA-I, mais nos résultats en ELISA pour la TBM soluble ont montré une différence de relargage extracellulaire entre le TNF- α et les anticorps anti-HLA-II ainsi qu'une différence d'expression de TBM par immunofluorescence intracellulaire. En effet, alors que le TNF- α inhibe l'expression de la TBM au niveau génique via NF- κ B, les anticorps anti-HLA-II ne semblent pas inhiber la production de TBM, mais plutôt son transport vers la membrane cellulaire. Ainsi, bien que les anticorps de classe II sont associés à un plus grand dommage endothérial, leur mécanisme d'action ne semble pas être le même que la cytokine inflammatoire TNF- α .

4.2 Expression génique de la thrombomoduline

Une hypothèse qui pourrait expliquer la différence d'expression de la TBM entre les anticorps anti-HLA de classe I et de classe II est que les 2 classes d'anticorps pourraient agir différemment sur les facteurs de transcriptions qui régulent l'expression génique de la TBM, KFL2 et NRF2. KFL2 est un facteur de transcription qui, lorsqu'exprimé, augmente l'expression génique de la TBM alors que lorsque NRF2 est exprimé, il y a une réduction de l'expression du gène^{66, 81, 82}. Les anticorps anti-HLA-I pourraient augmenter l'expression de KFL2 et diminuer celle de NRF2 alors que les anticorps anti-HLA-II pourraient effectuer l'inverse. À l'heure actuelle, il n'existe pas d'études concernant les facteurs de transcriptions de la TBM et les anticorps anti-HLA.

4.3 La glycosylation et la thrombomoduline

La dernière hypothèse a été développée à partir de mes résultats d'immunobuvardage de type Western pour expliquer la différence d'expression de TBM selon les anticorps anti-HLA. Suite à une stimulation avec des anticorps anti-HLA-I, nous avons observé 2 bandes, l'une à 95 kDa et l'autre à 160 kDa (Figure 12 tiré du manuscrit). En présence d'anticorps anti-HLA-II nous avons observé une seule et unique bande à 105 kDa. La TBM est une glycoprotéine possédant plusieurs sites potentiels de glycosylation.

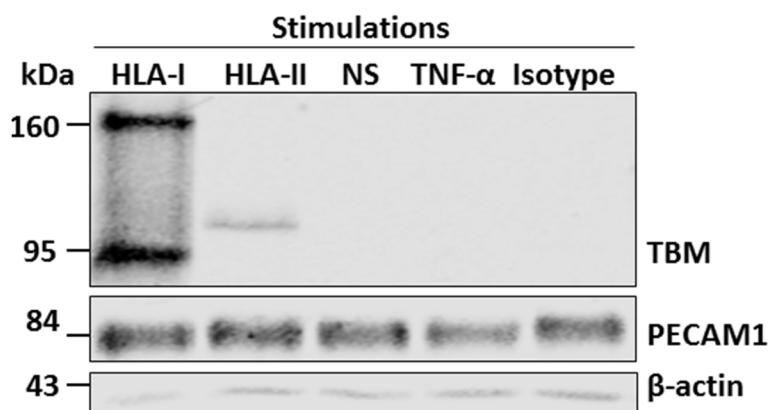


Figure 12 : Expression membranaire de la TBM suite à des stimulations par les anticorps anti-HLA Tiré du manuscrit *Effects of anti-HLA antibodies on endothelial expression and serum levels of thrombomodulin in transplant recipients (2016) Béland et al.*

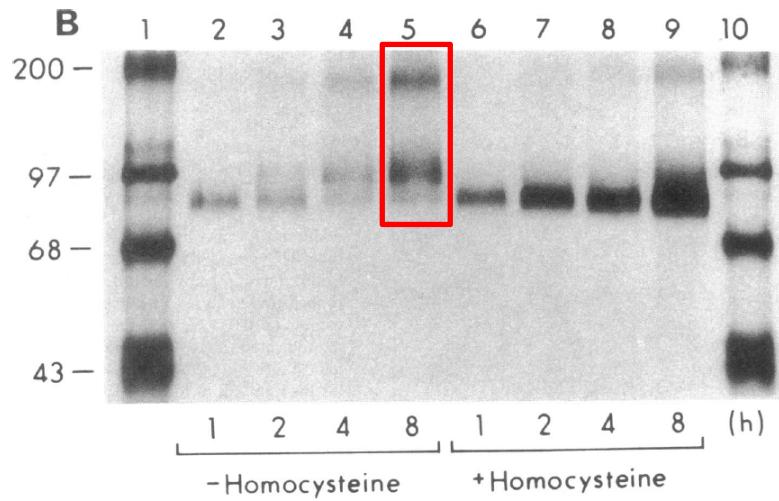


Figure 13 : Expression de la TBM avec chondroïtine-sulfate (160 kDa) et sans (95 kDa) (puits 5) Tiré avec permission de *J Clin Invest* (1991) Lentz et al.

Notre hypothèse est que la différence d'expression de la TBM par les anticorps anti-HLA I et II pourrait s'expliquer par une différence au niveau de la glycolysation qui modifierait la structure de la TBM et pourrait altérer ses fonctions et son transport vers la membrane plasmique.

Un papier de Lentz et al. a recensé des résultats similaires. Ils ont observé des bandes de poids moléculaires similaires à celles que nous avons obtenues à la suite de la stimulation avec les anticorps anti-HLA-I soit une bande à 95 kDa et la seconde à 160 kDa (figure 12 et 13). En utilisant une chondroitinase, Lentz et al., ont démontré que la bande de 160 kDa est composée de TBM et d'un type de glycosaminoglycan, le chondroïtine-sulfate que nous discuterons plus en détail dans la prochaine partie ¹⁰⁹. La bande de 105 kDa que nous observons suite à une stimulation avec les anticorps anti-HLA-II pourrait correspondre à de la TBM dont la structure aurait été modifiée d'une telle façon où son transport vers la membrane plasmique aurait été altéré. Lentz et al. ont observé des résultats semblables à la suite d'une stimulation avec l'homocystéine qui augmentait l'ARNm de la TBM et sa synthèse, mais interrompait son transit vers la membrane plasmique par un mécanisme inconnu ¹⁰⁹.

Un article de Moore et al. suggère qu'une diminution de l'expression de l'activité de la TBM pourrait résulter soit de la perte de la protéine à la surface ou d'une altération de son activité catalytique¹¹⁰. Ces modifications pourraient résulter d'une modification de l'état de glycosylation, à l'instar de nos résultats obtenus et des données de Lentz et al. Finalement, un article de Gerlitz et al. propose une autre hypothèse pour expliquer la présence de 2 bandes de poids moléculaires différentes pour la TBM. Il suggère un modèle selon lequel les glycotransférases, enzymes impliquées dans la glycosylation, compétitionnent pour la sérine en position 474, présumé site principal d'attachement de glycan, sur la TBM ce qui pourrait expliquer les différentes isoformes de la protéine observés¹¹¹. La combinaison des différentes hypothèses présentées pour expliquer nos résultats d'immunobuvardage de type Western font en sorte que nous nous sommes intéressés au processus de glycosylation qui sera détaillé dans la partie qui suit.

La glycosylation est une modification post-translationnelle qui ajoute des sucres sur des structures protéiques. Les différentes chaînes de glycan sur un seul peptide peuvent être de longueur et de forme différente en raison de la glycosylation spécifique selon les sites disponibles sur une protéine¹¹². Les glycans sont un des 4 composants de base pour la cellule. Il s'agit de monosaccharides reliés par des liens covalents et constituant une part significative de la masse et de la variation de structure des glycoprotéines, mais aussi des glycolipides¹¹³. Chez les mammifères, 9 monosaccharides différents sont utilisés lors de la glycosylation. De manière générale, on retrouve une plus grande diversité structurale chez les glycans que les acides nucléiques et les structures polypeptidiques¹¹⁴. Les 2 principaux liens glycosidiques aux protéines impliquent soit le nitrogène de la chaîne latérale de l'asparagine, pour les glycans-N, ou l'oxygène de la chaîne latérale d'un résidu sérine ou thréonine, pour les glycans-O¹¹⁵.

Les glycoprotéines sont composées de chaînes de glycans de structures variables attachés à la structure de base du peptide¹¹⁶. La glycosylation d'une protéine est l'une des modifications post-translationnelles les plus importantes pour la cellule ; plus de la moitié des protéines doivent être glycosylées afin d'être fonctionnelles^{115, 116}. La glycosylation permet de moduler, entre autres, la fonction protéique, le dynamisme de la protéine, sa demi-vie et ses propriétés biophysiques, thermodynamiques, cinétiques et structurelles^{115, 116}. Elle influence également le repliement de la protéine et conséquemment médie la transition de la protéine du réticulum endoplasmique (RE) vers la voie de sécrétion de l'appareil de Golgi. En effet, si la glycosylation est aberrante, la protéine peut ne pas être repliée de façon appropriée et cela peut faire en sorte que la protéine est confinée

au RE avant d'être dégradée dans les lysozymes^{114, 117}. La glycosylation est une modification qui pourrait expliquer les résultats observés ici.

Je vais maintenant présenter plus en détail la glycosylation de type O, car il s'agit du type de glycosylation subi par la TBM. La glycosylation de type O débute dans l'appareil de Golgi par l'addition d'un monosaccharide GalNAc sur la chaîne latérale d'un résidu sérine ou thréonine par l'enzyme N-acétylgalactosaminyltransférase^{115, 116, 118, 119}. Cette réaction enzymatique est suivie par la régulation de l'attachement d'autres liens saccharides au résidu GalNAc par différentes glycotransférases, contribuant à l'élongation de la structure des glycans¹¹⁹. Chaque monosaccharide possède 3 ou 4 sites d'attachement pour des liaisons avec d'autres monosaccharides pour former des liens glycosidiques dans une conformation α ou β permettant la formation de ramifications¹²⁰. On retrouve souvent les glycosylations de type O dans une région protéique comprenant des séquences répétées de sérine et thréonine par exemple le domaine suivant le domaine EGF de la TBM près de la membrane plasmique (figure 9). La sérine en position 474 pourrait être le site d'attachement prédominant, alors que la sérine en position 472 serait un site d'attachement secondaire pour les glycans sur la TBM^{87, 111}. Les glycans de type O jouent un rôle dans la détermination de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de la protéine et également pour la préparation de l'élimination des protéines. Ces 2 rôles sont très importants dans la fonction de contrôle de qualité de la voie de sécrétion¹¹⁴, ce qui signifie en quelque sorte qu'une altération de la glycosylation pourrait empêcher la protéine d'être relarguée à la surface membranaire.

Il existe une catégorie de glycans de type O possédant une grande diversité structurale et qui est associée aux régions EGF et aux régions riches en sérine et thréonine, les glycosaminoglycans (GAGs)^{111, 120}. On nomme protéglycans les protéines qui contiennent des chaînes GAGs qui sont attachées à des résidus sérine. On retrouve 3 différents types de GAGs dont le chondroïtine-sulfate¹²⁰. Dans la TBM, on les retrouve parfois au niveau de la région riche en sérine/thréonine où ils sont connus pour augmenter l'efficacité catalytique de la protéine C en apportant un second module de liaison pour la thrombine qui est nécessaire pour l'activation de la protéine C et permet de bloquer l'interaction de la thrombine avec des substrats procoagulants circulants^{66, 76, 79, 121}.

Nous pouvons supposer que les anticorps anti-HLA-II pourraient avoir un effet sur la glycosylation de type O de la TBM¹¹⁸. Les différentes enzymes impliquées dans la glycosylation sont constitutivement actives; par contre, elles peuvent être régulées par la phosphorylation de leur queue cytoplasmique, ce qui pourrait modifier les interactions intramoléculaires et mener à

différentes structures de glycan¹¹³. Les anticorps de classe II pourraient agir sur les enzymes impliquées dans la glycosylation en modulant celles-ci dans les molécules de TBM, ce qui pourrait modifier les différents niveaux de structure de la glycoprotéine et empêcher sa sortie du RE pour être relarguée à la surface cellulaire. D'autre part, si l'altération de la glycosylation n'empêche pas le relargage de la TBM, les anticorps de classe II pourraient agir sur les enzymes qui construisent les glycans afin de modifier ses propriétés anticoagulantes. En effet, selon Gerlitz et al., l'état de la glycosylation de la TBM pourrait affecter son potentiel anticoagulant¹¹¹.

Plusieurs pathologies sont causées par des défauts de glycosylation. Puisque les connaissances au sujet des anticorps anti-HLA-II sont limitées, un résumé de certaines pathologies en lien avec la glycosylation pourrait apporter des pistes potentielles pour l'interaction entre la TBM et les anticorps anti-HLA-II.

Il existe un cas semblable concernant l'expression membranaire du récepteur Notch et la glycosylation. La voie de signalisation de Notch est l'une des plus importantes dans la régulation du développement et de l'homéostasie des tissus adultes, dont ceux des mammifères¹²². Un dérèglement de la signalisation de Notch peut mener au développement de cancer, où selon les conditions il peut être un suppresseur de tumeur ou un oncogène^{122, 123}. Le récepteur Notch est formé, entre autres, de 36 domaines de type EGF dont 23 peuvent subir une glycosylation de type O¹²³. De manière générale, l'inactivation de glycotransférases nécessaires pour la synthèse d'O-glycan apporte des défauts de signalisation du récepteur Notch¹²⁴. Un article d'Okajima et al. a rapporté que le récepteur Notch était confiné au RE dans des cellules de la drosophile déplétées en une glycotransférase essentielle, la O-fucosyltransférase 1 (OFUT1)¹²³. Une relation similaire à celle entre l'expression du récepteur Notch et OFUT1 pourrait expliquer le phénomène rencontré entre la TBM et les anticorps anti-HLA-II. Les anticorps pourraient bloquer l'action d'une glycotransférase ce qui confinerait la TBM à l'intérieur de la cellule.

Plusieurs acteurs du système immunitaire sont également régulés par la glycosylation. Par exemple, certains glycans-O agissent à titre de ligand carbohydrate comme support pour la production de structures de glycans pour les ligands des sélectines qui régulent l'inflammation et le trafic vasculaire comme l'enzyme GlcNAc-T-I glycotransférase qui est essentielle pour certaines cellules sanguines myéloïdes. Des expériences avec des souris déficientes pour cette enzyme ont montré une diminution du trafic leucocytaire menant à une diminution de l'inflammation^{117, 125}. Par

ailleurs, l'activation des récepteurs Toll-like de l'immunité innée se fait par liaison aux glycans bactériens ; de fait, plusieurs lectines exprimées sur les cellules de l'immunité innée lient des glycans (Ohtsubo).

Ainsi, nous constatons que la plupart des pathologies associées à la glycosylation sont en fait associées directement à des défauts des enzymes de la glycosylation. Il est donc possible que les anticorps anti-HLA-II modifient l'activité enzymatique d'une ou des transférase(s) impliquée(s) dans la glycosylation de la TBM. Cela pourrait empêcher son repliement et son relargage à la surface membranaire. Il est également possible que les anticorps anti-HLA-II n'empêchent pas son relargage, mais altèrent suffisamment sa structure pour empêcher la fixation de son ligand, la thrombine, limitant ainsi son potentiel anticoagulant.

5. Conclusion

Le rejet ABMR chronique est un obstacle à la survie du greffon. Nous avons démontré que les anticorps anti-HLA seuls peuvent moduler l'expression de la thrombomoduline, une glycoprotéine aux fonctions protectrices pour l'endothélium. Nous avons observé une diminution de l'expression extracellulaire et une accumulation intracellulaire de la TBM par les anticorps anti-HLA-II qui pourraient expliquer les lésions microangiopathiques observées dans la glomérulopathie du transplant. Ces résultats pourraient expliquer le pronostic plus sombre des patients ayant des DSA anti-HLA-II.

À la lumière des résultats obtenus, nous constatons que plusieurs expériences peuvent être réalisées afin de déterminer ce qui différencie l'expression de la TBM par les anticorps anti-HLA. La première approche serait d'utiliser des petits ARN interférents ou en épingle à cheveux pour les gènes des molécules impliquées dans les voies de signalisation des anticorps anti-HLA-I et II. En utilisant le même protocole de croissance et de stimulation que mon modèle, puis en procédant à une extraction d'ARN, il serait possible d'avoir une idée de quelles molécules peuvent être impliquées dans la signalisation des anticorps anti-HLA-I pour l'expression de la TBM. Concernant les anticorps anti-HLA-II, une approche similaire serait suggérée. Puisque les voies de signalisation sont moins connues, il serait possible d'analyser l'expression génique de plusieurs molécules potentiellement impliquées dans la signalisation chez les cellules T, B et endothéliales. À la suite de ces résultats, des expériences avec des inhibiteurs des molécules potentiellement impliquées dans la signalisation anti-HLA permettraient de confirmer les résultats obtenus au niveau génique. Ces expériences apporteraient beaucoup aux connaissances sur le rejet ABMR. Les voies de signalisation directement impliquées dans le rejet via les anticorps anti-HLA seraient mieux caractérisées.

Une autre approche serait l'utilisation d'inhibiteurs des facteurs de transcription KLF2 et NRF2 qui régulent l'expression génique de la TBM, respectivement TNF- α et Keap1. Cela permettrait d'analyser l'implication des anticorps anti-HLA au niveau transcriptionnel de la TBM.

En ce qui concerne l'influence de la glycosylation dans l'expression de la TBM, plusieurs techniques sont possibles. L'utilisation d'inhibiteurs pour les enzymes de glycosylation présente

une option intéressante pour évaluer l’implication des différentes enzymes dans la glycosylation de la TBM en fonction de la stimulation par des anticorps anti-HLA. Plusieurs autres méthodes au niveau génétique sont également disponibles comme les petits ARN interférents, en épingle à cheveux ou les courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées. Cela permettrait d’identifier laquelle ou lesquelles de ces enzymes sont modulées par les anticorps anti-HLA-II. Par la suite, un modèle *in vitro* murin supporterait les résultats obtenus avec le clonage cellulaire. Dans ce modèle, les souris seraient KO pour différents gènes des enzymes transférases. Il serait également possible d’utiliser les mêmes techniques génétiques pour observer quelles enzymes sont régulées à la hausse ou la baisse par les anticorps anti-HLA.

Afin d’expliquer l’inhibition du transport membranaire de la TBM en présence d’anticorps anti-HLA-II, il serait possible d’utiliser des marqueurs de compartiments cellulaires en immunofluorescence. Les données sur la glycosylation suggèrent que la TBM pourrait demeurer dans le RE ou l’appareil de Golgi lorsqu’il y a une glycosylation inadéquate avant d’être dégradée dans les lysozymes. Une immunofluorescence pour la TBM intracellulaire et les différents compartiments cellulaires permettrait de localiser plus précisément la TBM à l’intérieur de la cellule.

6. Bibliographie

1. Sayegh MH, Carpenter CB: Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises, *N Engl J Med* 2004, 351:2761-2766
2. Network UNfOSOPaT: History About Transplantation. Edited by Health Resources and Services Administration, U.S. Department of Health and Human Services, p.
3. Starzl TE: History of clinical transplantation, *World J Surg* 2000, 24:759-782
4. Kuby J, Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Sautès-Fridman C: Immunologie: le cours de Janis Kuby. Edited by Dunod, 2008,
5. Brent L: Immunogenetics: histocompatibility antigens: structure and function, *A History of Transplantation Immunology* London, Academic 1997, 153-159
6. Gibson T, Medawar PB: The fate of skin homografts in man, *J Anat* 1943, 77:299-310 294
7. Medawar PB: The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council, *J Anat* 1944, 78:176-199
8. Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, Sicard A, Rabeyrin M, Morelon E, Dubois V, Thaunat O: Recent advances in renal transplantation: antibody-mediated rejection takes center stage, *F1000Prime Rep* 2015, 7:51
9. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G: Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), *Kidney Int* 2005, 67:2089-2100
10. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Bilo HJ, Chalmers J, Heerspink HJ, Lee BJ, Perkins RM, Rossing P, Sairenchi T, Tonelli M, Vassalotti JA, Yamagishi K, Coresh J, de Jong PE, Wen CP, Nelson RG, Chronic Kidney Disease Prognosis C: Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis, *Lancet* 2012, 380:1662-1673
11. Whaley-Connell A, Shlipak MG, Inker LA, Kurella Tamura M, Bombaack AS, Saab G, Szpunar SM, McFarlane SI, Li S, Chen SC, Norris K, Bakris GL, McCullough PA, Kidney Early Evaluation Program I: Awareness of kidney disease and relationship to end-stage renal disease and mortality, *Am J Med* 2012, 125:661-669
12. Said A, Desai C, Lerma EV: Chronic kidney disease, *Dis Mon* 2015, 61:374-377
13. santé ICdisl: Traitement du stade terminal de l'insuffisance organique au Canada, de 2004 à 2013-rapport annuel du Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes. Edited by Santé. 2015, p. 135
14. santé ICdisl: Traitement du stade terminal de l'insuffisance organique au Canada, de 2004 à 2013-rapport annuel du Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes, 2015, 135
15. Québec T: Statistiques officielles 2014. Edited by Québec T. Transplant Québec, 2015, p.
16. Marcen R, Teruel JL: Patient outcomes after kidney allograft loss, *Transplant Rev (Orlando)* 2008, 22:62-72
17. Chandran S, Vincenti F: Clinical aspects: focusing on key unique organ-specific issues of renal transplantation, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014, 4:
18. Kaplan B, Meier-Kriesche HU: Death after graft loss: an important late study endpoint in kidney transplantation, *Am J Transplant* 2002, 2:970-974
19. Knoll G, Muirhead N, Trpeski L, Zhu N, Badovinac K: Patient survival following renal transplant failure in Canada, *Am J Transplant* 2005, 5:1719-1724
20. Ojo A, Wolfe RA, Agodoa LY, Held PJ, Port FK, Leavey SF, Callard SE, Dickinson DM, Schmouder RL, Leichtman AB: Prognosis after primary renal transplant failure and the beneficial effects of repeat transplantation: multivariate analyses from the United States Renal Data System, *Transplantation* 1998, 66:1651-1659

21. Magee JC, Barr ML, Basadonna GP, Johnson MR, Mahadevan S, McBride MA, Schaubel DE, Leichtman AB: Repeat organ transplantation in the United States, 1996-2005, *Am J Transplant* 2007, 7:1424-1433
22. Rao PS, Ojo A: Organ retransplantation in the United States: trends and implications, *Clin Transpl* 2008, 57-67
23. Luan FL, Miles CD, Cibrik DM, Ojo AO: Impact of simultaneous pancreas and kidney transplantation on cardiovascular risk factors in patients with type 1 diabetes mellitus, *Transplantation* 2007, 84:541-544
24. 2014 CORR Annual Report: Treatment of End-Stage Organ Failure in Canada, 2003 to 2012, available (free) online at <https://securecihica.estore/productFamilyhtm?locale=en&pf=PFC2481> NB: the data presented in the proposal refer to Table 29, p.42:
25. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, Cosio FG: Identifying specific causes of kidney allograft loss, *Am J Transplant* 2009, 9:527-535
26. Loupy A, Hill GS, Jordan SC: The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure, *Nature reviews Nephrology* 2012, 8:348-357
27. Jordan SC, Vo AA: Donor-specific antibodies in allograft recipients: etiology, impact and therapeutic approaches, *Curr Opin Organ Transplant* 2014, 19:591-597
28. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR: The natural history of chronic allograft nephropathy, *N Engl J Med* 2003, 349:2326-2333
29. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF: Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence, *Am J Transplant* 2012, 12:388-399
30. Becker LE, Morath C, Suesal C: Immune mechanisms of acute and chronic rejection, *Clin Biochem* 2016,
31. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M: Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches, *Am J Transplant* 2014, 14:255-271
32. Wood KJ, Goto R: Mechanisms of rejection: current perspectives, *Transplantation* 2012, 93:1-10
33. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF: Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining, *Am J Transplant* 2009, 9:2312-2323
34. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D: Multiple pathways to allograft rejection, *Transplantation* 2002, 73:1373-1381
35. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM: Effector mechanisms in transplant rejection, *Immunol Rev* 2003, 196:51-64
36. Chinen J, Buckley RH: Transplantation immunology: solid organ and bone marrow, *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125:S324-335
37. Kasiske BL, Gaston RS, Gourishankar S, Halloran PF, Matas AJ, Jeffery J, Rush D: Long-term deterioration of kidney allograft function, *Am J Transplant* 2005, 5:1405-1414
38. Lee H, Kim JI, Moon IS, Chung BH, Yang CW, Kim Y, Han K, Oh EJ: Investigation of Serum Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies at the Time of Renal Allograft Rejection, *Ann Lab Med* 2015, 35:314-320
39. Lesage J, Noël R, Lapointe I, Côté I, Wagner E, Désy O, Caumartin Y, Agharazii M, Batal I, Houde I, De Serres SA: Donor-specific Antibodies, C4d and Their Relationship with the Prognosis of Transplant Glomerulopathy, *Transplantation* 2015, 99(1):69-76
40. De Serres SA, Noel R, Cote I, Lapointe I, Wagner E, Riopel J, Latulippe E, Agharazii M, Houde I: 2013 Banff Criteria for Chronic Active Antibody-Mediated Rejection: Assessment in a Real-Life Setting, *Am J Transplant* 2016, 16:1516-1525
41. Game DS, Lechler RI: Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance, *Transpl Immunol* 2002, 10:101-108
42. Oberbarnscheidt MH, Zeher D, Lakkis FG: The innate immune system in transplantation, *Seminars in immunology* 2011, 23:264-272

43. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Baldwin WM, 3rd, Bracamonte ER, Broecker V, Cosio F, Demetris AJ, Drachenberg C, Einecke G, Gloor J, Glotz D, Kraus E, Legendre C, Liapis H, Mannon RB, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Rodriguez ER, Seron D, Seshan S, Suthanthiran M, Wasowska BA, Zachary A, Zeevi A: Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups, *Am J Transplant* 2010, 10:464-471
44. Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB: Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action, *Am J Kidney Dis* 1996, 28:159-172
45. Halloran PF, Merino Lopez M, Barreto Pereira A: Identifying Subphenotypes of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplants, *Am J Transplant* 2016,
46. Stegall MD, Gloor JM: Deciphering antibody-mediated rejection: new insights into mechanisms and treatment, *Curr Opin Organ Transplant* 2010, 15:8-10
47. Haas M: Pathologic features of antibody-mediated rejection in renal allografts: an expanding spectrum, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012, 21:264-271
48. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al.: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology, *Kidney Int* 1999, 55:713-723
49. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M: Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions, *Am J Transplant* 2008, 8:753-760
50. Haas M: The Revised (2013) Banff Classification for Antibody-Mediated Rejection of Renal Allografts: Update, Difficulties, and Future Considerations, *Am J Transplant* 2016, 16:1352-1357
51. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, Goldberg A, Birk PE, Rush DN, Nickerson PW: Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant, *Am J Transplant* 2012, 12:1157-1167
52. Terasaki PI: History of HLA: Ten recollections. Edited by UCLA Tissue Typing Laboratory, 1990,
53. Klein J, Sato A: The HLA system. First of two parts, *N Engl J Med* 2000, 343:702-709
54. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O: Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation, *Nat Rev Immunol* 2011, 11:823-836
55. Ayala Garcia MA, Gonzalez Yebra B, Lopez Flores AL, Guani Guerra E: The major histocompatibility complex in transplantation, *J Transplant* 2012, 2012:842141
56. 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* 2003, 14:1336-1348
57. Choo SY: The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications, *Yonsei Med J* 2007, 48:11-23
58. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, Catrou PG, Bolin P, Kendrick WT, Kendrick SA, Harland RC, Terasaki PI: Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts, *Transplantation* 2013, 95:410-417
59. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, Santos-Nunez E, Steggard C, Galliford J, McLean A, Cook TH, Cairns T, Roufosse C, Taube D: De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy, *Transplantation* 2012, 94:172-177
60. Devos JM, Gaber AO, Teeter LD, Graviss EA, Patel SJ, Land GA, Moore LW, Knight RJ: Intermediate-term graft loss after renal transplantation is associated with both donor-specific antibody and acute rejection, *Transplantation* 2014, 97:534-540
61. Hanf W, Bonder CS, Coates PT: Transplant glomerulopathy: the interaction of HLA antibodies and endothelium, *J Immunol Res* 2014, 2014:549315

62. Naemi FM, Carter V, Kirby JA, Ali S: Anti-donor HLA class I antibodies: pathways to endothelial cell activation and cell-mediated allograft rejection, *Transplantation* 2013, 96:258-266
63. Jaffe EA: Cell biology of endothelial cells, *Hum Pathol* 1987, 18:234-239
64. Ozdemir BH, Sar A, Haberal M: The importance of glomerular deposits of von Willebrand factor in human renal allografts, *Ren Fail* 2006, 28:315-321
65. Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang XF: An evolving new paradigm: endothelial cells--conditional innate immune cells, *J Hematol Oncol* 2013, 6:61
66. Martin FA, Murphy RP, Cummins PM: Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013, 304:H1585-1597
67. Al-Lamki RS, Bradley JR, Pober JS: Endothelial cells in allograft rejection, *Transplantation* 2008, 86:1340-1348
68. Remport A, Ivanyi B, Mathe Z, Tinckam K, Mucsi I, Molnar MZ: Better understanding of transplant glomerulopathy secondary to chronic antibody-mediated rejection, *Nephrol Dial Transplant* 2015, 30:1825-1833
69. Sis B, Campbell PM, Mueller T, Hunter C, Cockfield SM, Cruz J, Meng C, Wishart D, Solez K, Halloran PF: Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause, *Am J Transplant* 2007, 7:1743-1752
70. Shimizu T, Ishida H, Shirakawa H, Omoto K, Tsunoyama K, Iida S, Tanabe K, Yamaguchi Y: Clinicopathological analysis of transplant glomerulopathy cases, *Clin Transplant* 2009, 23 Suppl 20:39-43
71. Baid-Agrawal S, Farris AB, 3rd, Pascual M, Mauiyyedi S, Farrell ML, Tolkoff-Rubin N, Collins AB, Frei U, Colvin RB: Overlapping pathways to transplant glomerulopathy: chronic humoral rejection, hepatitis C infection, and thrombotic microangiopathy, *Kidney Int* 2011, 80:879-885
72. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, Castro MC, David DS, David-Neto E, Bagnasco SM, Cendales LC, Cornell LD, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Farris AB, 3rd, Gibson IW, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nickeleit V, Randhawa P, Rodriguez ER, Rush D, Smith RN, Tan CD, Wallace WD, Mengel M, Banff meeting report writing c: Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions, *Am J Transplant* 2014, 14:272-283
73. Blume OR, Yost SE, Kaplan B: Antibody-mediated rejection: pathogenesis, prevention, treatment, and outcomes, *J Transplant* 2012, 2012:201754
74. Malek AM, Jackman R, Rosenberg RD, Izumo S: Endothelial expression of thrombomodulin is reversibly regulated by fluid shear stress, *Circ Res* 1994, 74:852-860
75. Fernandez GC, Te Loo MW, van der Velden TJ, van der Heuvel LP, Palermo MS, Monnens LL: Decrease of thrombomodulin contributes to the procoagulant state of endothelium in hemolytic uremic syndrome, *Pediatr Nephrol* 2003, 18:1066-1068
76. Weiler H, Isermann BH: Thrombomodulin, *J Thromb Haemost* 2003, 1:1515-1524
77. Owen WG, Esmon CT: Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C, *J Biol Chem* 1981, 256:5532-5535
78. Karmochkine M, Boffa MC: [Thrombomodulin: physiology and clinical applications (excluding systemic diseases)], *Rev Med Interne* 1997, 18:119-125
79. Van de Wouwer M, Conway EM: Novel functions of thrombomodulin in inflammation, *Crit Care Med* 2004, 32:S254-261
80. Conway EM: Thrombomodulin and its role in inflammation, *Semin Immunopathol* 2012, 34:107-125
81. Boon RA, Horrevoets AJ: Key transcriptional regulators of the vasoprotective effects of shear stress, *Hamostaseologie* 2009, 29:39-40, 41-33
82. Wu W, Xiao H, Laguna-Fernandez A, Villarreal G, Jr., Wang KC, Geary GG, Zhang Y, Wang WC, Huang HD, Zhou J, Li YS, Chien S, Garcia-Cardenas G, Shyy JY: Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a, *Circulation* 2011, 124:633-641
83. Weisel JW, Nagaswami C, Young TA, Light DR: The shape of thrombomodulin and interactions with thrombin as determined by electron microscopy, *J Biol Chem* 1996, 271:31485-31490
84. Ito T, Kakihana Y, Maruyama I: Thrombomodulin as an intravascular safeguard against inflammatory and thrombotic diseases, *Expert Opin Ther Targets* 2015, 1-8

85. Li YH, Kuo CH, Shi GY, Wu HL: The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation, *J Biomed Sci* 2012, 19:34
86. Weiler-Guettler H, Yu K, Sofi G, Gudas LJ, Rosenberg RD: Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9 embryonal carcinoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89:2155-2159
87. Bouton MC, Venisse L, Richard B, Pouzet C, Arocas V, Jandrot-Perrus M: Protease nexin-1 interacts with thrombomodulin and modulates its anticoagulant effect, *Circ Res* 2007, 100:1174-1181
88. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vries A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, Herbert JM, Collen D, Theilmeyer G: The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways, *J Exp Med* 2002, 196:565-577
89. Waugh JM, Yuksel E, Li J, Kuo MD, Kattash M, Saxena R, Geske R, Thung SN, Shenaq SM, Woo SL: Local overexpression of thrombomodulin for in vivo prevention of arterial thrombosis in a rabbit model, *Circ Res* 1999, 84:84-92
90. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, Kawahara K, Yoshimoto Y, Tanaka M, Uchimura T, Ida N, Yamazaki Y, Yamada S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Iino S, Taniguchi N, Maruyama I: The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism, *J Clin Invest* 2005, 115:1267-1274
91. Van de Wouwer M, Plaisance S, De Vries A, Waelkens E, Collen D, Persson J, Daha MR, Conway EM: The lectin-like domain of thrombomodulin interferes with complement activation and protects against arthritis, *J Thromb Haemost* 2006, 4:1813-1824
92. Delvaeye M, Noris M, De Vries A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del-Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zaja C, Remuzzi G, Conway EM: Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome, *N Engl J Med* 2009, 361:345-357
93. Chao TH, Tsai WC, Chen JY, Liu PY, Chung HC, Tseng SY, Kuo CH, Shi GY, Wu HL, Li YH: Soluble thrombomodulin is a paracrine anti-apoptotic factor for vascular endothelial protection, *Int J Cardiol* 2014, 172:340-349
94. Li YH, Shi GY, Wu HL: The role of thrombomodulin in atherosclerosis: from bench to bedside, *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2006, 4:183-187
95. Lohi O, Urban S, Freeman M: Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by Mammalian rhomboids, *Curr Biol* 2004, 14:236-241
96. Califano F, Giovannillo T, Pantone P, Campana E, Parlapiano C, Alegiani F, Vincentelli GM, Turchetti P: Clinical importance of thrombomodulin serum levels, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2000, 4:59-66
97. Ohlin AK, Morser J, Ohlin H: Soluble thrombomodulin antigen in plasma is increased in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy, *Thromb Res* 1996, 82:313-322
98. Cowan PJ: Coagulation and the xenograft endothelium, *Xenotransplantation* 2007, 14:7-12
99. Kim H, Hawthorne WJ, Kang HJ, Lee YJ, Hwang JI, Hurh S, Ro H, Jeong JC, Cho B, Yang J, Ahn C: Human thrombomodulin regulates complement activation as well as the coagulation cascade in xenoinnate response, *Xenotransplantation* 2015, 22:260-272
100. Mannam VK, Lewis RE, Cruse JM: The fate of renal allografts hinges on responses of the microvascular endothelium, *Exp Mol Pathol* 2013, 94:398-411
101. Tsai EW, Reed EF: MHC class I signaling: new functional perspectives for an old molecule, *Tissue Antigens* 2014, 83:375-381
102. Sis B, Grynoch R, Murray AG, Campbell P, Solez K: Antibody-mediated rejection with a striking interstitial monocyte/macrophage infiltration in a renal allograft under FTY720 treatment, *Am J Kidney Dis* 2008, 51:127-130
103. Ionescu DN, Girnita AL, Zeevi A, Duquesnoy R, Pilewski J, Johnson B, Studer S, McCurry KR, Yousem SA: C4d deposition in lung allografts is associated with circulating anti-HLA alloantibody, *Transpl Immunol* 2005, 15:63-68
104. Fedson SE, Daniel SS, Husain AN: Immunohistochemistry staining of C4d to diagnose antibody-mediated rejection in cardiac transplantation, *J Heart Lung Transplant* 2008, 27:372-379

105. Dambrin C, Klupp J, Birsan T, Luna J, Suzuki T, Lam T, Stahr P, Hausen B, Christians U, Fitzgerald P, Berry G, Morris R: Sirolimus (rapamycin) monotherapy prevents graft vascular disease in nonhuman primate recipients of orthotopic aortic allografts, *Circulation* 2003, 107:2369-2374
106. Narayanan K, Jendrisak MD, Phelan DL, Mohanakumar T: HLA class I antibody mediated accommodation of endothelial cells via the activation of PI3K/cAMP dependent PKA pathway, *Transpl Immunol* 2006, 15:187-197
107. Jin YP, Fishbein MC, Said JW, Jindra PT, Rajalingam R, Rozengurt E, Reed EF: Anti-HLA class I antibody-mediated activation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of Bcl-2 and Bcl-xL expression in endothelial cells, *Hum Immunol* 2004, 65:291-302
108. Sohn RH, Deming CB, Johns DC, Champion HC, Bian C, Gardner K, Rade JJ: Regulation of endothelial thrombomodulin expression by inflammatory cytokines is mediated by activation of nuclear factor-kappa B, *Blood* 2005, 105:3910-3917
109. Lentz SR, Sadler JE: Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine, *J Clin Invest* 1991, 88:1906-1914
110. Moore KL, Esmon CT, Esmon NL: Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture, *Blood* 1989, 73:159-165
111. Gerlitz B, Hassell T, Vlahos CJ, Parkinson JF, Bang NU, Grinnell BW: Identification of the predominant glycosaminoglycan-attachment site in soluble recombinant human thrombomodulin: potential regulation of functionality by glycosyltransferase competition for serine474, *The Biochemical journal* 1993, 295 (Pt 1):131-140
112. Furukawa K, Kobata A: Protein glycosylation, *Curr Opin Biotechnol* 1992, 3:554-559
113. Ohtsubo K, Marth JD: Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, *Cell* 2006, 126:855-867
114. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV: Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, 13:448-462
115. Lee HS, Qi Y, Im W: Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study, *Sci Rep* 2015, 5:8926
116. Butler M: Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems, *Cytotechnology* 2006, 50:57-76
117. Zhang XL: Roles of glycans and glycopeptides in immune system and immune-related diseases, *Curr Med Chem* 2006, 13:1141-1147
118. Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G: Concepts and principles of O-linked glycosylation, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998, 33:151-208
119. Tenno M, Ohtsubo K, Hagen FK, Ditto D, Zarbock A, Schaefer P, von Andrian UH, Ley K, Le D, Tabak LA, Marth JD: Initiation of protein O glycosylation by the polypeptide GalNAcT-1 in vascular biology and humoral immunity, *Mol Cell Biol* 2007, 27:8783-8796
120. Wopereis S, Lefever DJ, Morava E, Wevers RA: Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review, *Clin Chem* 2006, 52:574-600
121. Lentz SR, Tsiang M, Sadler JE: Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor-alpha: comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms, *Blood* 1991, 77:542-550
122. Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL: Notch signaling in development and cancer, *Endocr Rev* 2007, 28:339-363
123. Okajima T, Xu A, Lei L, Irvine KD: Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding, *Science* 2005, 307:1599-1603
124. Stanley P: Regulation of Notch signaling by glycosylation, *Curr Opin Struct Biol* 2007, 17:530-535
125. Guerra CB, Busch R, Doebele RC, Liu W, Sawada T, Kwok WW, Chang MD, Mellins ED: Novel glycosylation of HLA-DRAalpha disrupts antigen presentation without altering endosomal localization, *J Immunol* 1998, 160:4289-4297

7. Annexe

TITLE PAGE.

Innate Immunity in Solid Organ Transplantation: an Update and Therapeutic Opportunities.

Stéphanie Béland BSc, Olivier Désy PhD, Patrice Vallin MSc, Caroline Basoni PhD and Sacha A. De Serres MD SM

Transplantation Unit, Renal Division, Department of Medicine, CHU de Québec Research Center, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

Publish by *Expert Review of Clinical immunology*, March 2015; 11(3):377-89.

Address for Correspondence:

Sacha A. De Serres, MD SM FRCPC
Transplantation Unit, Renal Division
Department of Medicine
CHU de Québec – L'Hôtel-Dieu
Faculty of Medicine, Université Laval
11 Côte du Palais
Québec, QC, Canada G1R 2J6
Tel: 418-691-5464
Fax: 418-691-5757
sacha.deserres@crchuq.ulaval.ca

Word count: 95 (abstract), 6919 (body text)

Tables and Figures: 1 table

Key words: Transplantation, innate immunity, monocytes, complement, cytokines, dendritic cells, Toll-like receptors

ABBREVIATIONS.

AMR: Antibody-mediated rejection
APC: Antigen presenting cell
BMDC: Bone marrow derived cells
BMT: Bone-marrow transplant
CAM: Cell adhesion molecule
CCL-X: C-C chemokine ligand
CCR-X: C-C chemokine receptor
C-FMS: Colony-stimulator factor 1 receptor
DAMPs: Damage-associated molecular patterns
DCs: Dendritic cells
DGF: Delayed-graft function
DSA: Donor-specific antibodies
GHVD: Graft-versus-host disease
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA: Human-leucocyte antigen
HMGB1: High-mobility group box 1 nuclear protein
HSP: Heat shock protein
HUS: Hemolytic-uremic syndrome
ICAM-1: Intercellular molecule adhesion 1
ILT: Ig-like transcripts
IRF3: Interferon-regulator factor 3
IRI: Ischemia/reperfusion injury
KIR: Killer-cell immunoglobulin-like receptor
LFA-1: Lymphocyte function-associated-antigen 1
LP: Lectin pathway
MBL: Mannose-binding lectin
M-CSF: Monocyte-colony-stimulating factor
mDCs: Myeloid dendritic cells
MDSCs: Myeloid derived suppressor cells
MHC: Major histocompatibility complex
MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1
Mreg: Regulatory macrophage
NK: Natural killer cells

NO: Nitric oxide

PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

pDCs: Plasmacytoid dendritic cells

PML: Progressive multifocal leucoencephalopathy

PRM: Pattern recognition molecule

PRR: Pathogen recognition receptor

ROS: Reactive oxygen species

TLR: Toll-like receptor

tolDC: Tolerogenic dendritic cell

Treg: Regulatory T cell

TTP: Thrombotic thrombocytopenia purpura

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1

VLA-4: Very late-antigen-4

vWF: Von Willebrand factor

ABSTRACT.

Innate immunity is increasingly recognized as a major player in transplantation. In addition to its role in inflammation in the early post-transplant period, innate immunity shapes the differentiation of cells of the adaptive immunity, with a capacity to promote either rejection or tolerance. Emerging data indicate that innate allorecognition, a characteristic previously limited to lymphocytes, is involved in allograft rejection. This review briefly summarizes the physiology of each component of the innate immune system in the context of transplantation and presents the current or promising therapeutic applications, such as cellular, anti-complement and anti-cytokine therapies.

BODY TEXT.

INTRODUCTION.

Innate immunity is phylogenetically the oldest part of the immune system. It constitutes the first line of defense against foreign agents. Whereas the adaptive immune cells collectively recognize a broad-range of specific antigens (up to 10^7), innate immune cells recognize a more limited repertoire (approximately 10^3) of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), through pattern-recognition receptors (PRRs), such as the toll-like receptors (TLRs) which bind microbial agents and endogenous damaged cells. The innate immune system includes cellular components (monocytes, macrophages, dendritic cells (DCs), neutrophils and humoral components, mostly complement proteins, cytokines and cell adhesion molecules (CAMs)).

Historically, T cells have been the main focus of interest in transplant immunology¹. However, the lack of major improvements in long-term graft survival, due to high rates of chronic rejection, led investigators to explore new pathophysiological pathways behind rejection. Since the development of C4d staining and of new techniques to identify anti-human-leucocyte antigen (HLA) antibodies, there has been a major shift toward B cell immunology. More recently, transplant immunologists renewed interest with innate immunity. There is now increasing evidence that cells and proteins of the innate immune system play a major role in allograft damage. In addition to their role as effector cells following adaptive immunity activation, there is provocative data suggesting that cells such as monocytes may be activated upon non-self, allogeneic recognition². The inflammatory milieu, for instance triggered early post-transplant and during infectious episodes, shape T cell differentiation. Inhibition of complement activation seems to be sufficient to delay and potentially prevent the development of the antibody-mediated rejection (AMR) phenotype³. It becomes obvious that innate recognition of the graft and its activation is required for rejection, but precisely how innate immunity should be tackled to prevent rejection is still to be defined.

Here, we present a brief review of the physiology of each component of the innate immune system, followed by an update on the current therapeutic advances for each component (Figure 1 and Table 1).

Cells and cellular components

Monocytes and macrophages

Monocytes constitute 5-10% of the peripheral circulating leucocytes in humans, originate in the bone marrow from a common myeloid progenitor and can differentiate into dendritic cells or macrophages⁴. They constitute a large pool of effector cells in blood circulation during both homeostasis and inflammatory responses.

There is increasing evidence suggesting that monocytes may play a key role in allograft rejection in humans. Clinical data suggest that monocytes infiltrating the glomeruli of kidney recipients are associated with poor renal function at 1, 2 and 4 years post-transplant⁵. In this study by Tinckam *et al.*, although monocyte infiltration correlated with C4d deposition, it was independently associated with worse outcomes following acute allograft rejection. Transcripts of monocyte-derived cytokines are elevated during rejection⁶⁻⁸. The monocytes/macrophages seem to be sufficient to drive rejection in the absence of the adaptive immune system, as demonstrated in an NIH study where human renal transplant recipients were lymphocyte-depleted with alemtuzumab, without maintenance immunosuppression; all the subjects experienced an acute rejection episode characterized by massive infiltration of activated monocytes⁹. This study highlights the importance of early responding monocytes in human allograft rejection. Recently, we have shown that in patients with acute and chronic rejection, inflammatory monocytes cultured *ex vivo* secrete high levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α ^{10,11}. In line with this observation, we and others observed that in biopsies from kidney recipients with glomerular rejection, infiltrating leucocytes were mainly monocytes and CD8 $^{+}$ T cells¹²⁻¹⁴.

Macrophages are phagocytes that infiltrate the allograft during rejection and non-rejection states, and their exact role remains to be defined. It is now established that macrophages can be pro (M1 subtype) or anti-inflammatory (M2 subtype) and bears some plasticity with regard to their phenotype, according to the milieu in which they are activated¹⁵. Pro-inflammatory macrophages can play an active role during rejection, including phagocytosis, antigen-presentation to CD4 $^{+}$ T cells and production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-12, IL-18, IFN- γ and TNF- α ¹⁶. They have the capacity to stimulate naive T differentiation and to sustain the responses of memory cells¹⁷. Interestingly, it seems that these cells could persist for a long time within the graft and participate in direct alloreactivity. In a recent study using human dermis in sex-mismatched bone-marrow transplant (BMT), Haniffa *et al.* observed that, whereas recipient DCs are rapidly

depleted and replaced by donor cells, recipient macrophages persist in graft-versus-host disease (GVHD) lesions for many months. These cells are pro-inflammatory and they increase the secretion of cytokines by memory CD4⁺ T cells, although they induce little proliferation of naïve or memory CD4⁺ T cells. These data support the classical notion that macrophages are poor stimulators of naïve T cells compared to DCs.

During pro-inflammatory conditions such as ischemic/reperfusion injury (IRI), monocytes/macrophages contribute with DCs in major histocompatibility complex (MHC) II antigen processing and presentation to T cells ^{17, 18}. They accumulate in isografts as well as in allografts; however, there is emerging data suggesting that the process is different between the two types of grafts. Oberbarnscheidt *et al.* recently demonstrated that whereas isografts produce transient and mild differentiation of monocytes into DCs, allografts lead to a sustained differentiation of monocytes into mature IL-12-secreting DCs, able to stimulate T cell proliferation ². These observations were made in wild-type, T cell-deficient, B cell-deficient and in innate lymphoid cell-deficient mice, supporting the notion that monocytes can recognize allogeneic non-self and initiate graft rejection independent of their activation due to the release of danger molecules. These observations may seem counter-intuitive at first glance, but nonetheless underscore the fact that the role of innate immunity in allograft rejection has probably been underestimated so far.

Research made on macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and its receptor, colony-stimulator factor 1 receptor (C-FMS), illustrate the complex role of the monocyte/macrophage system in rejection. M-CSF levels increase during acute rejection. It is produced by leucocytes and other cells, including epithelial renal tubular cells ¹⁹. Inhibition of C-FMS in a rat model of kidney transplant initially abrogated macrophage and DC infiltration to the graft post-transplant ²⁰. Interestingly in this model, T-cell activation was suppressed within the graft, although systemic T cells were normal. Despite the initial absence of allograft damage, the rats subsequently developed at day 8 severe capillaritis, microthrombosis, C4d deposition and neutrophil infiltration reminiscent of AMR, in the absence of any T cell rejection. The fms inhibitor produces a depletion of peripheral monocytes, impeding their infiltration within the graft. It is conceivable that the indirect effect of fms inhibitor on T cell rejection is due to the massive reduction of local antigen presentation by macrophages, with no effect on T cell function. This hypothesis would explain the intact function

of systemic T cells and underscores the importance of monocytes/macrophages in antigen presentation.

Interventional data in humans showed a potential interest in manipulating macrophages *ex vivo* to prevent renal allograft rejection. Hutchinson *et al.* from the European ONE study consortium produced regulatory macrophages (Mregs) from donor peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultured with M-CSF and IFN- γ pre-transplant ²¹. In a pilot study, they administered Mregs to two renal transplant recipients, minimized to low-dose tacrolimus therapy at 10 weeks post-transplant. These cells were tracked by nuclear imaging and were shown to remain viable post infusion; however, the tracking was limited to 30 hours. Of note, a large volume of 7.5×10^8 Mregs were administered. These cells were obtained by leukapheresis of the donor and isolation of monocytes by plastic adherence. At 3 years post-transplant, patients were clinically stable; however, no protocol biopsies were reported after more than week 52. Larger studies and longer follow-up will tell us how these promising results translate into benefits for patients.

Therefore, there is accumulating data suggesting that monocytes and macrophages may play an important role in allograft rejection. Potential applications include measuring the levels of pro-inflammatory cytokines secreted *ex vivo* to identify recipients with rejection, and therapeutic *ex vivo* manipulation of macrophages to produce Mregs. Inhibition of specific receptors, such as C-FMS and inhibition of pro-inflammatory cytokines (as detailed below) also seems promising.

Dendritic cells

DCs are a major component of the innate immunity, as players linking innate and adaptive immunity ². Under pro-inflammatory conditions, recognition of PAMPs by PRRs triggers DC maturation, which allows transition from innate to adaptive immunity activation. The classical view of DC involvement in graft rejection is as follows: immature circulating DCs are attracted to the graft through a gradient of the pro-inflammatory chemokines and cytokines; within the graft, DCs mainly act as antigen-presenting cells (APCs) for donor MHC class II molecules ²². Upon activation, DCs upregulate C-C chemokine receptor 7 (CCR7), which triggers their migration to secondary lymphoid tissues, where they initiate cognate recognition of MHC peptides by specific T cells. Concurrent with migration, DCs maturation process enhances the expression of co-

stimulation molecules, which further enhance their T cell-stimulation and differentiation capacities within the lymphoid tissues.

The two main subsets of DCs are called myeloid or « conventional » DCs (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). mDCs secrete high levels of IL-12 and are able to stimulate effector T cells proliferation and alloreactivity²³. Recent *in vitro* data revealed that ischemic injury increase the capacity of mDCs to stimulate allogeneic T cell proliferation and IFN-γ production²⁴. *In vivo*, mDCs conditioned with ischemia demonstrated enhanced migration capacity, further supporting enhanced immunogenicity²⁵.

In contrast to mDCs, pDCs seem to be more efficient in promoting regulatory T cells (Treg) differentiation and maturation²³. Although pDCs are able to mediate anti-viral immunity, one of their crucial roles seems to be tolerogenic, more specifically to contribute to peripheral T cell tolerance. Recently, there has been a growing interest in developing pharmacologically-modified tolerogenic DCs (TolDCs) to prevent autoimmune disease and graft rejection^{26, 27}. The different effects of DCs seem to be related to differential surface expression of co-stimulation ligands and cytokine production, both essential to the maturation and polarization of T cells.^{23, 28}. TolDCs express low levels of MHC molecules, CD80 and CD86. They are physiologically resistant to the maturation signal provided by damage-associated molecular patterns (DAMPs) stimulation. In addition, they secrete no cytokines to polarize T cells into Th1 or Th2 phenotype, which likely explains their poor capacity to stimulate effector T cells.

In vitro, TolDCs can be generated from immature DCs, like pDCs which can be identified as pre-DCs, using TGF-β and IL-10. They regulate Treg differentiation, expansion and suppressive capacity. It has been shown that TolDCs removal leads to Treg loss²⁸. Several investigators reported that TolDCs generated *in vitro* are able to regulate immune response through varying mechanisms, including promoting Treg differentiation through the IDO pathway²⁹. Regulatory DCs used in combination with B7-CD28 costimulation blockade before transplantation has given good results in prolonging kidney allograft survival in nonhuman primates³⁰. In a murine model of corneal allograft, inhibition of B7 molecule and tryptophan-catabolising enzyme IDO induced anergy in alloreactive T cells and promoted Tregs³¹.

Interestingly, Turnquist *et al.* suggested that a strategy using donor TolDCs combined with rapamycin could lead to long-term graft acceptance³². In some experiments, TolDCs are generated from monocytes treated with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-4. These cells have not been tested on transplant patients yet, but they have been tested on type 1 diabetic patients³³. These patients received one of the following: peripheral blood monocytes matured to DCs with IL-4 and GM-CSF or immunosuppressive DCs, generated identically but with addition of antisense oligonucleotides targeting the 5' end of CD40, CD80 and CD86. Cells were re-injected intra-dermally at 4 timepoints every 2 weeks. Compared to patients who received control DCs, patients who received immunosuppressive DCs had a trend towards an increase in the frequency of circulating Foxp3+ Tregs at 6 months.

Therefore, DCs have received little attention so far, but emerge as a potentially interesting target. There is a growing interest in using DCs as a strategy to promote transplant tolerance, however this science is still at its infancy.

NK cells

Natural killer (NK) cells originate from the lymphoid lineage, but they perform their immune function through a distinct system of receptors. Their activation is regulated by a balance between surface activating and inhibitory receptors. A comprehensive discussion of the NK receptors is beyond the scope of the present review, however the general concept underlying NK cell activation is that inhibitory receptors, of which the “killer cell Ig-like receptor” (KIR) and “Ig-like transcripts” (ILTs) are the two most important families, recognize MHC class I molecules on healthy cells, whereas activating receptors bind ligands usually expressed on the surface of pathogens and damaged endogenous cells³⁴. Ligation of MHC I by inhibitory receptors prevent cytotoxicity. In the non-transplant setting, infected or stressed syngeneic cells down-regulate the expression of MHC I molecules and hence become target for activated NK cells. The major cytokines involved in NK cell activation are IL-2, IL-15 et IL-21³⁵. KIRs are encoded by 14 genes in humans and are expressed in a large variety of NK cells subsets, which creates a heterogeneous population of NK cells within the same individual^{34, 36}.

The role of NK cells in allograft rejection remains controversial. In naive mice, NK are involved in allograft rejection via the “missing self” recognition ³⁷, which is the activation of NK cells by the absence of self MHC molecules on the cellular surface. Transplanted cells frequently down-regulate MHC expression ³⁸. The classical view from animal models was that NK cell depletion had no impact on rejection ³⁹. This view has been challenged in the recent years. Liu *et al.* demonstrated the opposite in a C57BL/6 to BALB/c mouse model, in which NK cells depletion prevented rejection ³⁷. On the opposite, other investigators reported that NK cells may indirectly promote transplant tolerance by killing donor APCs; in the absence of NK cells, these donor APCs survive, migrate to the lymphoid tissues and activate alloreactive T cells ⁴⁰. However, the relevance of such observations in human transplantation is still unclear.

Others observed that NK cells can also mediate rejection in absence of T cells. They infiltrate the graft during rejection in stringent Rag-1 deficient mice, with no mature T and B lymphocytes ⁴¹. In wild-type mice, they activate DCs by producing IFN- γ , TNF- α and TNF- β , which leads to an amplification of the response mediated by T cells ^{42, 43}. These pro-inflammatory molecules up-regulate MHC expression and co-stimulation molecules on professional and non-professional APCs (such as endothelial cells), which ultimately increases direct and indirect T-cell alloreactivity ⁴⁴.

The direct cytotoxic effect of NK cells is largely mediated by perforins and granzymes, which have been shown to be non-invasive markers of rejection since the 1990s ^{34, 45}. However, some animal models have shown a crucial role for perforin-dependent NK cells in induction of islet allograft tolerance ⁴⁶. Besides the direct killing effect, NK cells interact with components of the complement system, as they express receptors for at least C1q and iC3b ⁴⁷. C3 deposition increases the lytic effect of NK cells and it has been speculated that the presence of complement on the endothelium of the allograft promote NK activation, endothelial injury and rejection ⁴⁸.

The effects of immunosuppressive drugs on NK cells are controversial. The *in vitro* work performed by Shao-Hsien *et al.* demonstrated a lack of consistent inhibition of NK cells by cyclosporine, while the *in vitro* study by Wasik *et al.*, suggested that pre-incubation of NK cells with cyclosporine has an inhibitory effect ^{49, 50}. In a rat model, tacrolimus gave an opposite result, producing an increase in NK cell activity following administration ⁵¹.

Therefore, there is compelling evidence suggesting that NK cells amplify alloimmune responses, however they do not seem sufficient to trigger rejection in humans. Given the large heterogeneity within the NK cells population and their apparently dispensable role in rejection, the modulation of their responses for therapeutic purposes currently seems to be a challenging avenue. Their contributing role in acute rejection and potentially chronic rejection under maintenance immunosuppression needs to be better defined from a mechanistic point of view, before considering potential therapeutic applications.

Neutrophils

Neutrophils play a major role in the innate immune response. In the transplant setting, they share with monocytes the role of first responders to reach the allograft following inflammation triggered by IRI^{52, 53}. On site, they produce large quantities of cytokines, such as IFN- γ , contributing to monocytes and macrophages chemotaxis. During bacterial infection, neutrophils participate in T-cell activation by processing phagocytosed bacteria and secreting processed peptides that are subsequently presented by neighboring APCs⁵⁴. In addition, they secrete chemokine ligands, such as C-C chemokine ligands CCL3, CCL4, CCL5 and CCL20, all of which promote immature DC maturation locally at the site of inflammation. The net effect is an up-regulation of CD40, CD46 and CD86 on DCs^{54, 55}. The contact-dependent interaction between neutrophils and DCs results in an increased production of IL-12 by DCs, ultimately helping T-cell maturation⁵⁴⁻⁵⁶. Therefore, neutrophils are multipotent players able to activate both innate and adaptive immune cells.

Classically, transplant pathologists associate the presence of neutrophils within the graft with bacterial infection, rather than considering them as potential markers of rejection. However, it has been suggested that their co-localization with T cells may not be limited to the effector phase of the inflammatory process, but that they could initiate non-alloimmune and alloimmune responses, notably following infection⁵⁷. Evidence supporting this concept includes the observation that neutrophils can act like APCs for MHC class I and II molecules in autoimmune diseases⁵⁸.

Animal models suggest that prevention of neutrophil migration attenuates allograft rejection. Antileukin is a CXC chemokine receptor inhibitor that inhibits CXCL8 (IL-8) and its receptor known to induce neutrophil chemotaxis and cytokine release⁵⁹. Hirayama *et al.* observed that this peptide was efficient to prevent neutrophil migration and acute rejection in a rat lung transplant

model, when administrated continuously 7 days post-transplant ⁵⁹. However, the use of antileukinate only before and immediately after transplantation had no effect. The authors concluded that antileukinate had no effect in the prevention of the initiation of rejection by neutrophils, however given the short half-life of these cells this conclusion may be overstated. This observation that the effect of antileukinate is limited to the effector phase of neutrophil activation, has been reported in other experimental models however ^{60, 61}. In a mouse heart transplant model, blockade of neutrophil migration in CXCR2^{-/-} animals or by CXCR2 antagonism in wild-type mice attenuated intragraft pro-inflammatory cytokines expression, and T-cell infiltration in CXCR2^{-/-} recipients was significantly decreased ⁶². Neutrophil depletion coupled with T-cell co-stimulation blockade was able to induce long term graft survival.

Similar to NK cells, neutrophiles seem to play a dispensable role in allograft rejection. Unless used in a combined therapy targeting T cells, there is little evidence that therapy based on the modulation of neutrophil activation could be an effective strategy to prevent alloreactivity or to promote tolerance.

Toll-like receptors

The discovery of TLRs, identified in 1996 in the drosophila fly, is probably the most important advancement in immunology over the last twenty years. So far, 10 human functional TLRs have been identified. These receptors are expressed in a large number of leucocyte subsets including monocytes, macrophages, DCs, neutrophils, as well as T and B cells ⁶³. In addition to leucocytes, TLRs are found on the surface of endothelial and epithelial cells of solid organs, such as kidney and heart ⁶⁴. Most TLRs are found on cellular surface, except TLR3, 7, 8 and 9 which meets intracellular PAMPs in endosomes or lysosomes. Their main function is to allow recognition of microbial agents and subsequent immune response ⁶³. The most common intracellular signaling pathways involving TLR activation is the following: a microbial agent binds the TLR; there is activation of the universal adaptor protein MyD88, which in turn triggers a phosphorylation cascade, leading to the release of NF-κβ. Then, the sequence of activation involves the AP-1 protein, interferon regulator factor 3 (IRF3) and other transcription factors, which up-regulates expression of genes of inflammation, such as the cytokines IL-6, IL-12 and TNF-α ⁶³. In APCs, MyD88 regulates cell maturation and surface expression of CD80, CD86 and MHC class II molecules ⁶⁵. In the context of transplantation, activation of TLRs on APCs triggers the presentation of antigen and the activation, differentiation and proliferation of naive T cells⁶⁴.

Accumulating data from animal models and human *in vitro* studies indicate that IRI is modulated by DAMPs interacting with TLRs⁶⁴⁻⁶⁶. Among endogenous ligands associated with IRI, high-mobility group box 1 nuclear protein (HMGB1), heat shock proteins (HSPs), altered lipoprotein, fibronectin, heparan sulfate and debris from necrotic cells are the most important⁶⁷⁻⁷⁰. These ligands mostly bind TLR2 and TLR4 in the peripheral circulation. Recent observations suggest that these endogenous ligands are released by injured cells during organ harvesting and implantation. Their binding to TLR2 and TLR4 would then be key events to the initiation of innate immunity activation and adaptive immune responses^{2, 71}.

Does allograft rejection require TLR signalling? In a fully MHC-mismatched murine model of kidney rejection, mice deficient in MyD88 developed donor antigen-specific tolerance, preventing acute and chronic rejection⁷¹. MyD88 deficiency increased the balance of Treg to Th17 cells, promoting tolerance. Interestingly, administration of an anti-CD25 antibody to these mice depleted Tregs and broke tolerance. There is accumulating evidence that TLR2 and TLR4 activation inhibits Treg activation^{64, 72-74}. It is known that neither Tregs nor Th17 represent a terminally differentiated phenotype, given the plasticity of T cell differentiation⁷⁵. Therefore, the decreased production of the pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α in MyD88 deficient mice may tip the balance in favor of Tregs⁷¹.

In contrast, Oberbarnscheidt *et al.* reported that MyD88 deletion in mice does not necessarily lead to tolerance². They found that allogeneic grafts elicited persistent differentiation of monocytes into mature DCs secreting cytokines, whereas syngeneic grafts did not. Similar results were obtained in wild-type and MyD88 knock-out mice, suggesting that the allorecognition by monocytes was independent of the danger signal MyD88-pathway. Others observed that the simultaneous deletion of MyD88 and TRIF, a TLR adaptor for TLRs on intracellular membranes, delays graft rejection^{76, 77}.

Observational studies in humans revealed that TLR4 plays a role in the susceptibility to develop acute rejection. An association between recipient TLR4 heterozygosity for one of the 2 functional alleles (Asp299Gly and Thr399Ile) and lower acute rejection rates have been reported in lung and kidney transplants^{78, 79}. Interestingly, donor TLR4 genotype was not associated with rejection. The clinical study NCT01794663 currently tests the hypothesis that a humanized antibody blocking

TLR2 prevents renal delayed graft function (DGF). Given the ubiquity of TLRs within the body, this therapeutic strategy is with no doubt challenging. Another therapeutic target is the ligand HMGB1^{80,81}. In a murine heart model, blocking HMGB1 delays innate immunity activation within the graft and prolong allograft survival⁸¹.

TLRs are increasingly studied in transplantation immunology. Because they are ubiquitously found in immune, endothelial and epithelial cells, their use as a potential therapeutic target will remain a challenge.

Myeloid derived suppressor cells (MDSCs)

We conclude this section with MDSCs, a cellular type that is slowly emerging in transplantation. Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population composed of immature precursors of granulocytes, macrophages, dendritic cells and myeloid progenitors⁸². They can suppress innate immune responses, as well as adaptative responses in cancer and non-cancer settings. These cells are the focus of intense investigation in oncology, since there seems to be an association between their concentration in blood and overall tumor prognosis. Indeed, they appear to be a major player in tumor initiation and escape. In a mouse transplant model of combined bone marrow and heart transplant, MDSCs depletion abrogated chimerism and tolerance⁸³. In rat kidney allografts, they inhibit T cell proliferation, but have no effect on Tregs⁸⁴. In this model, adoptive transfer of MDSCs did not induce tolerance. In allogeneic bone marrow human recipients, a group from China reported an association between counts of MDSCs in allografts and occurrence of graft-versus-host disease⁸⁵. So far, data in human transplantation is limited.

Humoral components

Complement

The complement system is phylogenetically linked to the coagulation system and constitutes one of the first components of immunity. It was originally believed that complement proteins were solely active against microbial agents. It was somewhat surprising to realize later that it contributes to many inflammatory diseases^{86,87}. Complement mostly discriminate healthy host tissues from foreign agents, damaged cells, cellular debris and apoptotic cells.

The complement system is divided in 3 pathways of activation: classical, lectin and alternate pathways. The alternate pathway, the most ancient, is based on pattern recognition molecule (PRM) including properdin and is triggered following recognition of PAMPs and DAMPs on foreign and damaged cells. Despite its name, the alternate pathway is responsible for 80 to 90% of all complement activation⁸⁷. Classical pathway was discovered first and is antibody-dependent. In the lectin pathway, mannose-binding lectin (MBL) and ficolins serve as PRMs which predominantly binds carbohydrate motifs⁸⁶.

It is now well established that the complement plays a major role in tissular injury, including IRI following solid organ transplantation⁸⁸. It is involved in neo-epitope recognition, opsonisation, amplification and modulation of the cellular response mediated through C5a, anaphylatoxin release and leucocyte recruitment. The lectin pathway seems to be the most important⁸⁹. C5a is a key player leading to chemotaxis of innate and T cells, CAM up-regulation and secretion of P-selectin and von Willebrand factor by endothelial cells⁹⁰. In mice, high levels of C5a and C3a seem to bypass the need for CD40/CD154 interactions between CD4⁺ and CD8⁺ T cells to induce CD8⁺ T-cell alloimmune responses⁹¹. C5a and C3a directly transmit signals to T cells via C5a and C3a receptors responses, which in turn modulate natural Treg function⁹². Besides their indirect effects, complement proteins seem to directly damage allogeneic tissues by oxidative stress, accumulation of debris and chronic complement activation, all of which perpetuates a vicious circle of injury⁸⁸⁻⁹⁰.

With the development of new solid-phase assays for the detection of anti-HLA antibodies, a large amount of data has been published about the use of complement binding as a tool to predict which antibodies are harmful to the graft. In a large clinical study of 1016 patients, Loupy *et al.* observed that kidney recipients developing donor-specific antibodies (DSA) with complement-binding capacity (measured by C1q-binding) had a substantially worse graft survival at 5 years: 54% for DSA+C1q+ patients vs. 93% for DSA+C1q- patients vs. 94% for DSA- patients⁹³. This study has been criticized, notably because DSA of highest intensity are most often those binding C1q, raising doubt about the causative link of the association with C1q binding and graft outcomes^{94, 95}. Nonetheless, DSA+C1q+ patients experienced more AMR and showed more extensive microvascular inflammation and C4d deposition, suggesting a potential mechanistic role. Others reported that, in comparison with DSA testing alone, adding C1q testing was more specific for transplant glomerulopathy and graft loss, but less specific for C4d deposition⁹⁶⁻⁹⁸.

In addition to the interest of complement as a biomarker, there is obviously a therapeutic interest in deciphering the role of complement in allograft rejection, especially since the commercialization of the anti-C5a agent Eculizumab. Developed originally for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, it is a humanized monoclonal antibody that blocks terminal complement activation and prevents the formation of the membrane attack complex ⁹⁹. Its use in transplantation has been reported in 2011 by the Mayo group ³, for the prevention of AMR in sensitized renal transplant recipients with a positive cross-match against their living donor, then followed by more reports in salvage therapy or in hemolytic uremic syndrome-transplanted patients ^{100, 101}. Stegall *et al.* observed a substantial reduction in the incidence of AMR (8 vs 41%) compared to a historical control group. They also found significantly less transplant glomerulopathy on 1-year protocol biopsies (7 vs 36%), with the important caveat that 11 of the 26 patients in the Eculizumab group did not undergo protocol biopsy, including subjects with AMR in the first year. Very recently, Bentall *et al.* reported that among this group of patients, 3 of the 4 who developed IgM DSA were those who developed AMR, raising even more question about the pathophysiology behind AMR ¹⁰².

The complement is clearly an exciting new area of development in transplantation immunology, from which we may expect new effective therapeutic strategies to prevent short-term AMR in the next few years. One key element with regard to this issue will be to identify the target population of patients who may benefit from an increased immunosuppression load. A second key question will be the impact on long-term outcomes. This may require a critical reappraisal of the current tools used for diagnosis and prognosis of acute and chronic AMR ^{103, 104}.

Cytokines

Cytokines are essential messengers of the innate immune system. They modulate and amplify the immune responses between cells of the innate and adaptive immunity ¹⁰⁵. Despite the exponential number of publication on cytokines in transplantation journals in the recent years, a clear picture of the cytokine interactions involved in allograft rejection is still to be defined. It is known that pro and anti-inflammatory cytokines can at times promote or prevent rejection, depending on the milieu in which they are secreted ^{75, 106}. Given the increasing number of anti-cytokine agents available, a better understanding of the specific and potentially non-redundant roles of specific cytokines is crucial. We review here the innate inflammatory cytokines that received the most attention in the

recent years: IL-1 β , TNF- α and IL-6. Of note, because IL-17 is mostly related to Th17 cells and adaptive immunity, it will not be discussed here.

IL-1 β and TNF- α are pro-inflammatory cytokines produced by mononuclear phagocytes. The main functions of TNF- α include stimulation of monocytes, neutrophils, and endothelial cells to produce CAMs and chemokines. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine secreted mostly by activated cells; in contrast to TNF- α , it is also produced by non-phagocytes, such as epithelial and endothelial cells. IL-1 β initiates and perpetuates inflammation, mainly by simulating the production of a local network of cytokines, such as IL-2, IL-6, TNF- α and TNF- β ¹⁰⁷. It plays a major role in promoting leucocyte migration into injured tissues. IL-1 β increases the surface expression of CAMs on both endothelial cells and leucocytes.

Anti-cytokine therapies for IL-1 β and TNF- α have been used in few situations so far in transplantation. Perhaps the most advanced field is islet transplantation, where anti-inflammatory agents such as anti-TNF- α are now used routinely by some centers^{108,109}. Anakinra, a recombinant version of the human IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra, endogenous regulator of IL-1 β) is highly efficient to control inflammation in rheumatoid arthritis patients¹¹⁰. When tried in combination with the anti-TNF- α agent etanercept in immunodeficient mice, anakinra led to a substantially higher level of islet engraftment (88% for both vs. 54% for anakinra alone vs. 45% for etanercept alone)¹¹¹. A pilot trial of 6 type 1 diabetic patients showed encouraging results with this combination of anti-inflammatory agents¹¹². The anti-TNF- α infliximab has been tested for steroid-refractory acute GVHD. It reversed GVHD in 59%. All unresponsive patients died of GVHD and 72% responders developed infections, including 6% fatal fungal disease¹¹³.

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine which seems to play a particularly important role in the differentiation of T cells. It is produced mostly by APCs, fibroblasts and endothelial cells. IL-6 deficient mice produce less IFN- γ than wild type mice during allograft rejection, and CD28-B7 blockade in these mice has a synergistic effect on allograft acceptance in a fully MHC-mismatched model¹¹⁴. Other investigators reported that, in a highly immunogenic murine skin allograft model, the combination of costimulatory blockade and absence of IL-6 and TNF- α induces tolerance¹¹⁵. We recently demonstrated that IL-6 measured in *ex vivo* culture supernatants from PBMCs sampled in kidney recipients with acute rejection was diagnostic for rejection¹¹. We previously observed that IL-6, along with IL-1 β and TNF- α , were highly secreted by PBMCs of patients with transplant glomerulopathy¹⁰. There is thus good evidence from both animal models and patient mechanistic

studies to suggest a pivotal role for inflammatory cytokines in allograft rejection¹¹³. NCT02108600 is a phase II trial that will evaluate the use of tocilizumab, a drug targeting IL-6 receptor, in renal transplant recipients showing inflammation in the 6 month allograft biopsy.

Anti-cytokine strategies slowly make their way into clinical practice. Obviously, there is a justified fear of increased adverse effects due to the broad anti-lymphocyte immunosuppression already used in maintenance therapy. Nonetheless, there are great opportunities to test innovative protocols, which may for example replace an anti-lymphocyte agent for an anti-inflammatory agent in patients at high risk of rejection, or in patients with chronic rejection. A better assessment of the precise mechanisms (innate versus adaptive immune system) at play during rejection within a given patient might be the key to achieve such personalized immunosuppression.

Cell adhesion molecules

CAM is a generic term for molecules that are involved in the binding of cells to other cells or to the extracellular matrix. They are usually classified as calcium-dependent or independent. The most important families for the purpose of this review are the selectins and integrins, for which intense research efforts were invested in the last two decades. Because of their pivotal role in leucocyte recruitment and migration into inflamed tissues, they are key players of the allograft rejection process.

To better understand the potential therapeutics application of manipulating CAMs, we start with a brief review and the physiology of leucocyte-endothelial cell adhesion. During recruitment of leucocytes, the sequence of events is as follows: endothelial cells from damaged tissues express selectins (such as E-selectin and P-selectin) which binds selectin ligands on circulating leucocytes; leucocytes also express their selectin (L-selectin) which binds ligands on the endothelial cells (CD34 for example); damaged endothelial cells then produce chemokines (such as MCP-1 or IP-10) which build up locally on the endothelial surface, bound to proteoglycans; under the influence of increasing chemokine levels, the leucocyte adhering to the endothelium increase the affinity of their integrins; these integrins bind their ligands (such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1 or intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on endothelial cells, and tissue migration of leucocytes ensues. Each leucocyte subset interacts with endothelial cells through specific integrin-integrin ligand combinations. For instance, the integrin very late-antigen 4 (VLA-4) on

monocytes binds the ligand VCAM-1 on endothelial cells. In the early moments following transplantation, IRI up-regulates tissue expression and release in the plasma of several selectins and integrin ligands, including E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1. C5a is involved in the up-regulation of these molecules⁸⁷. We report below the molecules for which there have been the most therapeutic interest recently.

The induction of the integrin ligand ICAM-1 in allografts has been proposed as an important step in the development of the immune response leading to rejection. Neutrophils and lymphocytes bind to endothelial cells and APCs by the interaction between the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and ICAM-1⁶³. Further damage to endothelial cells resulting from the neutrophils and T cell infiltration up-regulates the expression of ICAM-1, perpetuating the inflammation locally¹¹⁶. In addition to its role as a CAM, ICAM-1 supports T-cell activation by acting as costimulatory signals. The agent efalizumab (Raptiva) is a humanized monoclonal antibody against CD11a, the α -subunit of LFA-1. Efalizumab inhibits the interaction between LFA-1 and ICAM-1. In line with its mechanism of action, efalizumab increases lymphocyte counts in circulation by 40%¹¹⁶. The initial market for this compound was psoriasis, but it has been tried in combination with sirolimus in islet transplantation¹¹⁷. The drug was voluntarily withdrawn from the market in 2009, following FDA and European Medicines Agency recommendations, because of risks of progressive multifocal leucoencephalopathy (PML).

P-selectin is expressed early in the leucocyte recruitment process, mainly because it is pre-formed and stored by endothelial cells, along with von Willebrand factor (vWF) in cytoplasmic granules called Weibel-Palade bodies. Reports indicate that ligation of anti-HLA I antibody to aortic endothelial cells leads to rapid exocytosis of P-selectin and vWF^{118, 119}. *In vitro* and *in vivo*, anti-HLA I antibodies increase P-selectin externalization and monocyte binding. Blockade of P-selectin abolished monocyte transmigration to the allograft, but not antibody-mediated endothelial injury¹¹⁹. Phase II studies testing a fusion protein of P-selectin ligand to prevent kidney delayed graft function reported no increased adverse event rates in small multicenter cohort¹²⁰. However there was no impact on DGF.

Similar to cytokines, CAMs offer a great opportunity for therapeutic interventions. The major limitation remains the ubiquitous nature of these molecules within the tissues, which increases the risk of serious adverse events, such as progressive multifocal leucoencephalopathy (PML). Although safe in autoimmune disease, targeting CAM found on all circulating leucocytes may

prove to be an impossible task in transplant recipients, already under heavy maintenance immunosuppression. One option may be to target the molecules expressed in the tissue, for instance integrin ligands. Such a strategy, coupled with a close monitoring of polyomavirus serum load (as now routinely done for BK and JC virus in many transplant centers) may be safe in the future.

Expert commentary

The current immunosuppression achieved great success in reducing short-term allograft rejection, but seems powerless once chronic rejection develops. Moreover, the high burden of anti-lymphocyte immunosuppression resulted in emergence of new viral infections and increases the risk of cancer several fold. The use of corticosteroids in many centers contributes to an excess of cardiovascular morbidity in transplant recipients.

The accumulating evidence that inflammation and innate immunity are essential in graft rejection leads us to rethink our immunosuppression strategies. Although most of the data comes from animal models, they are robust and suggest that we could maybe trade some of our antilymphocyte immunosuppressive load for some anti-inflammatory immunosuppression. The use of anti-cytokine agents, more specific than corticosteroids, may achieve this goal while minimizing the metabolic side effects.

There is no doubt that the relative success of the current protocols makes both patients and physicians reluctant to try drastic immunosuppressive changes. Therefore, innovative protocols are hard to test and would be even harder to translate into routine practice. However, we must bear in mind that the current protocols are plagued with premature graft loss and severe adverse effects. We and others have demonstrated how dismal is the prognosis of patients with chronic rejection, even those with incomplete criteria for diagnosis^{103, 121}. As a community, we need to better assess which clinical, biological and histological parameters best predict premature graft failure in patients with apparent stable graft function. Simultaneously, we need to develop reliable tools to monitor the immune status and determine what component of the immune system is actively damaging the kidney in a given patient, be it a highly reactive donor-specific antibody, chronic T cell activation or continuous subclinical inflammation due to innate immunity activation.

5-year view

Within 5 years, the transplant community should have made significant progress in establishing which of our biological, histological and molecular markers best identify patients in the rejection versus non-rejection, and even tolerance state. This is the key to then target the right study population for new immunosuppressive trials.

Several components of the innate immunity are promising targets for therapeutic interventions. Among cellular therapies, the passive transfer of Mregs showed good feasibility and safety results. However, the sustainability of a cellular therapy in the long run, particularly the regular need for cells, will remain a challenge. Intense efforts will be put to define the exact role of anti-complement therapies in rejection. Their good tolerability in the non-transplant setting makes them strong candidates in the transplant physician armamentarium. However, their long-term safety in combination with maintenance immunosuppression and their high cost will have to be addressed. Finally, anti-cytokine agents have only modestly penetrated the transplant market, despite initial enthusiasm. An improvement in our knowledge of the precise role of inflammation and monocytes in rejection may make them an interesting option to personalize immunosuppression and reduce anti-lymphocyte therapies in selected patients.

Key issues

- Innate immunity shapes the activation of adaptive immunity.
- Experimental studies reveal that every component of the innate immunity is involved in transplant rejection; however some of them seem to have a dispensable role, notably NK cells and neutrophils.
- Pilot clinical trials show that manipulating macrophages *ex vivo* to produce regulatory macrophages (Mregs) and re-injecting the cells to patients is feasible and potentially prevents rejection.
- Recognition of allogeneic non-self by monocytes have been demonstrated in mice, challenging the concept that innate immunity only activates upon the release of non-specific danger molecules.
- Proteins of the complement are the target of intense investigation to determine their role in rejection. Preliminary data using anti-C5 monoclonal antibodies suggest that they may prevent humoral rejection, but more robust data are needed.
- Anti-cytokine therapeutics are used in islet transplant with success, however such therapies have found little use in other organs so far. Experimental and observational

mechanistic data in patients suggest that they may be a potential target for new immunosuppressive strategies.

- Agents targeting cell adhesion molecules or their ligands have been tested in the transplant and in the autoimmune setting, with some success. However, their ubiquitous nature in the cells increases the risk of serious adverse effects, such as progressive multifocal leucoencephalopathy, that occurred with anti-LFA-1 agent.
- Similarly, TLRs are an interesting therapeutic target. Genotyping studies revealed associations between specific polymorphisms of TLR4 in patients and decreased rate of acute rejection. However, TLR therapeutics raise big challenges in terms of specificity of action, and potential side effects as well.

REFERENCES.

- [1] Sayegh MH: Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int* 1999, 56:1967-79.
- [2] ** Oberbarnscheidt MH, Zeng Q, Li Q, Dai H, Williams AL, Shlomchik WD, Rothstein DM, Lakkis FG: Non-self recognition by monocytes initiates allograft rejection. *J Clin Invest* 2014.
- [3] Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, Cosio FG, Gandhi MJ, Kremers W, Gloor JM: Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2011, 11:2405-13.
- [4] Gordon S, Taylor PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005, 5:953-64.
- [5] Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB: Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int* 2005, 68:1866-74.
- [6] Hoffmann SC, Hale DA, Kleiner DE, Mannon RB, Kampen RL, Jacobson LM, Cendales LC, Swanson SJ, Becker BN, Kirk AD: Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant* 2005, 5:573-81.
- [7] Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Stallone G, Schena FP: Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 1997, 63:414-20.
- [8] Ozdemir BH, Ozdemir FN, Gungen Y, Haberal M: Role of macrophages and lymphocytes in the induction of neovascularization in renal allograft rejection. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2002, 39:347-53.
- [9] Kirk AD, Hale DA, Mannon RB, Kleiner DE, Hoffmann SC, Kampen RL, Cendales LK, Tadaki DK, Harlan DM, Swanson SJ: Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Transplantation* 2003, 76:120-9.
- [10] De Serres SA, Vadivel N, Mfarrej BG, Grafals M, DeJoseph M, Dyer C, Magee CN, Chandraker A, Gallon LG, Najafian N: Monocyte-secreted inflammatory cytokines are associated with transplant glomerulopathy in renal allograft recipients. *Transplantation* 2011, 91:552-9.
- [11] De Serres SA, Mfarrej BG, Grafals M, Riella LV, Magee CN, Yeung MY, Dyer C, Ahmad U, Chandraker A, Najafian N: Derivation and validation of a cytokine-based assay to screen for acute rejection in renal transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012, 7:1018-25.
- [12] Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Munivenkatappa R, Ramos E, Nogueira J, Sailey C, Klassen DK, Haririan A: Glomerular inflammation in renal allografts biopsies after the first year:

cell types and relationship with antibody-mediated rejection and graft outcome. *Transplantation* 2010, 90:1478-85.

[13] Magil AB, Tinckam K: Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 2003, 63:1888-93.

[14] Batal I, De Serres SA, Mfarrej BG, Grafals M, Pinkus GS, Kalra A, Weins A, Bijol V, Rennke HG, Guleria I, Abdi R, Chandraker A, Najafian N: Glomerular Inflammation Correlates With Endothelial Injury and With IL-6 and IL-1beta Secretion in the Peripheral Blood. *Transplantation* 2014, 27:1034-42.

[15] Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA: Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008, 118:3522-30.

[16] Nathan CF: Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987, 79:319-26.

[17] Haniffa M, Ginhoux F, Wang XN, Bigley V, Abel M, Dimmick I, Bullock S, Grisotto M, Booth T, Taub P, Hilkens C, Merad M, Collin M: Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med* 2009, 206:371-85.

[18] Kwan T, Wu H, Chadban SJ: Macrophages in renal transplantation: Roles and therapeutic implications. *Cell Immunol* 2014.

[19] Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM: Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev* 2003, 196:51-64.

[20] Ma FY, Woodman N, Mulley WR, Kanellis J, Nikolic-Paterson DJ: Macrophages contribute to cellular but not humoral mechanisms of acute rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 2013, 96:949-57.

[21] ** Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, Tomiuk S, Miqueu P, Zuhayra M, Oberg HH, Pascher A, Lutzen U, Janssen U, Broichhausen C, Renders L, Thaiss F, Scheuermann E, Henze E, Volk HD, Chatenoud L, Lechler RI, Wood KJ, Kabelitz D, Schlitt HJ, Geissler EK, Fandrich F: Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol* 2011, 187:2072-8.

[22] Lechler R, Ng WF, Steinman RM: Dendritic cells in transplantation--friend or foe? *Immunity* 2001, 14:357-68.

[23] Liu W, Li XC: An overview on non-T cell pathways in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2010, 15:422-6.

[24] Jurewicz M, Takakura A, Augello A, Naini SM, Ichimura T, Zandi-Nejad K, Abdi R: Ischemic injury enhances dendritic cell immunogenicity via TLR4 and NF-kappa B activation. *J Immunol* 2010, 184:2939-48.

- [25] Loverre A, Capobianco C, Stallone G, Infante B, Schena A, Ditonno P, Palazzo S, Battaglia M, Crovace A, Castellano G, Ranieri E, Schena FP, Gesualdo L, Grandaliano G: Ischemia-reperfusion injury-induced abnormal dendritic cell traffic in the transplanted kidney with delayed graft function. *Kidney Int* 2007, 72:994-1003.
- [26] Chamorro S, Garcia-Vallejo JJ, Unger WW, Fernandes RJ, Bruijns SC, Laban S, Roep BO, t Hart BA, van Kooyk Y: TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J Immunol* 2009, 183:2984-94.
- [27] Thomson AW: Tolerogenic dendritic cells: all present and correct? *Am J Transplant* 2010, 10:214-9.
- [28] Darrasse-Jeze G, Deroubaix S, Mouquet H, Victora GD, Eisenreich T, Yao KH, Masilamani RF, Dustin ML, Rudensky A, Liu K, Nussenzweig MC: Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2009, 206:1853-62.
- [29] Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR: The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 2008, 181:5396-404.
- [30] Ezzelarab MB, Zahorchak AF, Lu L, Morelli AE, Chalasani G, Demetris AJ, Lakkis FG, Wijkstrom M, Murase N, Humar A, Shapiro R, Cooper DK, Thomson AW: Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant* 2013, 13:1989-2005.
- [31] Khan A, Fu H, Tan LA, Harper JE, Beutelspacher SC, Larkin DF, Lombardi G, McClure MO, George AJ: Dendritic cell modification as a route to inhibiting corneal graft rejection by the indirect pathway of allorecognition. *Eur J Immunol* 2013, 43:734-46.
- [32] Turnquist HR, Raimondi G, Zahorchak AF, Fischer RT, Wang Z, Thomson AW: Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 2007, 178:7018-31.
- [33] Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M: Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2011, 34:2026-32.
- [34] Villard J: The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation. *J Innate Immun* 2011, 3:395-402.
- [35] Kroemer A, Edtinger K, Li XC: The innate natural killer cells in transplant rejection and tolerance induction. *Curr Opin Organ Transplant* 2008, 13:339-43.

- [36] Campbell KS, Purdy AK: Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology* 2011, 132:315-25.
- [37] Liu W, Xiao X, Demirci G, Madsen J, Li XC: Innate NK cells and macrophages recognize and reject allogeneic nonself in vivo via different mechanisms. *J Immunol* 2012, 188:2703-11.
- [38] Kitchens WH, Uehara S, Chase CM, Colvin RB, Russell PS, Madsen JC: The changing role of natural killer cells in solid organ rejection and tolerance. *Transplantation* 2006, 81:811-7.
- [39] Heidecke CD, Araujo JL, Kupiec-Weglinski JW, Abbud-Filho M, Araneda D, Stadler J, Siewert J, Strom TB, Tilney NL: Lack of evidence for an active role for natural killer cells in acute rejection of organ allografts. *Transplantation* 1985, 40:441-4.
- [40] Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC: NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J Exp Med* 2006, 203:1851-8.
- [41] Kroemer A, Xiao X, Degauque N, Edtinger K, Wei H, Demirci G, Li XC: The innate NK cells, allograft rejection, and a key role for IL-15. *J Immunol* 2008, 180:7818-26.
- [42] Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P: Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999, 5:1249-55.
- [43] Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG: TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 2003, 19:59-70.
- [44] Martin-Fontech A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F: Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004, 5:1260-5.
- [45] Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, Strom TB: Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998, 66:562-6.
- [46] Beilke JN, Kuhl NR, Van Kaer L, Gill RG: NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med* 2005, 11:1059-65.
- [47] Lovik G, Vaage JT, Dissen E, Szpirer C, Ryan JC, Rolstad B: Characterization and molecular cloning of rat C1qRp, a receptor on NK cells. *Eur J Immunol* 2000, 30:3355-62.
- [48] Baldwin WM, 3rd, Larsen CP, Fairchild RL: Innate immune responses to transplants: a significant variable with cadaver donors. *Immunity* 2001, 14:369-76.
- [49] Shao-Hsien C, Lang I, Gunn H, Lydyard P: Effect of in vitro cyclosporin. A treatment on human natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transplantation* 1983, 35:127-9.

- [50] Wasik M, Gorski A, Stepien-Sopniewska B, Lagodzinski Z: Effect of FK506 versus cyclosporine on human natural and antibody-dependent cytotoxicity reactions in vitro. *Transplantation* 1991, 51:268-70.
- [51] Kageyama S, Matsui S, Hasegawa T, Yoshida Y, Sato H, Yamamura J, Kurokawa M, Yamamoto H, Shiraki K: Augmentation of natural killer cell activity induced by cytomegalovirus infection in mice treated with FK506. *Acta Virol* 1997, 41:215-20.
- [52] Mocsai A: Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 2013, 210:1283-99.
- [53] Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, Pless R, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ: In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107:18073-8.
- [54] Potter NS, Harding CV: Neutrophils process exogenous bacteria via an alternate class I MHC processing pathway for presentation of peptides to T lymphocytes. *J Immunol* 2001, 167:2538-46.
- [55] Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S: Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2006, 79:977-88.
- [56] Kreisel D, Sugimoto S, Zhu J, Nava R, Li W, Okazaki M, Yamamoto S, Ibrahim M, Huang HJ, Toth KA, Ritter JH, Krupnick AS, Miller MJ, Gelman AE: Emergency granulopoiesis promotes neutrophil-dendritic cell encounters that prevent mouse lung allograft acceptance. *Blood* 2011, 118:6172-82.
- [57] Yamamoto S, Nava RG, Zhu J, Huang HJ, Ibrahim M, Mohanakumar T, Miller MJ, Krupnick AS, Kreisel D, Gelman AE: Cutting edge: *Pseudomonas aeruginosa* abolishes established lung transplant tolerance by stimulating B7 expression on neutrophils. *J Immunol* 2012, 189:4221-5.
- [58] Ostanin DV, Kurmaeva E, Furr K, Bao R, Hoffman J, Berney S, Grisham MB: Acquisition of antigen-presenting functions by neutrophils isolated from mice with chronic colitis. *J Immunol* 2012, 188:1491-502.
- [59] Hirayama S, Shiraishi T, Shirakusa T, Higuchi T, Miller EJ: Prevention of neutrophil migration ameliorates rat lung allograft rejection. *Mol Med* 2006, 12:208-13.
- [60] Fukono Y, Hayashi S, Kosha K, Fujisawa N, Tominaga M, Miller E, Nagasawa K: Chemokine receptor inhibitor, Antileukinate, suppressed ovalbumin-induced eosinophilic inflammation in the airway. *Cytokine* 2003, 22:116-25.
- [61] Hayashi S, Yatsunami J, Fukono Y, Kawashima M, Miller EJ: Antileukinate, a hexapeptide inhibitor of CXC-chemokine receptor, suppresses bleomycin-induced acute lung injury in mice. *Lung* 2002, 180:339-48.

- [62] El-Sawy T, Belperio JA, Strieter RM, Remick DG, Fairchild RL: Inhibition of polymorphonuclear leukocyte-mediated graft damage synergizes with short-term costimulatory blockade to prevent cardiac allograft rejection. *Circulation* 2005, 112:320-31.
- [63] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S: Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.
- [64] * Leventhal JS, Schroppel B: Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. *Kidney Int* 2012, 81:826-32.
- [65] Chen L, Wang T, Zhou P, Ma L, Yin D, Shen J, Molinero L, Nozaki T, Phillips T, Uematsu S, Akira S, Wang CR, Fairchild RL, Alegre ML, Chong A: TLR engagement prevents transplantation tolerance. *Am J Transplant* 2006, 6:2282-91.
- [66] Testro AG, Visvanathan K, Skinner N, Markovska V, Crowley P, Angus PW, Gow PJ: Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-like receptor 4. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2011, 26:155-63.
- [67] Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H: Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000, 164:558-61.
- [68] He H, Stone JR, Perkins DL: Analysis of differential immune responses induced by innate and adaptive immunity following transplantation. *Immunology* 2003, 109:185-96.
- [69] Tsan MF, Gao B: Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* 2009, 85:905-10.
- [70] Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG: Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* 2003, 111:1571-8.
- [71] Wu H, Noordmans GA, O'Brien MR, Ma J, Zhao CY, Zhang GY, Kwan TK, Alexander SI, Chadban SJ: Absence of MyD88 signaling induces donor-specific kidney allograft tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2012, 23:1701-16.
- [72] Zhang N, Kruger B, Lal G, Luan Y, Yadav A, Zang W, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Murphy B, Bromberg JS, Schroppel B: Inhibition of TLR4 signaling prolongs Treg-dependent murine islet allograft survival. *Immunol Lett*, 127:119-25.
- [73] Lal G, Yin N, Xu J, Lin M, Schroppel S, Ding Y, Marie I, Levy DE, Bromberg JS: Distinct inflammatory signals have physiologically divergent effects on epigenetic regulation of Foxp3 expression and Treg function. *Am J Transplant*, 11:203-14.
- [74] Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010, 11:373-84.
- [75] Strom TB, Koulmanda M: Recently discovered T cell subsets cannot keep their commitments. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20:1677-80.

- [76] McKay D, Shigeoka A, Rubinstein M, Surh C, Sprent J: Simultaneous deletion of MyD88 and Trif delays major histocompatibility and minor antigen mismatch allograft rejection. *Eur J Immunol* 2006, 36:1994-2002.
- [77] Zhang X, Beduhn M, Zheng X, Lian D, Chen D, Li R, Siu LK, Marleau A, French PW, Ichim TE, Min WP: Induction of alloimmune tolerance in heart transplantation through gene silencing of TLR adaptors. *Am J Transplant* 2012, 12:2675-88.
- [78] Palmer SM, Burch LH, Davis RD, Walter F, Herczyk D, Howell DN, Reinsmoen NL, Schwartz D: The Role of Innate Immunity in Acute Allograft Rejection after Lung Transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003, 168:632.
- [79] Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, Kazory A, Chalopin JM, Tiberghien P: Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005, 67:2454-61.
- [80] Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U, Wyburn KR, Chadban SJ: HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21:1878-90.
- [81] Huang Y, Yin H, Han J, Huang B, Xu J, Zheng F, Tan Z, Fang M, Rui L, Chen D, Wang S, Zheng X, Wang CY, Gong F: Extracellular hmgb1 functions as an innate immune-mediator implicated in murine cardiac allograft acute rejection. *Am J Transplant* 2007, 7:799-808.
- [82] Ochando JC, Chen SH: Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer. *Immunol Res* 2012, 54:275-85.
- [83] Hongo D, Tang X, Baker J, Engleman EG, Strober S: Requirement for interactions of natural killer T cells and myeloid-derived suppressor cells for transplantation tolerance. *Am J Transplant* 2014, 14:2467-77.
- [84] Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, Vuillefroy de Silly R, Usal C, Smit H, Martinet B, Thebault P, Renaudin K, Vanhove B: Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 2008, 180:7898-906.
- [85] Lv M, Zhao XS, Hu Y, Chang YJ, Zhao XY, Kong Y, Zhang XH, Xu LP, Liu KY, Huang XJ: Monocytic and Promyelocytic Myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2014.
- [86] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD: Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010, 11:785-97.
- [87] Ricklin D, Lambris JD: Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol* 2013, 190:3831-8.

- [88] Sacks SH, Zhou W: The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nat Rev Immunol* 2012, 12:431-42.
- [89] Moller-Kristensen M, Wang W, Ruseva M, Thiel S, Nielsen S, Takahashi K, Shi L, Ezekowitz A, Jensenius JC, Gadjeva M: Mannan-binding lectin recognizes structures on ischaemic reperfused mouse kidneys and is implicated in tissue injury. *Scand J Immunol* 2005, 61:426-34.
- [90] Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glovsky MM, Eddy SM, Ward PA: C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest* 1994, 94:1147-55.
- [91] Vieyra M, Leisman S, Raedler H, Kwan WH, Yang M, Strainic MG, Medof ME, Heeger PS: Complement regulates CD4 T-cell help to CD8 T cells required for murine allograft rejection. *Am J Pathol* 2011, 179:766-74.
- [92] Kwan WH, van der Touw W, Paz-Artal E, Li MO, Heeger PS: Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *J Exp Med* 2013, 210:257-68.
- [93] Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, Suberbielle C, Fremeaux-Bacchi V, Mejean A, Desgrandchamps F, Anglicheau D, Nochy D, Charron D, Empana JP, Delahousse M, Legendre C, Glotz D, Hill GS, Zeevi A, Jouven X: Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013, 369:1215-26.
- [94] Tinckam KJ, Heeger PS: Transplantation: Complementing donor-specific antibody testing. *Nat Rev Nephrol* 2013, 9:713-4.
- [95] Freitas MC, Rebellato LM, Ozawa M, Nguyen A, Sasaki N, Everly M, Briley KP, Haisch CE, Bolin P, Parker K, Kendrick WT, Kendrick SA, Harland RC, Terasaki PI: The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation* 2013, 95:1113-9.
- [96] Chen G, Sequeira F, Tyan DB: Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* 2011, 72:849-58.
- [97] Yabu JM, Higgins JP, Chen G, Sequeira F, Busque S, Tyan DB: C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation* 2010, 91:342-7.
- [98] Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB: Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* 2011, 16:12-7.

- [99] Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, Roth A, Szer J, Elebute MO, Nakamura R, Browne P, Risitano AM, Hill A, Schrezenmeier H, Fu CL, Maciejewski J, Rollins SA, Mojzik CF, Rother RP, Luzzatto L: The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006, 355:1233-43.
- [100] Locke JE, Magro CM, Singer AL, Segev DL, Haas M, Hillel AT, King KE, Kraus E, Lees LM, Melancon JK, Stewart ZA, Warren DS, Zachary AA, Montgomery RA: The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2009, 9:231-5.
- [101] Chatelet V, Lobbedez T, Fremeaux-Bacchi V, Ficheux M, Ryckelynck JP, Hurault de Ligny B: Eculizumab: safety and efficacy after 17 months of treatment in a renal transplant patient with recurrent atypical hemolytic-uremic syndrome: case report. *Transplant Proc* 2010, 42:4353-5.
- [102] Bentall A, Tyan DB, Sequeira F, Everly MJ, Gandhi MJ, Cornell LD, Li H, Henderson NA, Raghavaiah S, Winters JL, Dean PG, Stegall MD: Antibody-mediated rejection despite inhibition of terminal complement. *Transpl Int* 2014, 27:1235-43.
- [103] Lesage J, Noel R, Lapointe I, Cote I, Wagner E, Desy O, Caumartin Y, Agharazii M, Batal I, Houde I, De Serres SA: Donor-Specific Antibodies, C4d and Their Relationship With the Prognosis of Transplant Glomerulopathy. *Transplantation* 2014.
- [104] Sapir-Pichhadze R, Curran SP, John R, Tricco AC, Uleryk E, Laupacis A, Tinckam K, Sis B, Beyene J, Logan AG, Kim SJ: A systematic review of the role of C4d in the diagnosis of acute antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 2014.
- [105] Nelson PJ, Krensky AM: Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity* 2001, 14:377-86.
- [106] de Menezes Neves PD, Machado JR, dos Reis MA, Faleiros AC, de Lima Pereira SA, Rodrigues DB: Distinct expression of interleukin 17, tumor necrosis factor alpha, transforming growth factor beta, and forkhead box P3 in acute rejection after kidney transplantation. *Ann Diagn Pathol* 2013, 17:75-9.
- [107] Dinarello CA: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991, 77:1627-52.
- [108] Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, Matsumoto I, Ihm SH, Zhang HJ, Parkey J, Hunter DW, Sutherland DE: Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 2005, 293:830-5.
- [109] Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AJ: Current status of clinical islet transplantation. *World journal of transplantation* 2013, 3:48-53.
- [110] Mertens M, Singh JA: Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 2009, 36:1118-25.

- [111] McCall M, Pawlick R, Kin T, Shapiro AM: Anakinra potentiates the protective effects of etanercept in transplantation of marginal mass human islets in immunodeficient mice. Am J Transplant 2011, 12:322-9.
- [112] Matsumoto S, Takita M, Chaussabel D, Noguchi H, Shimoda M, Sugimoto K, Itoh T, Chujo D, SoRelle J, Onaca N, Naziruddin B, Levy MF: Improving efficacy of clinical islet transplantation with iodixanol-based islet purification, thymoglobulin induction, and blockage of IL-1beta and TNF-alpha. Cell Transplant 2011, 20:1641-7.
- [113] Patriarca F, Sperotto A, Damiani D, Morreale G, Bonifazi F, Olivieri A, Ciceri F, Milone G, Cesaro S, Bandini G, Dini G, Corradini P, Fanin R: Infliximab treatment for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. Haematologica 2004, 89:1352-9.
- [114] Zhao X, Boenisch O, Yeung M, Mfarrej B, Yang S, Turka LA, Sayegh MH, Iacomini J, Yuan X: Critical role of proinflammatory cytokine IL-6 in allograft rejection and tolerance. Am J Transplant, 12:90-101.
- [115] Shen H, Goldstein DR: IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance. J Am Soc Nephrol 2009, 20:1032-40.
- [116] Mortensen DL, Walicke PA, Wang X, Kwon P, Kuebler P, Gottlieb AB, Krueger JG, Leonardi C, Miller B, Joshi A: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple weekly subcutaneous efalizumab doses in patients with plaque psoriasis. J Clin Pharmacol 2005, 45:286-98.
- [117] Posselt AM, Bellin MD, Tavakol M, Szot GL, Frassetto LA, Masharani U, Kerlan RK, Fong L, Vincenti FG, Hering BJ, Bluestone JA, Stock PG: Islet transplantation in type 1 diabetics using an immunosuppressive protocol based on the anti-LFA-1 antibody efalizumab. Am J Transplant 2010, 10:1870-80.
- [118] * Yamakuchi M, Kirkiles-Smith NC, Ferlito M, Cameron SJ, Bao C, Fox-Talbot K, Wasowska BA, Baldwin WM, 3rd, Pober JS, Lowenstein CJ: Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104:1301-6.
- [119] * Valenzuela NM, Hong L, Shen X-D, Gao F, Young SH, Rozengurt E, Kupiec-Weglinski JW, Fishbein MC, Reed EF: Blockade of P-selectin Is Sufficient to Reduce MHC I Antibody-Elicited Monocyte Recruitment In Vitro and In Vivo. American Journal of Transplantation 2013, 13:299-311.
- [120] Gaber AO, Mulgaonkar S, Kahan BD, Woodle ES, Alloway R, Bajjoka I, Jensik S, Klintmalm GB, Patton PR, Wiseman A, Lipshutz G, Kupiec-Weglinski J, Gaber LW, Katz E, Irish W, Squiers EC, Hemmerich S: YSPSL (rPSGL-Ig) for improvement of early renal allograft

function: a double-blind, placebo-controlled, multi-center Phase IIa study. Clin Transplant 2011, 25:523-33.

[121] El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, Cosio FG: Identifying specific causes of kidney allograft loss. Am J Transplant 2009, 9:527-35.

REFERENCE ANNOTATIONS.

NB: annotations have been inserted in the references as well.

2. ** Oberbarnscheidt MH, Zeng Q, Li Q *et al*. Non-self recognition by monocytes initiates allograft rejection. *J Clin Invest*, (2014). *Basic science report nicely showing that monocytes can recognize allogeneic cells in absence of adaptive immunity*.
21. ** Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B *et al*. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol*, 187(5), 2072-2078 (2011). *Interesting small pilot trial showing the feasibility of innate immune cell therapy in renal transplant recipients*.
58. * Leventhal JS, Schroppel B. Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. *Kidney Int*, 81(9), 826-832 (2012). *Mini-review on the role of TLRs in first response to tissue injury. This article focuses on effects of TLRs after transplantation and the link between innate and adaptive immunity*.
101. * Yamakuchi M, Kirkiles-Smith NC, Ferlito M *et al*. Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(4), 1301-1306 (2007). *Basic science report showing that anti-HLA I antibodies trigger exocytosis of vWF P-selectin promoting local microangiopathy and leucocyte adhesion*.
102. * Valenzuela NM, Hong L, Shen X-D *et al*. Blockade of P-selectin Is Sufficient to Reduce MHC I Antibody-Elicited Monocyte Recruitment In Vitro and In Vivo. *American Journal of Transplantation*, 13(2), 299-311 (2013). *In vitro and in vivo study about monocyte recruitment and an antagonism of P-selectin. This article suggests that an antagonism of P-selectin could prevent accumulation of macrophages during antibody-mediated rejection*.

TABLE**Table 1. Current and potential therapeutic applications targeting components of the innate immune system**

Immunity components	Potential therapeutic application to date^a	Clinical Step ongoing or achieved	Reference
Macrophages/monocytes	<i>Ex vivo</i> engineering of regulator macrophages to minimize immunosuppression	Feasibility and safety shown in pilot clinical trial	²¹
Dendritic cells	<i>Ex vivo</i> engineering of Tolerogenic DCs to expand of Tregs	Possible Treg expansion in diabetic patients	³³
NK cells	None in solid organ transplantation	None	-
Neutrophils	Inhibition of neutrophil migration with antileukinate	None	⁵⁹
TLRs	TLR4 polymorphisms associated with decreased rejection rates.	Ongoing Phase II study testing TLR2 blockade for prevention of cardiac and renal IR:	^{78, 79} NCT017946 ⁶³
Complement	C5 blockade to prevent humoral rejection	Single and multicenter studies in sensitized transplant recipients.	³ NCT020130 ³⁷ NCT021138 ⁹¹
Cytokines	Anti-TNF-α and IL-1 receptor antagonist for maintenance immunosuppression Anti-IL-6 to prevent rejection in patients with biopsy showing inflammation	Routine use in islet transplant recipients in selected cases (anti-TNF α) and pilot trials (IL-1Ra). Ongoing Phase II trial in kidney recipients	¹⁰⁸ NCT021086 ⁰⁰
Cell adhesion molecules	Anti-VLA4 blockade to reduce leukocyte trafficking in inflamed tissues. P-selectin blockade to reduce monocytes transmigration.	Phase II study of P-selectin blockade to prevent DGF. Commercialized molecules withdrawn.	¹²⁰

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Innate immune responses involved in allograft rejection. Potential therapeutic targets are presented in grey boxes. Mregs, regulatory macrophages.

