

COLLOQUE 2017

MÉDECINE DE PRÉCISION ET THÉRAPEUTIQUES CIBLÉES :
RÉALITÉS ET PERSPECTIVES

**Des situations complexes :
l'exemple de la transplantation rénale**

Thierry Hauet, Poitiers

Les notes renvoient aux pages des références correspondantes.

La transplantation est une situation particulièrement complexe en ce qu'elle associe un donneur, un receveur et un organe. L'organe prélevé peut être d'emblée affecté de lésions en raison de l'âge du donneur, de ses facteurs de comorbidité, cardiovasculaires notamment, du stress lié à la mort encéphalique et à la réanimation. Des lésions d'ischémie-reperfusion, d'intensité plus ou moins sévère selon le type de donneur et les conditions de conservation des greffons, peuvent apparaître à toutes les étapes de son parcours, de l'ischémie cérébrale massive (aboutissant à la mort encéphalique) à la revascularisation de l'organe ischémié. Enfin, des facteurs de risque du receveur peuvent contribuer au développement de lésions du greffon.

FACTEURS INFLUENÇANT LA SURVIE DES GREFFONS

La survie des greffons en fonction des donneurs

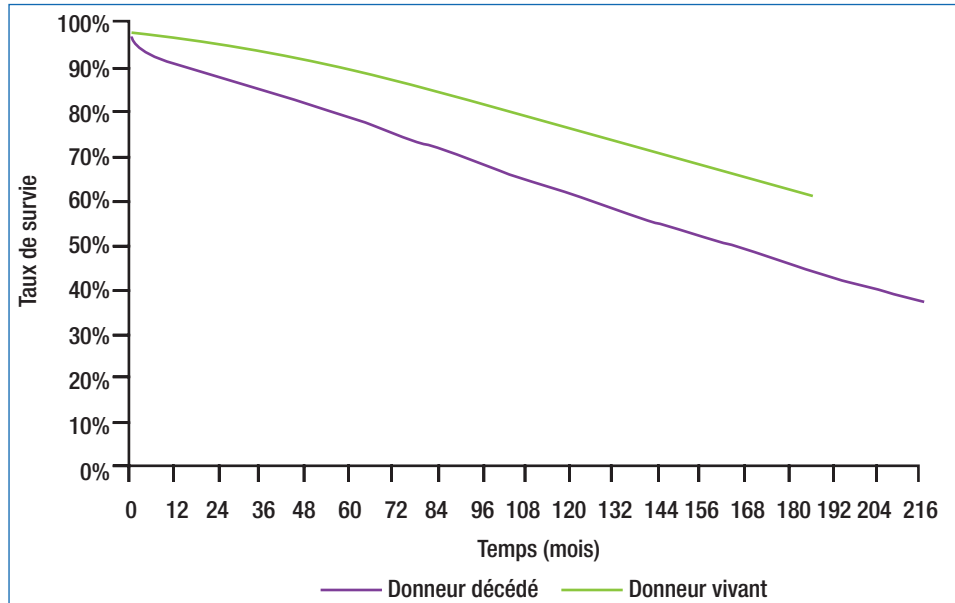
Les prélèvements sont issus de donneurs vivants ou décédés par mort encéphalique et après arrêt cardiaque.

- Les donneurs vivants sont relativement rares (16 % des donneurs en France en 2014 ^[1]), mais les greffons qui en sont issus sont les plus satisfaisants en raison du bon état général du donneur, de l'absence de problèmes liés à la conservation du greffon et de procédures de transplantation bien codifiées. Des données récentes de la littérature soulèvent toutefois la question du devenir à long terme des donneurs.
- Les donneurs décédés par mort encéphalique sont les plus nombreux (82 % en 2014 ^[1]). On différencie les donneurs à « critères standard », c'est-à-dire âgés de moins de 55 ans et sans facteur de comorbidité associé, des donneurs à « critères élargis », âgés de plus de 55 ans et/ou porteurs de comorbidités cardiovasculaires. Ces derniers, recrutés pour pallier à la carence de greffons, comptaient pour 2,2 % de l'ensemble des donneurs en 1996 et pour 30 % aujourd'hui. Une telle progression est loin d'être anodine en raison des lésions d'organes résultant de l'âge et des comorbidités des donneurs.
- Les donneurs décédés après arrêt cardiaque : ils ont en général moins de 50 ans, leur décès a une origine cardiaque, sans antécédents. Ces donneurs sont classés en catégories dites de Maastricht : les classes 1 et 2 de Maastricht regroupent les donneurs décédés après arrêt cardiaque inopiné (arrêt non contrôlé) ; la classe 3 concerne les donneurs décédés après arrêt circulatoire à la suite de la limitation ou de l'arrêt des thérapeutiques (arrêt contrôlé).

Le taux de survie des greffons issus de donneurs vivants est nettement supérieur à celui des donneurs décédés (cf. Fig. 1A) et le taux de survie des greffons issus de donneurs en mort encéphalique à critères standard est très supérieur à celui de ceux issus de donneurs à critères élargis. De façon plutôt inattendue, le taux de survie des greffons de donneurs décédés après arrêt cardiaque est assez proche de celui des donneurs en mort encéphalique à critères standard (cf. Fig. 1B).

Figure 1. Taux de survie des greffons selon les donneurs^[1]

A.



Type de donneur	N	Survie à 1 mois	Survie à 1 an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie à 15 ans	Médiane de survie (mois)
Donneur décédé	50924	95,8% [95,6% - 95,9%]	90,9% [90,7% - 91,2%]	78,6% [78,2% - 79,0%]	61,3% [60,8% - 61,8%]	45,5% [44,9% - 46,2%]	163,2 [160,8 - 165,7]
Nombre de sujets à risque*		48386	44662	29675	14615	5888	
Donneur vivant		97,9% [97,5% - 98,3%]	96,6% [96,0% - 97,1%]	89,6% [88,5% - 90,6%]	76,5% [74,6% - 90,6%]	62,8% [59,8% - 65,6%]	NO
Nombre de sujets à risque*		4394	4051	2189	2189	269	

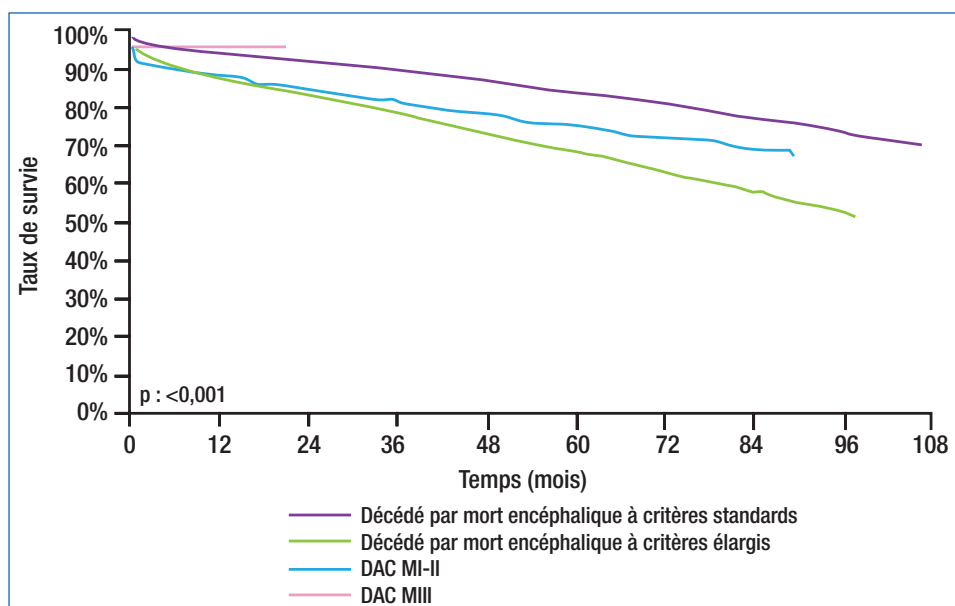
[] : Intervalle de confiance

NO : non observable

* : nombre de malades restant à observer pour chaque temps et pour lesquels aucun événement n'est survenu

Données extraites de CRISTAL le 02/03/2017

B.



Type de donneur	N	Survie à 1 mois	Survie à 1 an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie à 15 ans	Médiane de survie (mois)
Décédé par mort encéphalique à critères standard	13241	96,9% [96,6% - 97,2%]	94,3% [93,9% - 94,7%]	84,3% [83,6% - 85,0%]	NO	NO	NO
Nombre de sujets à risque*		12642	11634	5551	0	0	0
Décédé par mort encéphalique à critères élargis	10443	94,6% [94,2% - 95,1%]	87,5% [86,9% - 88,2%]	68,3% [67,2% - 69,4%]	NO	NO	NO
Nombre de sujets à risque*		9725	8454	3093	0	0	0
DAC MI-II	584	91,9% [89,3% - 93,8%]	88,0% [85,1% - 90,4%]	75,2% [71,0% - 78,9%]	NO	NO	NO
Nombre de sujets à risque*		530	486	195	0	0	0
DAC MIII	27	95,8% [73,9% - 99,4%]	95,8% [73,9% - 99,4%]	NO	NO	NO	NO
Nombre de sujets à risque*		21	9	0	0	0	

[] : Intervalle de confiance

NO : non observable

* : nombre de malades restant à observer pour chaque temps et pour lesquels aucun événement n'est survenu

DAC MI-II : donneur décédé après arrêt circulatoire suite à un arrêt cardiaque inopiné (catégories I et II de Maastricht)

DAC MIII : donneur décédé après arrêt circulatoire suite à la limitation ou l'arrêt des thérapeutiques (catégorie III de Maastricht)

Données extraites de CRISTAL le 02/03/2017

Syndrome d'ischémie/reperfusion

Tous les organes transplantés sont exposés aux lésions du syndrome d'ischémie/reperfusion avec, pour conséquence, une réduction de la survie des greffons à long terme.

Impact de l'ischémie cérébrale aboutissant à la mort encéphalique

Au niveau du rein, l'ischémie cérébrale massive aboutissant à la mort encéphalique est à l'origine d'un important syndrome inflammatoire responsable de lésions microvasculaires et de lésions tubulaires. Les lésions microvasculaires vont entraîner une altération de la perfusion et une augmentation de l'adhésion cellulaire et de la perméabilité microvasculaire qui, en entretenant l'inflammation, seront responsables d'une persistance de l'ischémie. Les lésions tubulaires, notamment du tubule proximal, vont, selon la durée de l'ischémie, évoluer vers des lésions de nécrose et une réduction de la filtration glomérulaire.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux conséquences des apports en oxygène sur le métabolisme mitochondrial. Le manque d'oxygène induit une décélération de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP qui sera responsable d'un arrêt des transporteurs ATP-dépendants perturbant l'homéostasie ionique cellulaire et favorisant l'acidose, l'œdème cellulaire et la désorganisation du cytosquelette. Parallèlement, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire est responsable de l'activation des enzymes calcium-dépendantes comme les phospholipases impliquées dans le processus pro-inflammatoire. L'activation de la calpaïne, une protéase dépendante du calcium, agit sur l'organisation du cytosquelette.

Selon la durée de l'ischémie, ces processus conduisent à des mécanismes plus ou moins réversibles comme l'activation de l'endothélium ou la mort cellulaire par nécrose ou apoptose.

Impact de l'hypothermie durant la phase de conservation

À ce jour, le mode de conservation le plus utilisé pour les greffons après leur prélèvement reste la conservation statique dans une solution à 4°C. Son principe repose sur deux lois de thermodynamique, la première énonçant que l'activité métabolique est diminuée de 50 % à chaque palier de diminution de 10°C (soit une activité métabolique réduite à 15 % à 4°C) et la seconde qui précise que la baisse de la température se traduit par le ralentissement de la vitesse et du rendement des réactions enzymatiques.

Si la diminution de l'activité métabolique est bien l'effet attendu de l'hypothermie, celle-ci a également des effets délétères en entraînant :

- une désorganisation de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines, et une altération de leurs fonctions.
- une désorganisation des alignements des chaînes lipidiques, une ouverture des canaux passifs, un désordre structural des protéines membranaires et une perte d'étanchéité des canaux ioniques.

Il en résultera un épuisement de l'ATP, une réduction de la vitesse et du rendement des réactions, un déséquilibre ionique (chute du potentiel de membrane), un influx de calcium (induction de voies pro-mort cellulaire, impact sur les membranes), une acidose et un œdème cellulaires. L'ensemble de ces effets soulève la question de la pertinence du choix, totalement empirique, d'une température de 4°C pour la conservation des organes.

Hypoxie et facteur induit par l'hypoxie à la phase précoce

Le facteur induit par l'hypoxie -1 α (HIF-1 α pour Hypoxia Inducible Factor -1 α) est un senseur de l'hypoxie. En présence d'oxygène, il est hydroxylé par la prolyl-hydroxylase (PHD). N'étant plus hydroxylé en situation d'hypoxie, il stimule l'érythropoïèse (via la libération d'EPO), la synthèse de néovaisseaux (via le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGF, pour Vascular Endothelial Growth Factor) et la glycolyse en condition anaérobie. HIF-1 α est donc un outil majeur de l'adaptation à court terme contre l'hypoxie.^[2]

Pour ce qui est du long terme, nous avons comparé deux protocoles de greffe de rein dans un modèle d'autotransplantation porcine : un entreposage de 24 h au froid standard (FS) à 4°C et un entreposage FS de 24 h précédé d'une heure d'ischémie chaude (IC) à 37 °C (clampage du pédicule rénal)^[3].

Au cours de la première semaine de reperfusion, les greffes IC + FS présentaient un niveau lésionnel plus élevé. La différenciation tubulaire était associée à l'expression retardée de HIF-1 α et à la perte de son rôle dans la transcription. Dans les reins fortement lésés, la dérégulation de la voie HIF-1 α a également été observée dans la phase chronique avec une diminution de la production du VEGF A et une régulation positive du récepteur VEGF 1 et de la thrombospondine 1. Les reins présentaient une histologie rénale altérée et une fonction diminuée. HIF-1 α était donc bien présent dans les tissus mal perfusés en raison des lésions endothéliales, mais il n'a pas mis en place de système de défense contre cette hypoxie.

Familles de protéines modifiées par l'hypoxie froide

Nous avons recherché quelles sont les principales familles de protéines modifiées par l'ischémie froide dans un modèle de cellules endothéliales humaines placées pendant 24 heures en conservation à 4°C. Nous avons ainsi montré des modifications précoces de l'expression des familles de protéines du cytosquelette, de la transcription, de la transrégulation, du transport intracellulaire et du métabolisme énergétique correspondant à une réponse adaptative dans les premières heures, suivies d'un effondrement après 12 heures.

Une étude similaire sur le transcriptome dans notre modèle de greffe de rein chez le porc avec ischémie chaude de 30 minutes suivie d'une conservation à 4°C pendant 24 heures, a montré que 43 gènes avaient été positivement ou négativement régulés dans les reins ischémiques *versus* reins sains (Log2, p <0,05). Après enrichissement de la solution de stockage, ce sont 82 gènes de l'inflammation, de l'adhésion cellulaire, du métabolisme, etc. qui ont été positivement ou négativement régulés.

Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) prend en charge les protéines mal repliées pour les métaboliser. Le stress du RE est produit par l'accumulation de protéines mal conformées et conduit à l'activation d'une réponse adaptative, la réponse UPR (Unfolded Protein Response). Si la surcharge en protéines non ou mal conformées persiste dans le RE, l'activation prolongée de la réponse UPR dirigera la cellule vers la mort cellulaire programmée. Des données expérimentales suggèrent l'implication du stress du RE dans l'apparition de lésions tissulaires en transplantation d'organe solide.

Trois senseurs de protéines mal repliées sont impliqués dans la voie de signalisation de la réponse UPR : PERK (Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1) et ATF6 (Activating Transcription Factor 6). L'accumulation de protéines mal conformées entraîne l'activation d'IRE1 et la transcription du facteur transcriptionnel Xbp1 (X-box binding protein 1), celle de PERK, la transcription d'ATF4 (Activating Transcription Factor 4) et celle d'ATF6, son transport dans l'appareil de Golgi.

Nous avons modulé ces voies par des agents pharmacologiques ou par RNA silencing (siRNA) dans un modèle de cellules endothéliales humaines. Il a ainsi été montré que l'inhibition d'ATF 4 (exprimé au début de l'ischémie), d'ATF 6 (exprimé après 24 heures d'ischémie environ) et d'Xbp1, exerce un effet protecteur et permet une meilleure survie cellulaire lors de la reperfusion.

Conséquences de la reperfusion

Lors de la transplantation, la reperfusion consécutive à la revascularisation de l'organe ischémié, est à l'origine d'une oxygénation brutale responsable d'un stress oxydatif avec production d'espèces réactives de l'oxygène, ayant un pouvoir oxydant envers l'ensemble des grandes classes de molécules biologiques. Ce processus est responsable de lésions cellulaires pouvant conduire à la mort cellulaire.

De plus, l'activation de l'endothélium induite lors de la reperfusion est responsable d'un état pro-agrégant gênant la reperfusion du territoire ischémié et responsable d'une hypoxie.

Enfin, l'activation de l'endothélium va s'accroître lors des premiers temps de reperfusion et entraîner le recrutement des cellules inflammatoires majoritairement représentées par les monocytes et les polynucléaires neutrophiles. Cette immunité innée est notamment dépendante des Damages Associated Molecular Patterns (DAMPs), des alarmines capables d'activer des récepteurs comme les tolls et de stimuler le processus inflammatoire. L'immunité adaptative est également activée dans un deuxième temps par le recrutement des lymphocytes T.

MÉCANISMES DES LÉSIONS CHRONIQUES

La vision purement immunologique du phénomène de rejet est aujourd'hui remise en question car, si des facteurs immunologiques interviennent bien (mauvais matching, HLA pré-immunisation, reprise différée de fonction, immunosuppression inadaptée, mauvaise compliance), la survie des greffons semble principalement liée aux lésions de ces organes qui font intervenir des facteurs non-immunologiques : donneur âgé, greffon de mauvaise qualité, mort encéphalique, lésions de conservation, lésions ischémiques, comorbidités du receveur (HTA, dyslipidémie) et toxicité de l'immunosuppresseur. Au final, les donneurs marginaux nous donnent des greffons porteurs de lésions, et ce d'autant plus que le capital néphronique initial est lésé, ceux-ci vont évoluer vers des lésions chroniques de façon plus ou moins rapide.

PERSONNALISATION DE LA PRISE EN CHARGE DES GREFFONS

Le principal problème dans la prise de décision des modalités de conservation des greffons est celui de l'évaluation de leur qualité. Aujourd'hui, la créatinine, qui reste notre principal biomarqueur, manque de spécificité et de sensibilité. L'anatomopathologie est une approche essentiellement qualitative et sujette à une grande variabilité inter-observateurs. Au final, le clinicien ne dispose pas de seuils quantitatifs pour l'aider dans ses décisions.

Scores d'évaluation et de prédiction du devenir du greffon à long terme

Il existe toutefois des scores cliniques, aujourd'hui peu consensuels, qui ont été élaborés en vue d'estimer la demi-vie du greffon :

- Le KDRI (*Kidney Donor Risk Index*) prend en compte l'âge du donneur, son poids, sa taille, son ethnie, sa créatinine, ses comorbidités (HTA, diabète), la cause du décès et sa sérologie.
- Le UK-KDRI (*United Kingdom Kidney Donor Risk Index*) prend en compte l'âge du donneur, ses antécédents d'HTA, son poids, ses jours d'hospitalisation, l'utilisation d'adrénaline.

Des scores histopathologiques, peu consensuels eux aussi, ont également été élaborés :

- Le score pathologique du rein prend en compte la glomérulosclérose, la fibrose interstitielle, l'atrophie tubulaire et les lésions vasculaires en distinguant l'épaississement fibreux intimal et la hyalinose artériolaire.
- Le *Maryland Aggregate Pathology Index* prend en compte la fibrose périglomérulaire, la glomérulosclérose et le ratio lumière / mur artériel.

Des scores composites, associant des critères biologiques et histopathologiques, paraissent pertinents mais restent à valider par des études multicentriques.

- Le score composite de Necker prend en compte la créatinine du donneur ($\geq 1,7$ mg/dl), l'HTA et les glomérules sclérotiques ($\geq 10\%$). La présence de deux de ces facteurs est associée à une augmentation d'un facteur 5 du risque que le débit de filtration glomérulaire estimé (eGFR) soit inférieur à 25 ml/min. La présence de trois de ces facteurs est associée à une augmentation d'un facteur 27 de ce risque.
- Le score composite de l'équipe de De Vusser prend en compte l'âge du donneur, la glomérulosclérose ($\geq 10\%$) et la fibrose interstitielle / atrophie tubulaire. La survie estimée du greffon est diminuée de 20 % à 5 ans pour un score supérieur à 60.

CONCLUSION

L'évaluation doit être repensée de façon à permettre une médecine de précision efficace. Elle devrait intégrer les données les plus exhaustives possibles du donneur et du receveur pour établir le profil de risque du rein et permettre de l'orienter en toute sérénité vers la transplantation, vers une réparation préalable ou vers sa non utilisation.

Différentes techniques devraient aider en ce sens. La RMN permet d'évaluer le perfusé de machine à perfusion et de rendre au clinicien, en moins de 2 heures, un ensemble de marqueurs de l'état du greffon. L'évaluation multimodale par IRM, RMN, spectroscopie, etc. permet une évaluation anatomique et fonctionnelle du greffon. Associée à la génomique, à l'histologie et aux biomarqueurs pertinents, elle pourrait permettre l'élaboration d'algorithmes beaucoup plus efficaces que ceux dont nous disposons actuellement. Dans l'idéal, nous devrions aboutir à la création de laboratoires de perfusion, d'unités d'évaluation qui, après examen, pourront envoyer les greffons vers les centres de greffe ou les exclure en cas de qualité insuffisante.

La médecine de précision est un enjeu majeur : plus de 57 000 patients étaient porteurs d'un greffon en 2015 et leur nombre est voué à aller croissant. Il existe malheureusement une pénurie criante d'organes et des compromis sont nécessaires quant au choix des donneurs. La question de l'évaluation des greffons constitue ainsi un enjeu majeur de la transplantation.

BIBLIOGRAPHIE (les références soulignées renvoient aux abstracts correspondants sur PubMed)

1. Le Rapport médical et scientifique de l'Agence de la biomédecine 2016. Le rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France. Page disponible à : <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2016/donnees/organes/06-rein/synthese.htm>. Visitée le 31.01.2018
 2. Chi NC, Karliner JS. Molecular determinants of responses to myocardial ischemia/reperfusion injury: focus on hypoxia-inducible and heat shock factors. Cardiovasc Res 2004;61:437-47.
 3. Delpech PO, Thuillier R, Le Pape S, et al. Effects of warm ischaemia combined with cold preservation on the hypoxia-inducible factor 1 α pathway in an experimental renal autotransplantation model. Br J Surg 2014;101:1739-50.
-