



FACULTÉ  
DE MÉDECINE



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

## Contribution à l'étude des déterminants génétiques opérant chez les patients transplantés rénaux tolérants à leur allogreffe

**Thèse présentée par Annick MASSART**

en vue de l'obtention du grade académique de docteure en Sciences  
Médicales. Année académique 2019-2020

Sous la direction du Professeur Marc Abramowicz, promoteur  
et du Professeur Daniel Abramowicz, co-promoteur

*Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire  
(IRIBHM)*

Fonds Erasme  
POUR LA RECHERCHE MÉDICALE

**fnr's**  
LA LIBERTÉ DE CHERCHER



*A mes parents*



## QUEL EST L'OBJET DE CETTE THESE?

*Le sujet de notre thèse peut paraître abstrait.*

*Elle traite de "tolérance aux greffons", c'est-à-dire de la capacité surprenante qu'ont un nombre très limité de patients transplantés de ne pas rejeter leur greffon en l'absence de prise de médicaments immunosuppresseurs ou d'immunodéficience.*

*A contrario, l'écrasante majorité des patients transplantés sont exposés au rejet et aux conséquences de la prise d'immunosuppresseurs au long cours. A titre d'exemple, nous retranscrivons ici un extrait du dossier médical d'un patient transplanté cardiaque également suivi en néphrologie. Ce parcours illustre des problématiques telles que: la dysfonction du greffon, le rejet de greffe, la souffrance psychologique ou encore plusieurs complications directement liées aux immunosuppresseurs telles que: la néphrotoxicité, les infections opportunistes, les complications osseuses et métaboliques, ... Eviter ces complications est l'enjeu qui fait l'intérêt d'étudier la tolérance aux greffons aujourd'hui.*

*Problématique post-transplantation cardiaque:*

*Sérologie: CMV donneur + receveur + // Toxo donneur +, receveur -  
Résistance à R-ATG\*?*

*2013: rejet grade 2 traité par Solumédrol*

*2013: réactivation CMV traitée par Valcyte*

*2013: fracture du pubis et hémorragie rétropéritonéale*

*2014: infection à HEV traitée par ribavirine*

*2014: TVP étendue veine fémorale commune*

*2014: gammopathie monoclonale, collection 24 h ok*

*2014: diarrhée à Giardia L.*

*2014: sonde double JJ uretère gauche, urolithiase*

*2016: prothèse de genou droite*

*2016: cure de cataracte droite*

*2018: tentative de suicide (pendaison, fractures costales gauches et droites)*

*2018: zona*

*2018: prothèse totale de hanche droite*

*2019: résection de condylomes acuminés*

*2019: presbyaccousie bilatérale*

*Décompensation cardiaque*

*Obésité morbide*

*Insuffisance rénale chronique (néphropathie IgA + inhibiteurs des calcineurines\*)*

*\* Immunosuppresseurs*



## REMERCIEMENTS

*Je tiens à exprimer en tout premier lieu ma profonde gratitude aux Pr. Marc et Daniel Abramowicz qui ont accepté de diriger ma recherche doctorale respectivement en tant que promoteur et copromoteur. Je suis honorée d'avoir bénéficié de leur expertise et de leur confiance. Ce chemin emprunté avec eux fut non seulement fructueux mais très souvent aussi agréable ou joyeux.*

*J'adresse également ma gratitude aux Pr. Denis Franchimont et Vincent Donckier qui ont accepté avec dévouement et professionnalisme de faire partie du comité d'encadrement ainsi qu'aux membres du jury: les Pr. Laurent Mesnard (Université Pierre et Marie Curie), Olivier Vanakker (UZ Gent), Vincent Detours, Jean-Michel Hougardy, Guillaume Smits (tous à l'Université Libre de Bruxelles) ainsi qu'au Pr. Alain Le Moine qui en fut le président d'avoir prêté leur expertise et leur temps précieux à cet exercice.*

*A Marc Abramowicz, je voudrais en particulier exprimer ma reconnaissance pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire de Génétique à l'IRIBHM et fait bénéficier, toutes ces années, de son érudition et de ses enseignements, de son coaching intelligible et raffiné et enfin de son soutien sans aucune faille. Au sein de l'IRIBHM, je voudrais remercier Camille Perazzolo pour son assistance technique très sûre, Valérie Jacquemin, Sarah Duerinckx et la Pr. Isabelle Pirson d'avoir fourni l'environnement intellectuel nécessaire à l'avancement de mes travaux et prêté leur regard intelligemment critique sur mes travaux, le tout dans une ambiance conviviale. Merci aux Pr. Christophe Erneux, Isabelle Migeotte et à Mathieu Antoine pour leur aide précieuse.*

*A Daniel Abramowicz, je voudrais encore dire merci d'avoir pensé et permis la mise en place de nos études européennes avec la collaboration du groupe de travail DESCARTES. Merci à lui pour son pragmatisme, sa vision à long terme et sa capacité de jugement qui nous furent si précieuses. Au sein du groupe DESCARTES, je souhaite remercier l'ensemble des investigateurs.rices qui nous ont aidé à identifier et échantillonner de nouveaux patients tolérants, le tout avec beaucoup d'amitié et d'enthousiasme, en particulier le Pr. Ondrej Viclicky, notre partenaire scientifique de la première heure et enfin remercier Michaela Prokopova pour son support administratif efficace.*

*Ce travail a aussi bénéficié de nombreux appuis extérieurs.*

*En premier je voudrais remercier les Pr. Sophie Brouard et Magali Giral, à l'Université de Nantes, de nous avoir fait confiance et de nous avoir donné accès à leur rare biocollecion de patients tolérants. Ensemble et en quelques années, nous avons réuni une des plus larges biocollections au monde dédiée aux patients tolérants. Ce projet n'aurait pas pu voir le jour sans leur contribution. Au sein de leurs équipes, j'ai une pensée particulière pour Annaïck Pallier, Richard Danger et Pierrick Guérif.*

*Je voudrais remercier les Pr. Gianluca Bontempi et Tom Lenaerts de m'avoir ouvert les portes d'IB square, l'institut de bioinformatique au sein duquel j'ai bénéficié des conseils avisés et de la collaboration de plusieurs experts. Je salue ici la contribution majeure de Catharina Olsen qui a consacré de l'intelligence et du temps à "mettre en chiffres" et en équations toutes nos*

*interrogations: je lui en suis infiniment reconnaissante. Merci aussi au Pr. Guillaume Smits qui nous a régulièrement délivré ses conseils pointus et transmis un peu de sa passion pour la bioinformatique. Tout au long des analyses bioinformatiques, j'ai pu compter sur le soutien précieux de Julie Soblet, Didier Croes ou encore Claudio Reggiani. Je suis également redevable à plusieurs membres du service de génétique de l'UZ Brussel pour leur collaboration et la mise en place de nos cohortes de contrôles, en particulier Dorien Daneels, Ben Caljon et la Pr. Sonia Van Dooren.*

*A l'étranger, nous avons également bénéficié de l'expertise de la Pr. Mary J. Emond (Université de Washington, Seattle), biostatisticienne pionnière des analyses SKAT, et singulièrement aussi de leur utilisation dans les phénotypes extrêmes. Nous la remercions chaleureusement d'avoir accepté d'être de l'aventure malgré la distance. Ses scripts et son expertise furent déterminants.*

*Je voudrais aussi saluer mes collègues d'abord à Erasme puis à l'UZ Antwerpen. Les années passées à leur côté furent, par deux fois, un régal. A Erasme, j'ai rencontré les premiers patients insuffisants rénaux et j'ai "grandi" dans un environnement bienveillant et stimulant. C'est de ce terrain-là qu'est venue l'idée de débiter un travail de recherche. Merci à la Pr. Lidia Ghisdal qui a eu l'idée de cette recherche précise sur les patients tolérants et m'a fait monter à bord du navire néphrogénétique. Merci aux Pr. Joëlle Nortier, Alain Le Moine et Nilufer Broeders pour leur enseignement clinique, le soutien apporté lors de mes premiers travaux scientifiques et plus généralement pour leur enthousiasme communicatif pour la recherche clinique et/ou fondamentale. Je ne peux tous les citer mais j'ai une pensée pour chacun et chacune. A mes collègues d'Anvers, je voudrais dire "hartelijk bedankt" pour leur accueil, l'atmosphère professionnelle et chaleureuse et les facilités accordées pour terminer ma thèse. Merci à Erik Snelders pour son support technique pointilleux. Enfin et de nouveau, je remercie Daniel Abramowicz, dont le soutien de longue date, encore accru ces derniers mois et si peu banal, me va droit au cœur.*

*Je suis également redevable aux institutions et aux mécènes qui m'ont fait confiance en acceptant de contribuer au financement de ce projet: merci au Fonds Erasme, au FNRS, au Fonds Carine Vyghen, au Fonds Horlait Dapsens, au groupe DESCARTES de l'ERA-EDTA, à l'UZA et au Laboratory for Experimental Medicine and Paediatrics (LEMP) de l'Université d'Anvers pour leurs contributions sous diverses formes.*

*J'adresse à ma famille et à mes amie.s mes plus tendres remerciements pour leur affection, leur amour et leur soutien. Merci à mon frère qui m'inspire et me délivre de sages conseils. Merci à Arnaud pour tant et tant.*

*J'envoie un merci ultime à mes parents dont l'étreinte me porte, non plus comme hier mais tout autant, partout. Leur amour guide mes pas. Cette thèse leur est dédiée.*



## RESUME

Chaque année en Europe, quelques 70.000 nouveaux patients requièrent un traitement permanent dans le cadre d'une insuffisance rénale terminale. Dans le même temps, on réalise environ 20.000 greffes, laissant quantité de patients en dialyse. Le taux de survie en dialyse est médiocre (2/3 à 3/4 moindre que chez les sujets non dialysés des mêmes âges) ce qui rend le problème de la disponibilité des greffons parfaitement criant.

La pénurie de greffons est directement liée à leur survie limitée: 10 ans en valeur médiane et en l'absence de censure pour la mort des patients, ou bien 15 ans si l'on se limite à regarder les pertes de greffes liées à des causes intrinsèques. Plus de 60% des greffons sont perdus des suites de lésions de rejet chronique.

Dans ce contexte, nous avons choisi de nous intéresser à de très rares patients, découverts fortuitement, qui en dépit de l'arrêt de leurs immunosuppresseurs pour diverses raisons, maintiennent pendant une durée prolongée d'au moins 1 an, une bonne fonction de leur greffon. Ces patients, tout en étant bien portants, semblent être devenus sélectivement incapables de monter une réaction inflammatoire, à tout le moins destructrice, à l'encontre de leur greffon. On dit qu'ils sont "opérationnellement tolérants". En pratique, ils disposent d'un rein allogénique qu'ils ne rejettent pas mais sans avoir à subir les conséquences néfastes et redoutables des immunosuppresseurs (infections, cancers, diabète, hypertension artérielle, ...).

Comprendre et maîtriser la tolérance opérationnelle ouvrirait la voie à des transplantations plus durables et plus sûres.

Plusieurs études transcriptomiques, mécanistiques et épigénétiques laissent penser que la tolérance opérationnelle repose sur l'expansion de populations cellulaires régulatrices au sein des répertoires alloréactifs, aux dépens des cellules effectrices. Ces équilibres fins seraient maintenus grâce à une série de modifications épigénétiques (microARN, méthylation) assurant une stabilité relative au phénotype. Malgré notre meilleure

compréhension des mécanismes responsables de l'homéostasie de la tolérance, ses mécanismes causaux restent à ce jour inconnus.

Nous avons émis l'hypothèse que la tolérance requerrait une prédisposition génétique pour pouvoir s'installer, concrètement: que les patients tolérants ***se distinguent du reste de la population par un excès de variants à haute pénétrance localisés dans les exons de gènes jouant un rôle critique dans le développement de la dite tolérance.***

Pour valider cette thèse, nous avons, dans un premier temps:

- contribué à montrer, au travers de la première étude pangénomique d'association ("GWAS") validée sur le rejet aigu d'allogreffe rénale que le génome des receveurs influençait les réponses alloimmunes, hors du système HLA.
- réuni la plus grande cohorte de patients tolérants sur le territoire européen à ce jour composée de 22 patients de la biocollecion l'université de Nantes et de 18 patients identifiés prospectivement dans le cadre d'une étude dédiée; TOMOGRAM,
- montré que la tolérance était associée à une survie prolongée des greffons,
- montré qu'il s'agissait d'une découverte rare, identifiée par les cliniciens chez seulement 0.03% de leurs patients greffés et sans condition prédisposante patente.

Dans un second temps, nous avons

- séquencé les exomes de 40 patients tolérants et les avons comparés à ceux de 209 contrôles *in-house*,
- filtré nos données selon notre hypothèse de travail et circonscrit un ensemble de variants exoniques moyennement à hautement pathogènes (au total 84.643, répartis dans 16.343 gènes),
- comparé les distributions de variants (par gène; par variant) chez les cas et chez les contrôles, à l'aide du test *aSKAT-O*; un test basé sur une analyse de la variance et ajusté pour les petits échantillons.

Nos résultats immédiats ont été soumis à 3 contrôles: une correction pour les hypothèses multiples (*FDR* 0.05); des interventions pour repérer d'éventuelles stratifications (notamment d'après une analyse en composantes principales ou *PCA*) et enfin; l'examen soigneux des variants retenus dans les fichiers post-alignement (BAM).

Au terme de ce processus, nous n'avons pas pu identifier de variant ou de gène ségréguant avec la tolérance. Nous concluons que la prédisposition à la tolérance repose peu vraisemblablement sur une hérédité monogénique simple et homogène ("mendélienne"). D'autres données, en ce compris nos propres travaux sur les déterminants génétiques du rejet aigu de greffe, nous encouragent à rechercher des causes génétiques plus complexes. De nouvelles études d'association tirant parti du séquençage génome-entier et exploitant des cohortes plus larges sont requises.

Notre travail est structuré en quatre chapitres.

**Le chapitre 1** entend montrer les ravages de l'insuffisance rénale terminale et les limites actuelles de la transplantation rénale. Les patients tolérants sont présentés comme une opportunité d'explorer de nouveaux paradigmes susceptibles de favoriser la survie prolongée des patients et des greffons, à l'abri des insultes immunologiques et des immunosuppresseurs. Notre thèse est détaillée. Le lecteur qui le souhaite trouvera ici retracés les concepts immunologiques et génétiques manipulés tout au long de notre ouvrage.

**Le chapitre 2** détaille les caractéristiques des patients tolérants opérationnels au travers d'une cohorte européenne inédite. Nous détaillons la stratégie et les méthodes mises en place pour étudier ce phénotype rare.

**Le chapitre 3** présente nos principaux résultats. Notre contribution à l'étude pangénomique d'association (*GWAS*) sur le rejet aigu en transplantation rénale ainsi que notre étude d'association exomique intéressée au phénotype opposé, la tolérance opérationnelle aux greffons.

**Le chapitre 4** passe en revue la thèse et ses contributions.



# TABLE DES MATIERES

QUEL EST L'OBJET DE CETTE THESE?.....	v
REMERCIEMENTS .....	vii
RESUME .....	vii
TABLE DES MATIERES .....	xiii
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epidémiologie de l'insuffisance rénale terminale .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Bases immunologiques du rejet et de la tolérance aux allogreffes de rein .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 <i>A propos de cette section .....</i>	<i>6</i>
1.2.2 <i>Les antigènes de transplantation (phase de reconnaissance) .....</i>	<i>7</i>
1.2.3 <i>Induction d'une réponse inflammatoire contre le greffon (phase effectrice) .....</i>	<i>10</i>
1.2.4 <i>Des mécanismes immunologiques aux lésions histologiques: les différents type de rejets.....</i>	<i>14</i>
1.2.5 <i>L'induction d'une réponse protectrice envers le greffon: le concept de tolérance.....</i>	<i>16</i>
<b>1.3 La tolérance spontanée aux greffons rénaux.....</b>	<b>21</b>
1.3.1 <i>A propos de cette section .....</i>	<i>21</i>
1.3.2 <i>Principales données issues de la recherche sur la tolérance spontanée aux greffons rénaux.....</i>	<i>23</i>
1.3.3 <i>Une compréhension très parcellaire.....</i>	<i>24</i>
<b>1.4 Motivation de notre thèse .....</b>	<b>25</b>
1.4.1 <i>A propos de cette section .....</i>	<i>25</i>
1.4.2 <i>Place de l'hérédité dans les réponses alloimmunes.....</i>	<i>27</i>
1.4.3 <i>Développements génétiques récents.....</i>	<i>28</i>
<b>1.5 NOTRE THÈSE .....</b>	<b>33</b>
<b>1.6 Bases générales du séquençage à haut débit et de l'analyse bioinformatique des données génomiques .....</b>	<b>35</b>
1.6.1 <i>A propos de cette section .....</i>	<i>35</i>
1.6.2 <i>Développement et principes du séquençage à haut débit.....</i>	<i>36</i>
1.6.3 <i>Traitement bioinformatique des données de séquençage.....</i>	<i>40</i>
1.6.4 <i>Filtration des variants (annotation, filtration et priorisation) .....</i>	<i>49</i>
<b>ANNEXE I - article de revue dans <i>Clinical Experimental Immunology</i> .....</b>	<b>53</b>

<b>2</b>	<b>SUJETS ET METHODOLOGIE .....</b>	<b>55</b>
2.1	Des particularités de la tolérance comme phénotype .....	57
2.2	Rassembler une cohorte .....	59
2.2.1	<i>A propos de cette section</i> .....	59
2.2.2	Une vaste enquête paneuropéenne inédite.....	59
2.2.3	<i>Participants</i> .....	61
2.3	Matériel et méthodes .....	64
2.3.1	<i>A propos de cette section</i> .....	64
2.3.2	Extraction d'ADN et séquençage d'exome.....	64
2.3.3	Alignement des séquences et appel des variants .....	65
2.3.4	<i>Filtration des variants</i> .....	66
2.4	Aspects statistiques .....	67
2.4.1	<i>A propos de cette section</i> .....	67
2.4.2	<i>Test d'association génétique</i> .....	67
2.4.3	<i>L'analyse en composantes principales</i> .....	69
2.4.4	<i>Contrôle des variants issus du SKAT</i> .....	69
2.4.5	<i>Hypothèse statistique a posteriori</i> .....	69
	<b>ANNEXE II - article original dans <i>Nephrology, Dialysis and Transplantation</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>3</b>	<b>ETUDE DU DETERMINISME GENETIQUE DES PATIENTS TOLERANTS</b>	
	<b>OPERATIONNELS.....</b>	<b>73</b>
3.1	Préliminaire: contribution à la première étude d'association pangénomique validée sur le rejet de greffe en transplantation rénale .....	75
	<b>ANNEXE III - article original dans <i>l'American Journal of Transplantation</i> .....</b>	<b>77</b>
	<b>ANNEXE IV - lettre à l'éditeur dans <i>l'American Journal of Transplantation</i> .....</b>	<b>79</b>
3.2	Etude cas-témoin des déterminants génétiques de la tolérance opérationnelle en transplantation rénale par séquençage d'exomes .....	81
3.2.1	<i>A propos de cette section</i> .....	81
3.2.2	<i>Filtration des variants</i> .....	81
3.2.3	Analyse en composantes principales de l'ensemble des variants .....	81
3.2.4	Analyses par SKAT à l'échelle des gènes et des variants.....	83
3.2.5	Éléments de discussion portant sur nos analyses SKAT-O.....	93
3.2.6	<i>Améliorations possibles</i> .....	96

<b>4</b>	<b>CONCLUSION, DISCUSSION ET PROLONGEMENTS POSSIBLES .....</b>	<b>99</b>
<b>4.1</b>	<b>Contribution de la thèse et résultats .....</b>	<b>101</b>
<b>4.2</b>	<b>Limites méthodologiques .....</b>	<b>102</b>
4.2.1	<i>A propos de cette section .....</i>	102
4.2.2	<i>Une exploration partielle du génome.....</i>	102
4.2.3	<i>Le choix des contrôles.....</i>	103
4.2.4	<i>Effets de lot .....</i>	104
4.2.5	<i>Inaccessibilité des données et échantillons des donneurs .....</i>	105
<b>4.3</b>	<b>Éléments de discussion .....</b>	<b>105</b>
4.3.1	<i>A propos de cette section .....</i>	105
4.3.2	<i>Et si la tolérance n'avait pas de bases génétiques significatives?.....</i>	105
4.3.3	<i>Si la tolérance est déterminée génétiquement, pourquoi les patients tolérants ne présentent-ils pas en permanence une immunodéficience?.....</i>	107
<b>4.4</b>	<b>Futures recherches et perspectives .....</b>	<b>108</b>
4.4.1	<i>A propos de cette section .....</i>	108
4.4.2	<i>Pourquoi l'étude de la génomique des patients tolérants doit-elle être poursuivie?..</i>	108
4.4.3	<i>Comment poursuivre l'étude de la génomique des patients tolérants? - Avec les données déjà disponibles.....</i>	110
4.4.4	<i>Comment poursuivre l'étude de la génomique des patients tolérants? - Possibles nouvelles investigations.....</i>	111
4.4.5	<i>Conclusion générale.....</i>	114
	<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>117</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>118</b>
	<b>TABLE DES FIGURES.....</b>	<b>133</b>
	<b>TABLE DES TABLES.....</b>	<b>135</b>

Avertissement: ce texte a été écrit en s'inspirant des recommandations en matière d'utilisation de l'écriture inclusive; certains accords peuvent surprendre mais ils ne résultent en aucun cas de négligence.



# 1 INTRODUCTION

## RESUME

En guise d'introduction à ce travail nous avons cherché à démontrer l'importance des ravages causés par l'épidémie mondiale d'insuffisance rénale éventuellement terminale et la place centrale qu'occupe la transplantation rénale dans sa prise en charge mais aussi ses limites (1.1); ensuite nous avons détaillé les mécanismes immunologiques qui, en l'absence d'immunosuppression conduisent inévitablement au rejet d'allogreffe (1.2); la section (1.3) aborde les patients exceptionnels que sont les patients tolérants opérationnels qui contre toute attente maintiennent un greffon fonctionnel en l'absence de toute immunosuppression. Face à cette situation inédite nous avons choisi d'explorer la génomique de ces patients, nous expliquons pourquoi nous avons choisi cette piste en section (1.4) et exposons le but de ce travail (1.5). Enfin, une annexe plus technique reprend les bases générales du séquençage à haut débit et de l'analyse bioinformatique des données génomiques pour le lecteur intéressé (1.6).

## SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidémiologie de l'insuffisance rénale terminale .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>Bases immunologiques du rejet et de la tolérance aux allogreffes de rein .....</b>	<b>6</b>
1.2.1	<i>A propos de cette section .....</i>	6
1.2.2	<i>Les antigènes de transplantation (phase de reconnaissance) .....</i>	7
1.2.3	<i>Induction d'une réponse inflammatoire contre le greffon (phase effectrice) .....</i>	10
1.2.4	<i>Des mécanismes immunologiques aux lésions histologiques: les différents type de rejets .....</i>	14
1.2.5	<i>L'induction d'une réponse protectrice envers le greffon: le concept de tolérance.....</i>	16

<b>1.3</b>	<b>La tolérance spontanée aux greffons rénaux.....</b>	<b>21</b>
1.3.1	<i>A propos de cette section .....</i>	21
1.3.2	<i>Principales données issues de la recherche sur la tolérance spontanée aux greffons rénaux.....</i>	23
1.3.3	<i>Une compréhension très parcellaire.....</i>	24
<b>1.4</b>	<b>Motivation de notre thèse .....</b>	<b>25</b>
1.4.1	<i>A propos de cette section .....</i>	25
1.4.2	<i>Place de l'hérédité dans les réponses alloimmunes.....</i>	27
1.4.3	<i>Développements génétiques récents.....</i>	28
<b>1.5</b>	<b>NOTRE THÈSE .....</b>	<b>33</b>
<b>1.6</b>	<b>Bases générales du séquençage à haut débit et de l'analyse bioinformatique des données génomiques .....</b>	<b>35</b>
1.6.1	<i>A propos de cette section .....</i>	35
1.6.2	<i>Développement et principes du séquençage à haut débit.....</i>	36
1.6.3	<i>Traitement bioinformatique des données de séquençage.....</i>	40
1.6.4	<i>Filtration des variants (annotation, filtration et priorisation) .....</i>	49
	<b>ANNEXE I - article de revue dans <i>Clinical Experimental Immunology</i> .....</b>	<b>53</b>

## 1.1 Epidémiologie de l'insuffisance rénale terminale

**Les maladies rénales chroniques concernent 8 à 16% de la population mondiale** (Jha et al., 2013; Mills et al., 2015). Parmi ces malades, on évalue à plus de 2 millions le nombre d'individus ayant recours à un traitement de substitution de type dialyse ou transplantation rénale (Eggers, 2011). Il est estimé que ce nombre représente moins de 10 % des patients qui devraient bénéficier de ces traitements vitaux. Actuellement, cinq pays, qui représentent à peine 12 % de la population mondiale, regroupent plus de la moitié des patients traités dans le monde<sup>1</sup>. Cent autres pays en développement, contribuant à plus de la moitié de la population mondiale, contribuent à peine à 20% de la population traitée (Couser et al., 2011). Il existe une relation étroite entre le développement économique et la disponibilité de traitements de suppléance rénale. En conséquence, on s'attend à ce que le nombre mondial de patients bénéficiant de tels traitements augmente fortement dans les années à venir, en particulier dû aux cohortes d'Inde et de Chine. En Europe, le nombre de patients en insuffisance rénale terminale progresse toujours mais cependant moins vite que lors des précédentes décades. Globalement, l'incidence du recours aux traitements de substitution rénale dépendra essentiellement du contrôle de la pandémie de diabète, du vieillissement des populations et des budgets financiers alloués aux soins de santé.

D'après une vaste étude couvrant plus de 35 nations européennes, 71.000 individus ont débuté un traitement de remplacement rénal définitif en 2014 pour une population de 532 millions d'habitants (Pippias et al., 2017), soit une incidence annuelle de 133 pmp (par million de population). Au terme des trois premiers mois de leur prise en charge, ces patients étaient massivement traités par hémodialyse (81%), les autres bénéficiant de dialyse péritonéale (13%) ou d'une greffe rénale (6%). Au terme de l'année 2014, on comptait sur le même territoire 491.000 sujets en traitement de remplacement rénal, soit une prévalence de 924 pmp. Durant la même période, seules 19.400 transplantations purent être réalisées. La pénurie d'organes est donc criante. Elle est lourde de conséquences pour les patients dialysés.

---

<sup>1</sup> Ces pays sont l'Allemagne, le Brésil, les Etats-Unis, l'Italie et le Japon.

**Le sujet dialysé a une espérance de vie médiocre et bien inférieure à celle du patient transplanté.** Selon la même étude, la survie à 5 ans des patients ayant débuté une dialyse entre 2005 et 2009 était de 56% (IC à 95% (55,3-56,1)), contre 96% (IC à 95% (95,2-96,2)) et 92% (IC à 95% (91,9-92,7)) respectivement pour les patients transplantés avec un greffon issu d'un donneur vivant ou décédé. La dialyse ampute l'espérance de vie des patients âgés de 20 à 45 ans des deux-tiers contre un tiers pour la transplantation en comparaison à une population ajustée pour l'âge, le genre et diverses comorbidités. Les écarts de survie entre dialyse et transplantation ne sauraient refléter des comparaisons fidèles entre sujets randomisés et pris en charge en double aveugle, pour des raisons éthiques et pratiques évidentes. En conséquence, les patients dialysés étudiés ici, qui n'ont pas accédé à la transplantation, présentent sans doute plus de comorbidités. Cependant, l'avantage de survie des greffés persiste lorsque l'on compare les patients candidats à une greffe rénale qui l'obtiennent à ceux qui restent en dialyse par malchance (Wolfe et al., 1999). De surcroît, la haute mortalité observée en dialyse cadre également avec les données de cohorte qui montrent à l'envi la surmortalité graduelle liée à la maladie rénale chronique, qu'elle consiste en une baisse du débit de filtration glomérulaire et/ou en une albuminurie (Chronic Kidney Disease Prognosis et al., 2010; Go et al., 2004). Ainsi, les patients insuffisants rénaux chroniques accusent une mortalité cardiovasculaire et non-cardiovasculaire plus de 8 fois supérieures à celles de sujets contrôles (de Jager et al., 2014) .

Enfin, les contraintes liées aux techniques de dialyse, les comorbidités associées à l'insuffisance rénale terminale et l'anxiété générée par la maladie procurent souvent au malade dialysé une piètre qualité de vie, bien en deçà des standards en transplantation (Laupacis et al., 1996; Ogutmen et al., 2006).

Pour conclure, sans que dialyse et transplantation n'aient pu être comparées directement, on considère généralement que la transplantation est le meilleur traitement possible pour la plupart des patients en insuffisance rénale terminale, tant du point de vue de la survie que de celui de la qualité de vie.

### **Les succès de la transplantation entachés par les pertes tardives de greffon.**

La transplantation rénale ne s'est véritablement développée qu'à l'avènement de moyens pharmacologiques d'immunosuppression. A partir de 1962, l'usage généralisé d'azathioprine puis, rapidement, de stéroïdes ont permis de prévenir et/ou de traiter les rejets précoces (Starzl et al., 2004). Au cours des 3 à 4 premières décennies, également marquées par la mise sur le marché d'immunosuppresseurs de plus en plus puissants (ciclosporine et anticorps monoclonaux anti-CD3 au début des années 80, tacrolimus au début des années 90), on a assisté à des progrès continus en terme de contrôle du rejet aigu et, parallèlement, à un allongement progressif de la survie des greffons au long-cours (Hariharan et al., 2000). Récemment cependant, vers le milieu années 90, malgré le contrôle toujours meilleur des rejets aigus, la survie des greffons au long cours a commencé à stagner voire à décliner (Meier-Kriesche et al., 2004; Pascual et al., 2002; Starzl et al., 2004). Ainsi, alors que quelques 91% ( $\pm 0,4$ ) des greffons sont encore fonctionnels à un an, on n'en dénombre plus que 77% ( $\pm 0,6$ ) à 5 ans et 56% ( $\pm 0,8$ ) à 10 ans (Gondos et al., 2013). La médiane de survie d'un greffon est donc d'environ 10 ans, et passe à 15 si l'on exclut les patients décédés avec un greffon fonctionnel (Lamb et al., 2011). Les conséquences des pertes tardives (au-delà d'un an) de greffon concernent non seulement les individus mais aussi la collectivité. Les patients de retour en dialyse subissent les comorbidités citées plus haut. Ceux qui pourront bénéficier d'une nouvelle greffe requerront souvent une prise en charge plus exigeante que la précédente, tant d'un point de vue immunologique (Heaphy et al., 2014) que chirurgical (Ooms et al., 2015). Enfin, la ré-administration de doses massives d'immunosuppression en début de greffe accroît le risque néoplasique (Ducroux et al., 2017). Au niveau collectif, le recours itératif aux greffes accentue la pénurie d'organes. Récemment, aux Etats-Unis, les re-transplantations concernaient 14% des inscrits en attente d'un rein et près de 12 % des greffes effectives (Heaphy et al., 2014; Magee et al., 2007). Il paraît donc crucial de comprendre les causes de ces échecs tardifs.

Il y a peu, on classait les greffons perdus sur base histomorphologique et la majeure partie des pertes était expliquée par des glomérulopathies ou un processus de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire indistinct. Etaient retenus comme rejets chroniques, les glomérulopathies évidentes et/ou les atteintes microcirculatoires qui s'accompagnaient d'un marquage anti-C4d positif sur les capillaires péri-tubulaires à la biopsie rénale (Solez

et al., 2007). Depuis que le diagnostic des rejets chroniques s'est affiné, suite à l'implémentation des méthodes très sensibles de détection des anticorps anti-HLA anti-donneur, on a pu se rendre compte que beaucoup plus de lésions qu'on ne pensait, étaient médiées par des anticorps anti-greffon, en ce compris en l'absence de marquage anti-C4d *in situ*. On s'aperçoit, par exemple, que la fibrose rénale, généralement attribuée à l'usage des inhibiteurs de calcineurine (tacrolimus, ciclosporine) s'accompagne dans plus d'un quart des cas d'anticorps anti-greffon (El-Zoghby et al., 2009).

La manière de diagnostiquer les rejets chroniques a été revue et étendue et éclaire d'un jour nouveau la problématique des pertes tardives de greffon (Haas et al., 2014). Désormais, sur 100 greffons perdus (données censurées pour les patients décédant avec un greffon fonctionnel), 60 pertes sont attribuables à un processus de rejet chronique lié à la présence d'anticorps anti-HLA contre le greffon; 18 sont liées à des glomérulonéphrites inaugurales ou récurrentes; 7 à une infection opportuniste par des bk-Polyomavirus et 6 à d'autres causes variées (Sellares et al., 2012).

La conclusion inattendue et malheureuse de cette section est que **plus de 60 ans après la généralisation de l'usage des médicaments immunosuppresseurs en greffe rénale, notre principal défi demeure la maîtrise des phénomènes de rejet**. Dans la prochaine section, nous donnons un éclairage sur les mécanismes immunologiques qui sous-tendent le rejet de greffe rénale.

## **1.2 Bases immunologiques du rejet et de la tolérance aux allogreffes de rein**

### **1.2.1 A propos de cette section**

Une greffe allogénique désigne toute greffe entre deux individus de la même espèce non génétiquement identiques. Dans ce chapitre nous montrons comment des motifs moléculaires du greffon sont reconnus par le système immunitaire de l'hôte (1.2.2) et conduisent à une réponse inflammatoire spécifique visant à les éradiquer (1.2.3); nous détaillons les formes histologiques que peuvent revêtir le rejet de greffe (1.2.4); en dernier lieu, nous évoquons comment certains écarts au processus d'activation normal du système

immunitaire peuvent mener, à l'inverse, à l'acceptation sélective du greffon, c'est-à-dire à un état de "tolérance" (1.2.5).

La 5<sup>ème</sup> édition du livre "Les Bases de l'immunologie Fondamentale et Clinique" rédigé par A.K. Abbas et collègues constitue la référence principale de cette section (Abbas, 2016). Les références spécifiques continuent d'être mentionnées dans le texte.

Les lecteurs et lectrices rompu.e.s à l'immunologie peuvent se rendre directement à la section 1.3, page 21.

### 1.2.2 *Les antigènes de transplantation (phase de reconnaissance)*

**Les principales molécules à l'origine de la réponse alloimmune sont des protéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité** (CMH en français ou HLA pour "*Human Leukocyte Antigen*", en anglais). Les molécules du système HLA composent un groupe hétérogène de protéines exprimées à la surface des cellules. Chaque individu possède 12 allèles HLA: 6 allèles codant pour des molécules HLA dites de classe I (HLA-A, -B, -C), et au moins 6 allèles codant pour des molécules distinctes dites de classe II (HLA-DR, -DQ, -DP). En outre, chacun de ces gènes est extrêmement polymorphique et compte de un à plusieurs milliers d'allèles dans l'espèce humaine. La chance que deux individus non apparentés possèdent 12 mêmes allèles (qu'ils soient "HLA identiques") est donc infime. Les disparités HLA interindividuelles constituent la principale barrière aux allogreffes, mais la fonction biologique des molécules HLA est évidemment ailleurs<sup>2</sup>.

**Physiologiquement, le rôle des molécules HLA est de présenter des antigènes peptidiques** (microbiens, alimentaires, aériens, ...) **aux lymphocytes T** et d'initier une réponse antigène-spécifique. Les molécules HLA de classes I et II ont des structures et des fonctions distinctes. Fonctionnellement, les fragments peptidiques issus de la dégradation de protéines cytosoliques sont apprêtés sur des molécules HLA de classe I et présentées à la surface des cellules à l'intention des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. En revanche, les

---

<sup>2</sup> Il existe d'autres antigènes de transplantation comme les antigènes du système ABO ou les antigènes dits mineurs. Ceci sort du cadre de ce travail et cette thématique ne sera pas approfondie ici.

fragments peptidiques issus de l'endocytose et de la dégradation de protéines extracellulaires sont apprêtés sur des molécules HLA de classe II reconnaissables exclusivement par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'ensemble des cellules nucléées de l'organisme expriment des molécules HLA de classe I tandis que seules les cellules immunitaires spécialisées dans la présentation antigénique expriment constitutivement des molécules HLA de classe II<sup>3</sup>. Seuls, les complexes HLA-peptides ne permettent pas de déclencher une réponse inflammatoire, ils doivent être présentés par des cellules spécialisées disposant de molécules de costimulation.

### **Modes de présentation des antigènes et antigènes de transplantation.**

La rencontre entre les cellules présentatrices d'antigènes, typiquement des cellules dendritiques, et les lymphocytes T naïfs a lieu dans les organes lymphoïdes périphériques (ganglions, rate, greffon). Dans le cas de la transplantation, les lymphocytes T de l'hôte peuvent aussi bien reconnaître des alloantigènes présentés par les cellules dendritiques du donneur - *on parle de présentation directe* - que des alloantigènes présentés par les cellules dendritiques du soi - *on parle alors de présentation indirecte*.

La présentation indirecte est similaire à celle de tout antigène étranger: les cellules dendritiques de l'hôte vont apprêter des peptides étrangers, dans ce cas précis allogéniques, sur des molécules HLA du soi et déclencher une réaction inflammatoire. La présentation directe est plus surprenante: pour rappel, chaque lymphocyte T a été sélectionné pour réagir exclusivement à des peptides étrangers portés par des molécules HLA du soi<sup>4</sup>. Que, dans le cas de la présentation directe, des lymphocytes T réagissent à des peptides présentés sur des molécules HLA exogènes mérite plus ample explication. L'opinion dominante est que, sur les milliers de complexes HLA-peptides présents à la surface de chaque cellule du greffon, il s'en trouve forcément plusieurs semblables à s'y méprendre à des

---

<sup>3</sup> Cellules dendritiques, phagocytes mononuclés, lymphocytes B, cellules épithéliales thymiques.

<sup>4</sup> Au cours du processus de sélection thymique qui a lieu durant la période néonatale, seuls les lymphocytes qui reconnaissent des complexes HLA du soi - peptide étranger atteindront la maturité. Un processus de *sélection positive* retient les lymphocytes utiles, c'est-à-dire, ceux qui sont capables de reconnaître les molécules HLA du soi - peptide avec une certaine affinité. Un processus de *sélection négative* élimine les lymphocytes nuisibles, c'est-à-dire, ceux qui reconnaissent avec une forte affinité un complexe HLA du soi - peptide et qui mèneraient inévitablement à des réactions auto-immunes.



complexes HLA du soi - peptide étrangers, reconnus par le système immunitaire. *En d'autres termes, les antigènes de transplantation mimeraient des antigènes contre lesquels le système immunitaire est programmé pour réagir, créant ainsi une réaction croisée.*

Enfin, précisons que l'on a plus récemment décrit un mode de présentation semi-directe, dans lequel les cellules dendritiques du receveur captent des molécules HLA du donneur et les expriment comme telles à leur surface<sup>5</sup>. Les alloantigènes formés résultent alors des mêmes principes que dans la voie directe (Alegre et al., 2016).

Les notions abordées dans cette section sont synthétisées dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1** - Modes de présentation et formation des antigènes de transplantation.

<b>Mode de présentation</b>	<b>Définition</b>	<b>Antigène de transplantation</b>
Directe	les <b>cellules dendritiques du donneur</b> appréhendent des peptides endo- ou exogènes sur leurs molécules HLA.	<b>HLA du donneur</b> + <b>peptide*</b>
Indirecte	les <b>cellules dendritiques du receveur</b> appréhendent des peptides endo- ou exogènes sur leurs molécules HLA.	<b>HLA du soi</b> + <b>peptide du donneur**</b>
Semi-directe	les <b>cellules dendritiques du receveur</b> captent des molécules HLA du donneur et présentent des peptides sur ces dernières.	<b>HLA du donneur</b> + <b>peptide*</b>

\* indifféremment du soi ou pas; par ex. microbien  
 \*\* typiquement: dégradation d'une molécule HLA (antigène majeur), alternativement dégradation d'une variante allélique d'une protéine polymorphe (antigène mineur)

<sup>5</sup> Les cellules dendritiques du donneur, lésées lors du processus d'ischémie-reperfusion, libèrent diverses vésicules dans l'espace extracellulaire (exosomes, membrane cellulaire sous forme de microvésicules ou autres vésicules résultant de leur apoptose) qui seront captées et arborées à la surface des cellules dendritiques du receveur.

### 1.2.3 Induction d'une réponse inflammatoire contre le greffon (phase effectrice)

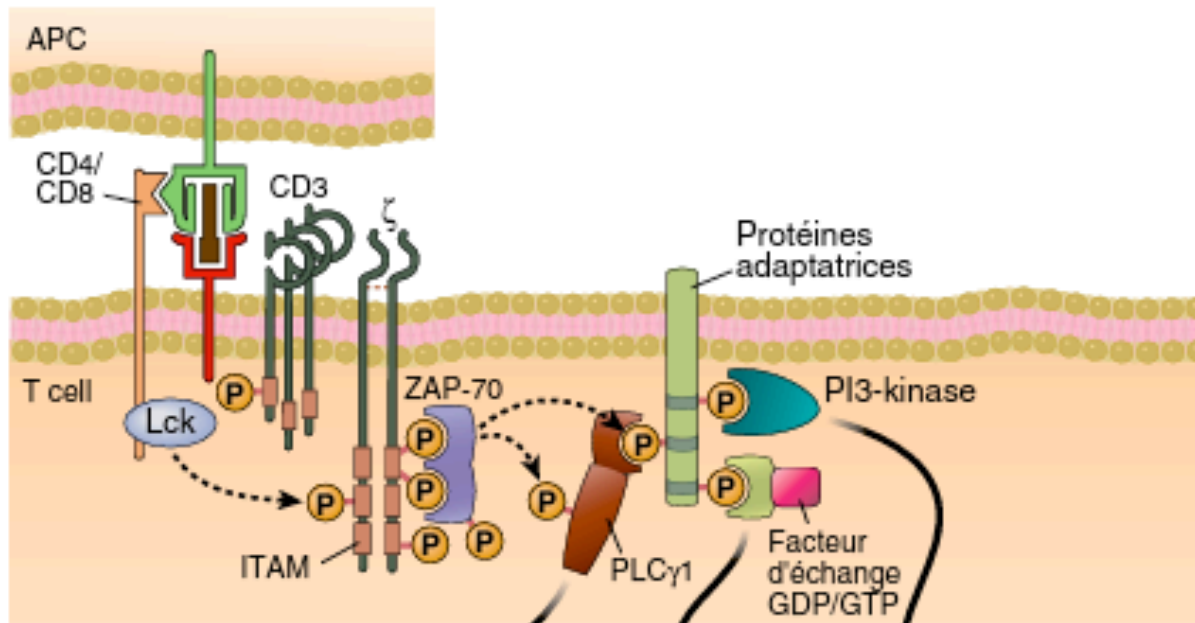
**La reconnaissance d'un antigène par un lymphocyte T déclenche une succession d'évènements.** La liaison entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte, initialement faible, est renforcée par différentes molécules d'adhésion. Une redistribution très organisée des protéines membranaires s'ensuit à la surface des lymphocytes et des cellules présentatrices d'antigènes; on parle de "synapse immunologique". Du côté lymphocytaire, les récepteurs *TCR*, les corécepteurs CD4 ou CD8 et des molécules de costimulation telles le CD28 se regroupent en *microclusters*, entourés par des molécules de signalisation et d'adhésion qui stabiliseront la structure le temps nécessaire (Choudhuri and Dustin, 2010). L'expression de molécules de costimulation est induite par des mécanismes liés à l'immunité innée et renforcée par la liaison du ligand à son récepteur.

Les corécepteurs CD4 ou CD8, transportés près des complexes *TCR*, mettent en contact leurs tyrosines kinases ("Lck") avec des motifs d'activation basés sur la tyrosine ("ITAM") présents sur les différentes chaînes transmembranaires du lymphocyte (en particulier  $\zeta$  et CD3). Une fois phosphorylés, ces motifs assurent le recrutement de la protéine ZAP-70 qui peut à son tour être phosphorylée par Lck. Activée, ZAP-70 phosphoryle diverses protéines adaptatrices et enzymes à proximité du *TCR* et entraîne une cascade d'évènements de signalisation intracellulaire. On peut, quoiqu'un peu artificiellement en raison de confluences, isoler quatre voies de signalisation déclenchées par l'engagement du *TCR*.

- 1) La voie calcium - *NFAT* (*nuclear factor of activated T-cells*)
- 2) La voie protéine kinase  $\theta$  - *NF $\kappa$ B* (*nuclear factor  $\kappa$ B*)
- 3) La voie des Ras- et Rac -MAP kinases et d'*AP-1* (*activating protein 1*)
- 4) La voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (*PI-3 kinase*).

Pour plus de détails sur les évènements métaboliques dans chacune de ces voies, nous vous référons à la **Figure 1**.

**Figure 1** - Voies de transduction des signaux dans les lymphocytes T



	Activation de la Phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1)		Recrutement et activation de protéines adaptatrices	
	Voie Ca <sup>2+</sup> - NFAT	Voie protéine kinase $\kappa$ - NF $\kappa$ B	Voie des Ras- et Rac - MAP kinases et d'AP-1	Voie de la PI-3 kinase
INTERMÉDIAIRES BIOCHIMIQUES (et <b>enzymes actives</b> )	Génération d'IP <sub>3</sub> au départ de PIP <sub>2</sub>	Génération de DAG à partir de PIP <sub>2</sub>	Phosphorylations en cascade dépendantes de ZAP-70	PI-3 kinase phosphoryle le PIP <sub>2</sub> membranaire en PIP <sub>3</sub>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• augmentation du calcium cytosolique</li> <li>• formation du complexe Ca<sup>2+</sup> calmoduline</li> <li>• activation de la phosphatase <b>calcineurine</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• activation de <b>PKC</b> qui gagne la membrane cellulaire</li> <li>• phosphorylation et dissociation de l'inhibiteur de NF<math>\kappa</math>B (IKB)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• recrutement à la membrane de <b>RAS</b> et <b>RAC</b> grâce à leur liaison à la GTP</li> <li>• activation des MAP kinases <b>ERK</b> et <b>JNK</b></li> <li>• augmentation de l'expression / phosphorylation des protéines c-Fos et c-Jun</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• activation des sérine/thréonine kinases <b>Akt</b> et <b>mTOR</b></li> </ul>
FACTEURS DE TRANSCRIPTION	• translocation de <b>NFAT</b> au niveau du noyau	• <b>NF<math>\kappa</math>B</b> gagne le noyau	• c-Fos + c-Jun phosphorylées = <b>AP-1</b>	• activation des sérine/thréonine kinases <b>Akt</b> et <b>mTOR</b>
SYNTHÈSE PROTÉIQUE	IL-2, IL-23	Inducteurs du cycle cellulaire, molécules effectrices telles CD40L (CD4) ou molécules cytotoxiques (CD8)		Protéines anti-apoptotiques
<b>Abbreviations:</b> AP-1, activating protein 1; APC, antigen presenting cell; CD40L, CD40 ligand; DAG, diacylglycerol; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GTP/GDP, guanosine triphosphate/guanosine diphosphate; IL-2(R), interleukin-2 (receptor); ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAP kinases, mitogen-activated-protein-kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; NFAT, nuclear factor of activated T cells; PIP <sub>2</sub> , phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP <sub>3</sub> , phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate; PKC, protein kinase C; PLC $\gamma$ 1, isoforme $\gamma$ 1 phospholipase C specific of phosphatidylinositol; PI-3, phosphatidylinositol-3; ZAP-70, zeta-associated protein of 70 kD.				

**Légende:** La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T induit des événements précoces de signalisation qui comprennent la phosphorylation des tyrosines des molécules du complexe du TCR et le recrutement de protéines adaptatrices au niveau du site de reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T. Ces événements précoces conduisent à l'activation de plusieurs intermédiaires biochimiques, qui à leur tour activent des facteurs de transcription qui stimulent l'expression de gènes dont les produits sont à la base des réactions lymphocytaires T.

Les effets possibles de la costimulation sur ces voies de signalisation ne sont pas présentés. Par simplicité, les voies de signalisation sont illustrées comme indépendantes l'une de l'autre, mais en fait elles sont interconnectées dans des réseaux complexes.

Ensemble, ces voies de signalisation vont aboutir à de nouvelles synthèses protéiques: (cytokines et leur récepteurs, en premier lieu desquelles l'interleukine-2, protéines anti-apoptotiques, protéines utiles à l'initiation du cycle cellulaire, protéines cytotoxiques dans le cas des lymphocytes CD8<sup>+</sup>). La réponse fonctionnelle des lymphocytes T va consister en une *expansion clonale* fantastique qui va culminer à 3 ou 4 jours, parallèlement à leur *différenciation en cellules effectrices ou en cellules mémoires*. Il a été établi qu'un seul alloantigène de transplantation pouvait être reconnu par 1 lymphocyte T sur 10<sup>3</sup> ou sur 10<sup>2</sup> contre 1 sur 10<sup>5</sup> à 1 sur 10<sup>6</sup> lymphocytes T pour un antigène microbien. Au cours de l'activation chaque lymphocyte T peut ensuite générer 10.000 cellules filles.

### **Les cellules effectrices**

En réponse à l'antigène et aux molécules de costimulation, les cellules T se différencient distinctement selon qu'elles possèdent un corécepteur CD4 ou CD8, puis davantage sous l'action de différentes cytokines.

**Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>** vont se différencier en cellules effectrices directement cytotoxiques appelées *CTL (Cytotoxic lymphocytes)*. Dans les suites de leur activation par une cellule présentatrice d'antigène, elles développent des propriétés cytolytiques et sont capables d'induire l'apoptose de leur cellule cible par plusieurs mécanismes.

**Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>** vont se différencier en cellules effectrices auxiliaires ou *T helper (Th)* capables d'activer d'autres cellules pour éliminer l'antigène. Les cellules CD4<sup>+</sup> auxiliaires produisent quantité de cytokines visant à activer des cellules effectrices (immunité cellulaire), renforcer les immunités de barrière, accroître l'inflammation ou encore activer les lymphocytes B pour qu'ils produisent des anticorps de haute affinité (immunité humorale). Les lymphocytes T auxiliaires expriment le CD40L (CD40 ligand) qui joue un grand rôle dans l'activation des macrophages et des lymphocytes B. Selon l'environnement cytokinique, les lymphocytes auxiliaires peuvent se différencier davantage en sous-types de cellules effectrices: Th1, Th2, Th17, *Tfh* (cellules T auxiliaire folliculaires) ou même en lymphocytes T régulateurs (*Tregs*, voir plus loin) produisant différentes cytokines et présentant des fonctions spécialisées. Tant les lymphocytes Th1, Th2 que Th17 ont déjà été incriminés dans le développement du rejet mais ces catégories sont moins étanches qu'il n'y paraît (*plasticité*) et il est un peu illusoire de vouloir les étudier séparément dans ce contexte.

Suite à leur différenciation, la plupart des lymphocytes **T CD4<sup>+</sup> auxiliaires** (Th1, Th2, Th17) migrent vers les sites d'inflammation pour y rencontrer leur antigène et activer des cellules cytolytiques (macrophages, neutrophiles, ...) participant de l'immunité cellulaire. D'autres T CD4<sup>+</sup> auxiliaires, folliculaires cette fois, les *Tfh*, jouent un rôle fondamental dans l'élaboration des réponses humorales contre le greffon. Les *Tfh* restent dans les ganglions mais migrent au bord de la zone folliculaire pour y rencontrer des lymphocytes B préalablement activés par le même antigène. Une fois le contact T-B établi, les **lymphocytes B activés** rejoignent les follicules lymphoïdes, y prolifèrent (centres germinatifs) et débutent la production d'anticorps efficaces et de très haute affinité pour l'antigène ciblé<sup>6</sup>. Les cellules différenciées sécrétrices d'anticorps hautement spécifiques s'appellent les **plasmoblastes** et rejoignent généralement la moelle osseuse. D'autres cellules B dites **B mémoires** continuent à circuler dans le sang, sans produire d'anticorps à moins que l'antigène ne refasse son apparition.

Finalement, une fraction des cellules T activées se différencie également en cellules **T mémoires** à longue vie. Elle survivront dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans la circulation et seront à même de réagir plus rapidement en cas de réintroduction de l'antigène (London et al., 2000).

---

<sup>6</sup> Suite à la rencontre T-B dans les régions parafolliculaires des ganglions lymphatiques, les cellules B activées prolifèrent et se mettent à produire des IgM et des IgD de faible affinité. Certaines de ces cellules vont migrer au sein des follicules, proliférer et engendrer des centres germinatifs. Au cours des divisions successives des lymphocytes B, les gènes des immunoglobulines font l'objet de mutations intenses qui intéressent les chaînes lourdes (commutation "isotypique" ou "de classe" des immunoglobulines) et les régions variables (maturation d'affinité). Au terme de ce processus, les cellules sécrétrices d'antigènes qui rejoignent la circulation produisent des anticorps d'isotypes nouveaux (en particulier des IgG dans le cas des greffes rénales) de très haute affinité pour leur antigène.

#### 1.2.4 *Des mécanismes immunologiques aux lésions histologiques: les différents type de rejets*

Nous venons de voir comment les antigènes de transplantation sont reconnus par le système immunitaire de l'hôte et comment, en l'absence d'immunosuppresseurs, ils déclenchent une réponse puissante, *antigène-spécifique*, destinées à détruire le greffon.

Cliniquement, en l'absence d'immunosuppression, toute transplantation aboutira à un rejet du greffon, c'est-à-dire à une perte de fonction accompagnée de lésions histologiques caractéristiques. On peut classer les rejets de plusieurs manières: sur base du délai d'apparition (rejets hyperaigu, aigu, chronique, aigu tardif<sup>7</sup>); sur base histologique (rejet interstitiel-cellulaire, rejet vasculaire) ou sur base physiopathologique. Dans le présent ouvrage, nous nous référons à une classification étiologique et consensuelle qui différencie les rejets sur base de leur origine cellulaire T ou B supposée (Haas et al., 2014; Nankivell and Alexander, 2010). Bien-sûr, en pratique, plusieurs processus peuvent coexister.

Au cours des rejets médiés par les cellules T (**TCMR** pour *T-Cell Mediated Rejection*), les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (**CTL**) interagissent directement via leur *TCR* avec les complexes peptide-CMH de classe I en surface des cellules parenchymateuses et vasculaires du greffon et occasionnent des lésions de **tubulite** et dans une moindre mesure **d'endothélite**. Suite à la nécrose de cellules tubulaires, de nombreuses cellules mononucléées (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, macrophages, ...) envahissent l'espace interstitiel (**infiltrats**) et y sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. L'éventuelle prolongation de ces événements mènera à des lésions **chroniques** dominées par de l'atrophie tubulaire, la fibrose interstitielle et une obstruction progressive des vaisseaux de petits et moyens calibres (**artériosclérose**) résultant de la prolifération des cellules musculaires lisses.

Au cours des rejets médiés par les anticorps (**ABMR** pour *AntiBody-Mediated Rejection*), des anticorps anti-HLA préformés ou de novo vont se fixer sur les cellules endothéliales du greffon. Il s'ensuit une activation de la voie classique du complément (inconstamment accompagnée d'une positivité des immunomarquages anti-C4d) qui entraîne un

---

<sup>7</sup> Les rejets dits hyperaigus se produisent dans les *minutes* qui suivent la levée des clamps chirurgicaux vasculaires lors de la transplantation; les rejets dits aigus sont ceux qui apparaissent dans les *jours ou semaines* qui suivent la transplantation, les rejets dits chroniques se développent de façon indolente en plusieurs *mois ou années* et aboutissent à une perte progressive des fonctions du greffon, les rejets aigus tardifs se manifestent à distance de la transplantation par une perte brutale de la fonction du greffon.

recrutement de cellules inflammatoires (polynucléaires, ...) et de la nécrose endothéliale qui à son tour va favoriser l'agrégation plaquettaire et la coagulation.

Le lecteur ou la lectrice intéressée trouvera dans le **Tableau 2** un résumé des principales médications utilisées couramment en transplantation pour prévenir ou traiter le rejet. Ces notions seront utiles pour la suite de l'exposé.

**Tableau 2** - Principales médications administrées en pratique courante pour prévenir le rejet d'allogreffe et leurs mécanismes d'action (adapté de Pascual et al.2002).

Médications	Principaux mécanismes d'action
Corticostéroïdes	Inhibition de la transcription de cytokines dans plusieurs types cellulaires clés (lymphocytes, macrophage, cellules dendritiques).
Azathioprine	Inhibition de la synthèse des purines (ADN et ARN) dans les myélocytes de la moelle osseuse et dans les leucocytes.
Anticorps polyclonaux anti-lymphocytaires	Opsonisation des lymphocytes, clearance des lymphocytes, lyse médiée par le complément.
Ciclosporine	Inhibition de la synthèse de l'interleukine-2 par inhibition des calcineurines dans les lymphocytes; stimulation de la production de TGF- $\beta$ dans diverses cellules .
Tacrolimus	Inhibition de la synthèse de l'interleukine-2 par inhibition des calcineurines dans les lymphocytes.
Mycophénolate mofétil	Inhibition des voies de synthèse des purines par inhibition de l'enzyme inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH); par rapport à l'azathioprine, sélectivité accrue pour les lymphocytes.
Sirolimus, everolimus	Inhibition de la transmission du signal médié par l'interleukine-2, résultant en une inhibition de la progression du cycle cellulaire et de la prolifération.
Anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur à l'IL-2	Fixation à la sous-unité alpha du récepteur à l'interleukine-2 sur les lymphocytes T activés résultant en une inhibition des réponses-IL-2 médiées.
Abatacept, Beletcept	Protéines de fusion CTLA-4 - Immunoglobulines qui inhibent les signaux de costimulation par fixation aux récepteurs CD80 et CD86 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes.

### 1.2.5 *L'induction d'une réponse protectrice envers le greffon: le concept de tolérance.*

Les immunosuppresseurs empêchent le rejet du greffon en bloquant de manière aspécifique des pans assez larges de notre immunité. Au prix d'un accroissement important de l'incidence des infections et de certains cancers. Cependant, la capacité du système immunitaire de l'hôte à entraîner la *destruction* des antigènes étrangers reste intacte et, aussitôt les immunosuppresseurs arrêtés, le rejet survient. Pourtant, expérimentalement, bloquer sélectivement l'une ou l'autre étape de l'activation des lymphocytes naïfs peut permettre de réorienter le système immunitaire vers *l'acceptation* des antigènes. On parle dans ce cas de "*tolérance immunologique*".

Dans cette section, nous définissons le concept de tolérance immunologique; détaillons ses bases mécanistiques et examinons sa pertinence en transplantation humaine.

#### **Définition de la tolérance immunologique**

En immunologie, on définit la tolérance immunitaire comme "l'absence de réponse spécifique à un antigène qui est normalement induite par l'exposition des lymphocytes à cet antigène" (Abbas, 2016). La tolérance au soi, étant l'absence de réponse inflammatoire à l'égard des antigènes de nos propres cellules, est la mieux connue. En transplantation, la tolérance fait référence à un état d'immunoquiescence sélectif à l'égard des antigènes d'un donneur.

Dans un contexte expérimental, on s'assurera, avant de parler de tolérance, de la réunion d'au moins 3 critères (Newell, 2011):

- (1) que le greffon maintient une *fonction* normale suffisamment longtemps après l'arrêt de toute immunosuppression,
  - (2) *in vitro*, que la suppression des réponses immunologiques s'exerce *spécifiquement* à l'égard du donneur,
  - (3) que le greffon conserve une *histologie* normale longtemps après l'arrêt de toute immunosuppression,
- dernier critère souvent ajouté - que le receveur tolérant accepte un *second greffon* du même donneur mais rejette le greffon d'un donneur tiers.



Sur base de ces critères on a pu montrer que l'un ou l'autre écart à l'activation normale des lymphocytes T engendrait de la tolérance aux greffons dans plusieurs modèles expérimentaux.

### **Mécanismes fondamentaux de la tolérance immunologique**

On distingue traditionnellement les mécanismes centraux (ayant siège dans les organes lymphoïdes primaires) des mécanismes périphériques (organes lymphoïdes secondaires et tissus périphériques).

**La tolérance centrale** fait référence au(x) processus de sélection des lymphocytes T et B immatures au sein des organes lymphoïdes génératifs ou primaires.

- La sélection des lymphocytes T s'opère au niveau du thymus durant la période néonatale. Comme nous l'avons vu plus haut (1.2.2), il s'agit d'une sélection double au cours de laquelle les lymphocytes reconnaissant un peptide sur une molécule HLA du soi sont conservés (sélection positive) puis ceux reconnaissant un tel complexe avec une forte affinité (autoréactifs) sont éliminés (sélection négative). Certains lymphocytes T autoréactifs, au lieu d'être éliminés, survivent sous la forme de cellules T régulatrices qui migrent dans les tissus périphériques.

Concernant les cellules T, la tolérance centrale recouvre donc deux phénomènes, d'une part une tolérance *délétionnelle* et d'autre part la production de *cellules régulatrices* dites naturelles. Nous reviendrons à ces cellules un peu plus bas. Notons déjà que d'autres types de cellules régulatrices (dites *adaptatives*) peuvent se former dans les organes lymphoïdes périphériques.

- Les lymphocytes B immatures font eux-aussi l'objet d'une sélection centrale, dans la moelle osseuse, visant à l'élimination des cellules auto-réactives. Celle-ci a peu d'implications en transplantation et nous ne la détaillons pas ici.

## La tolérance périphérique

- **Les lymphocytes T** qui ont réchappé du processus de sélection centrale peuvent encore être l'objet de mécanismes suppresseurs en périphérie. Pour qu'il y ait une quelconque réaction inflammatoire, il faut d'abord, naturellement, que les lymphocytes naïfs soient mis en contact avec leur antigène. Concrètement cela implique qu'il y ait un lieu de rencontre (des structures lymphoïdes intactes) et que les antigènes soient apprêtés sur des molécules HLA. A défaut de remplir ces conditions, on parlera **d'ignorance**. Cependant, ce concept a relativement peu d'implications en transplantation clinique. Une fois un contact établi entre un lymphocyte et un antigène, des écarts au processus normal d'activation peuvent entraîner la disparition réelle (**délétion par apoptose**) ou fonctionnelle (**anergie, exhaustion clonale**) des lymphocytes T dirigés contre cet antigène. Une fois activés, les lymphocytes matures peuvent encore faire l'objet d'une **suppression extrinsèque par des cellules régulatrices**.

- **La délétion et l'exhaustion clonale** sont causées par la carence en signaux de costimulation (interaction B7/CD28) au moment de l'activation du lymphocyte par les complexes HLA-antigènes. En l'absence totale de costimulation les lymphocytes T finissent par mourir faute de cytokines et de synthèse de molécules anti-apoptotiques. Alternativement, en l'absence d'une costimulation suffisante, les molécules B7 en surface des cellules présentatrices d'antigène se lient préférentiellement à des molécules inhibitrices (*Cytotoxic T Lymphocyte-Associated antigen 4* - CTLA-4 ou CD152 et *Programmed [Cell] Death Protein 1* - PD-1) plutôt qu'activatrices (le CD28) en raison de leur plus grande affinité<sup>8</sup>.

- **Des cellules T régulatrices (Tregs)** sont capables d'inhiber l'activation des cellules T naïves ainsi que la fonction des cellules T matures et même d'autres cellules (NK, B, cellules dendritiques ou macrophages). Il existe plusieurs types de cellules T régulatrices (Walsh et al., 2004; Wood et al., 2012). Les cellules **Tregs dites naturelles** sont

---

<sup>8</sup> Molécule inhibitrice prototypique, le CTLA-4, à la surface des lymphocytes T, agit de deux manières: 1° elle capte et dégrade les molécules B7 en surface des cellules présentatrices d'antigènes (mécanisme appelé trans-endocytose) et contribue donc à l'épuisement des signaux de costimulation, 2° elle délivre des signaux inhibiteurs aux cellules T et ces dernières deviennent anergiques.

des cellules autoréactives générées au niveau du thymus comme expliqué plus haut. Elles se caractérisent par une haute expression du CD25 et du facteur de transcription foxP3. Elles exercent leurs propriétés régulatrices sur les cellules T matures via des molécules inhibitrices (tel CTLA-4) et aussi par compétition en s'accaparant l'IL-2 via leurs très nombreux récepteurs. Les cellules **Tregs dites adaptatives** sont générées dans les tissus périphériques, en présence de TGF- $\beta$  ou d'IL-10, au départ de *Tregs* naturelles ou bien de cellules effectrices CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Elles exercent leurs propriétés suppressives via la sécrétion de cytokines inhibitrices (TGF- $\beta$ , IL-10) et expriment peu le CD25. D'autres types de *Tregs* ont été décrits mais ceci sort du cadre de ce travail.

- **Les lymphocytes B** peuvent également faire l'objet d'une désactivation en périphérie. Les lymphocytes qui reconnaissent un antigène sans la coopération d'un lymphocyte T (soit en l'absence de lymphocyte auxiliaire *Tfh* soit en présence d'une cellule régulatrice *Tfr*) peuvent devenir anergiques ou disparaître par apoptose.

Enfin, plusieurs environnements pro-inflammatoires sont susceptibles de donner naissance à des **cellules B régulatrices** (*Bregs*) dotées de propriétés immunosuppressives<sup>9</sup>. Les effets régulateurs de ces cellules s'exercent principalement par l'intermédiaire de la production de cytokines (principalement l'IL-10 et selon les cas l'IL-35 et le TGF- $\beta$ ) mais requièrent parfois un contact avec la cellule cible. Ces effets visent collectivement à réprimer une réponse inflammatoire et s'exercent sur quantités de cellules: en inhibant la différenciation des cellules CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, des cellules Th1 et Th17, de plusieurs monocytes et cellules dendritiques pro-inflammatoires ou encore en favorisant la différenciation de cellules régulatrices T, B ou NK. A la différence des *Tregs* caractérisées par la présence d'un facteur de transcription univoque (Foxp3), on n'a pas encore trouvé à ce jour de marqueur permettant d'isoler sans faille toutes les cellules B régulatrices. Collectivement ces cellules semblent caractérisées par la production d'IL-10 (on parle de *cellules B10*), sans pour autant que cela ne suffise à les déterminer. Plusieurs types tissulaires de lymphocytes B, à plusieurs niveaux de différenciation (immatures, matures et même des plasmoblastes) ont en commun des qualités immunosuppressives. Il a été évoqué que plusieurs environnements

---

<sup>9</sup> Bien que l'inflammation soit critique, la génération de *Bregs* reste antigène spécifique et implique une coactivation de la cellule B via un *Toll-like receptor* et/ou l'engagement du CD40.

cytokiniques permettraient la différenciation des cellules B inflammatoires en Bregs et qu'il ne s'agirait pas d'une lignée commune (Mauri and Ehrenstein, 2008) (Rosser and Mauri, 2015).

### **Succès et écueils des stratégies d'induction de tolérance aux greffons.**

Il existe de multiples manières d'induire une tolérance aux greffes chez les petits rongeurs (voir **Tableau 3**). A ce jour pourtant, une seule approche a permis d'aboutir, de façon intentionnelle et consistante, à une tolérance durable aux greffons rénaux chez les grands primates y compris l'humain. Cette stratégie porte le nom de "chimérisme mixte".

**Tableau 3** - Différentes stratégies ayant permis d'induire de la tolérance aux greffes dans des modèles murins et chez les grands primates (adapté de Sachs. 2003).

<b>Méthodes</b>	<b>Chez les souris</b>	<b>Chez les primates humains et non-humains</b>
<i>"Immunological Enhancement"</i>	+	-
Transfusion donneur-spécifique	+	-
Peptides	+	-
Anticorps monoclonaux anti-MHC	+	-
Inhibiteurs de la calcineurine	+	-
Sérum antilymphocytaire	+	-
Anti-CD24	+	-
Anti-CD25	+	-
Irradiation lymphoïde totale	+	+/-
Toxine Anti-CD3	+	+/-
Bloqueurs de la costimulation	+	+/-
Chimérisme	+	+

Elle consiste à établir, ne fut-ce que transitoirement, un nouveau système immunitaire chez un receveur, hybride entre le sien propre et celui du donneur<sup>10</sup>.

Trois centres ont jusqu'à présent réussi de tels exploits: les universités de Stanford (Scandling et al., 2008), d'Harvard (Kawai et al., 2008) et le Northwestern Memorial Hospital de Chicago (Leventhal et al., 2012). S'ils diffèrent dans leurs modalités opérationnelles (revus dans (Oura et al., 2017)), ces trois programmes ont en commun d'associer, à un moment donné, la greffe de rein à une infusion de cellules hématopoïétiques du même donneur. Chez un donneur conditionné (protocoles myélosuppresseurs sans être myéloablatifs), les deux systèmes immunitaires vont pouvoir coexister brièvement ou plus durablement en donnant naissance à de nouvelles lignées cellulaires au sein de l'hôte. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la tolérance au greffon dans ces protocoles. A court terme le développement de cellules régulatrices joue probablement un rôle; ultérieurement cependant la délétion des cellules alloréactives semble dominer (Andreola et al., 2011; Morris et al., 2015).

Nonobstant leur caractère révolutionnaire, ces résultats n'ont pas pu essaimer au-delà de ces quelques centres ultraspecialisés. Les protocoles utilisés sont encore limités par des conditionnements harassants et dangereux, des taux de réussite moindres qu'en transplantation ordinaire ou encore, pour certaines, par le développement de réponses alloimmunes tardives. A ce jour, seules quelques dizaines de patient.e.s ont bénéficié de ces protocoles.

### **1.3 La tolérance spontanée aux greffons rénaux**

#### **1.3.1 *A propos de cette section***

L'induction de tolérance aux greffons rénaux reste marginale et périlleuse.

Il existe cependant une autre forme de tolérance aux greffons qualifiée soit de "spontanée", soit «d'opérationnelle». De très rares patients greffés rénaux privés de leurs

---

<sup>10</sup> L'appellation, commune dans le langage courant, de "chimère" pourrait laisser penser que le système immunitaire d'un individu A aurait été complètement remplacé par celui d'un individu B. On préfère l'appellation de "chimère mixte", qui signifie que dans le même individu A, coexistent des cellules immunitaires de A et de B.

immunosuppresseurs maintiennent une fonction stable de leur greffon pendant une longue période, sans évidence de rejet. Il s'agit de situations exceptionnelles. En effet, les conséquences de la pénurie, même minime, en immunosuppresseurs sont abondamment documentées (Gaynor et al., 2014; Hricik et al., 2015; Takemoto et al., 2007; Vlamincx et al., 2004) et dramatiques. La non-observance thérapeutique contribue largement aux rejets aigus précoces ou tardifs, aux rejets chroniques et *in fine*, à la perte de 30 à 48% des greffons! (Gaynor et al., 2014; Sellares et al., 2012). En conséquence, les néphrologues découragent fortement tout écart thérapeutique. Il arrive néanmoins que certains patients décident de leur propre chef ou soient contraints d'interrompre leurs immunosuppresseurs pendant une longue période (mais contre toute attente) sans entraîner la perte de leur greffon. Ceci survient le plus souvent dans un contexte de négligence, de difficultés psycho-sociales ou bien de croyances personnelles. D'autres fois, les médecins recommandent l'arrêt des immunosuppresseurs en dernière extrémité dans un contexte oncologique ou infectieux grave.

La tolérance est l'objet de tous les espoirs en transplantation. La compréhension puis la maîtrise de ce phénomène devrait tout à la fois prévenir les pertes de greffons par rejet et éviter les conséquences d'une immunosuppression non ciblée et au long cours telles que la néphrotoxicité, le diabète, les infections, les néoplasies, ...).

Dans cette section, nous donnons un aperçu global des connaissances actuelles sur ce phénotype étrange et terminons sur les questions non résolues. Ce chapitre est volontairement bref pour ne pas alourdir inutilement la lecture de cette thèse et a pour ambition de permettre au lecteur non averti de suivre le reste d' l'exposé. Nous invitons courtoisement le lecteur ou la lectrice qui souhaiterait en savoir davantage sur la présentation clinique de la tolérance, ses biomarqueurs et/ou ses mécanismes à lire notre revue sur la question (Massart et al., 2017), annexée à la présente thèse (Annexe I, page 53).

### 1.3.2 *Principales données issues de la recherche sur la tolérance spontanée aux greffons rénaux.*

#### **Enseignements des études cliniques**

1) Faute de biomarqueur fiable, la tolérance clinique est généralement définie prosaïquement comme ***la conservation d'une bonne fonction rénale en l'absence d'immunosuppresseurs pendant une durée minimale de 1 an.***

2) Au moment de débiter cette thèse, moins de 250 cas semblaient avoir été répertoriés. La prévalence réelle de la tolérance est inconnue.

3) On n'a pas mis en évidence de caractéristique démographique ou clinique uniciste (profil immunologique, immunosuppresseurs, ...) permettant d'expliquer pourquoi une infime minorité de patients greffés rénaux peut se passer d'immunosuppresseurs.

4) Un antécédent de rejet ou une immunisation anti-HLA (préalable à la greffe ou de novo) sont compatibles avec la tolérance opérationnelle aussi longtemps qu'ils ne s'avèrent pas nuisibles au greffon. Ces observations sont relativement communes.

5) Les patients tolérants semblent présenter une immunoquiescence ciblée dirigée exclusivement à l'endroit du greffon et ne pas souffrir d'un déficit immunitaire global.

6) La tolérance est une condition métastable. Elle peut perdurer d'un an à plusieurs dizaines d'années et disparaître sans raison claire.

#### **Enseignements des études sur les biomarqueurs**

7) Les patients tolérants présentent des altérations de leur répertoire lymphocytaire B sanguin avec davantage de formes immatures (naïves, transitionnelles) et moins de formes différenciées (plasmoblastes) que leurs corolaires sous immunosuppression.

8) Les patients tolérants présentent un nombre accru de lymphocytes T régulateurs (site spécifique du gène Foxp3 déméthylé) et en particulier les formes mémoires, par comparaison avec des sujets sains ou transplantés.

9) La majorité des signatures transcriptomiques sanguines de la tolérance aux greffons rénaux montrent un accroissement des transcrits caractéristiques des cellules B naïves.

10) Plusieurs autres études immunophénotypiques et transcriptomiques semblent également incriminer des réseaux cellulaires complexes impliquant non seulement les cellules T et B mais aussi des cellules NK, des cellules dendritiques et autres monocytes.

### **Enseignements de type mécanistique**

11) Le répertoire alloréactif des patients tolérants est remodelé à l'avantage des cellules (B et T) régulatrices. Ces dernières possèdent un phénotype inhibiteur (CD1, CD5 / CTLA4; sécrétion d'IL-10, TGF- $\beta$ , IL-21) et possèdent des propriétés suppressives.

12) Dans des expérimentations *trans-vivo*<sup>11</sup>, le transfert de cellules T régulatrices adaptatives issues de patients tolérants permet d'induire, en présence des antigènes du greffon, une tolérance croisée à l'égard d'antigènes immunogéniques.

### **1.3.3 Une compréhension très parcellaire**

Les mécanismes à l'origine de la tolérance ou permettant son maintien sont mal connus. L'ensemble des travaux résumés plus haut a permis de comprendre plusieurs des mécanismes élémentaires qui opèrent chez dans les patients tolérants rénaux.

En résumé, la tolérance spontanée aux greffons rénaux:

1. Est une condition spécifique et vraisemblablement acquise.
2. Ne semble pouvoir être obtenue chez l'humain qu'à la faveur d'une compilation de plusieurs mécanismes élémentaires.

---

<sup>11</sup> Transfert de cellules humaines dans un petit animal généralement immunodéprimé.



3. Implique une grande variété de populations cellulaires (B, T et sans doute cellules dendritiques et NK) au sein desquelles les cellules régulatrices l'emportent sur les cellules effectrices.
4. En conséquence, la tolérance spontanée semble dominée par des mécanismes de nature régulatrice.

Si plusieurs pièces du puzzle ont pu être déchiffrées, l'énigme centrale aujourd'hui réside dans la compréhension des mécanismes qui déclenchent *ab initio* la mise en place d'équilibres immunologiques alternatifs où la régulation l'emporte sur l'inflammation en réponse à des antigènes de transplantation.

Il est frappant de constater le peu de différences, à la base, entre un greffé rénal lambda et un autre qui développera de la tolérance. La compréhension des facteurs individuels qui rendent possible l'avènement de la tolérance constitue le cœur de cet ouvrage.

## 1.4 Motivation de notre thèse

### 1.4.1 *A propos de cette section*

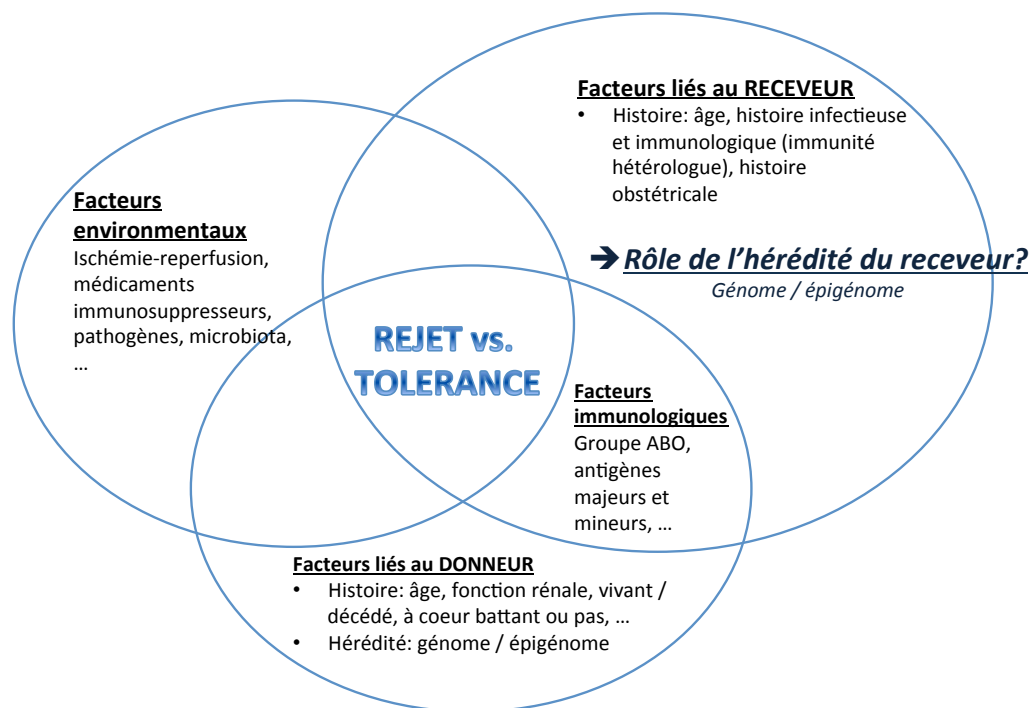
A l'instar des réponses immunitaires aux infections, chaque réponse alloimmune représente une interaction complexe, singulière, entre un receveur, un greffon et un environnement donnés à une période donnée, comme schématisé dans la **Figure 2**. L'existence de disparités génétiques entre le donneur et le receveur constitue la base même des réactions alloimmunes - elles ont été détaillées dans les sections précédentes. L'impact des facteurs environnementaux, au premier rang desquels les médicaments immunosuppresseurs, est évident également. En revanche, la capacité des facteurs héréditaires propres au donneur et au receveur, pris isolément, à peser sur l'issue de la réaction allo-immune reste largement méconnue.

Le présent travail porte spécifiquement sur le déchiffrement du rôle de l'hérédité du *receveur* dans la survenue éventuelle de tolérance. Non pas que, selon nous, l'étude du

polymorphisme génétique des donneurs ou bien les interactions donneurs - receveurs au-delà du système HLA soient non-relevantes. Simplement nous pensons qu'elles doivent faire l'objet de travaux et d'une méthodologie distinctes, et ces travaux ont d'ailleurs débuté (Mesnard et al., 2016; Pineda et al., 2017).

L'étude que nous entreprenons sur les prédispositions génétiques à la tolérance opérationnelle entend tirer profit d'un matériel biologique rare mais accessible, provenant des receveurs, et de technologies nouvelles qui pour la première fois nous permettent de penser que nous pouvons la tirer au clair.

**Figure 2** - Le rejet et la tolérance au croisement d'influences.



Légende: la capacité des facteurs héréditaires du donneur et du receveur, considérés isolément, à changer le cours des réactions allo-immunes demeure largement inconnue à ce jour. Cet ouvrage porte sur la génétique des receveurs.

Dans cette section, nous présentons successivement l'état des connaissances quant à l'impact des caractéristiques individuelles sur la survenue des rejets (1.4.2) et les développements génétiques récents qui pourraient changer la donne (1.4.3). Ceci nous mènera à la section (1.5) dans laquelle nous détaillerons le but de ce travail.

#### 1.4.2 *Place de l'hérédité dans les réponses alloimmunes*

**Plusieurs types de données permettent de soutenir la thèse d'une contribution significative de l'hérédité du receveur à la survenue des rejets aigus.** De façon anecdotique d'abord, des données issues de l'état de l'Utah - où les études généalogiques sont très répandues pour des motifs spirituels - supportent l'idée que certaines ancestralités favorisent le rejet aigu (Goldfarb-Rumyantzev et al., 2009). De façon similaire, des expérimentations chez le cochon supportent l'idée que des mutations, au sein de gènes non encore identifiés, peuvent bloquer l'établissement d'une tolérance aux allogreffes autrement éprouvée (Lee et al., 2014). Chez les humains, Sarwal et collègues ont relevé la profonde hétérogénéité des profils d'expression génique au sein de biopsies rénales montrant des rejets aigus pourtant indiscernables histologiquement (Sarwal et al., 2003). La plausibilité d'une contribution génétique au rejet et/ou à la tolérance en transplantation paraît plausible sinon probable. Il nous paraît cependant important de notifier que, à la différence des maladies, la transplantation, condition jeune et artificielle, fournit en réalité peu d'exemples de pedigrees resserrés qui permettraient de spéculer sur le type d'hérédité supposément incriminée dans la tolérance ou le rejet. Toutes les hypothèses (transmission autosomale/liée à l'X, dominante/récessive, multigénique, ...) paraissent encore ouvertes.

**Plusieurs dizaines d'études ont, en vain, cherché des associations consistantes entre rejet aigu et tel ou tel polymorphisme génétique tant du donneur (greffon) que du receveur.** La plupart des gènes candidats étudiés codaient pour des cytokines. On a là un matériel relativement abondant mais contradictoire et non concluant, avec souvent autant d'études qui plaident pour une association génétique que d'études qui ne montrent rien et ce pour les mêmes polymorphismes. La faiblesse globale de cette littérature est liée à la multitude d'études de petites tailles, rarement validées dans des cohortes externes; à la pauvreté des définitions phénotypiques en ce compris parfois l'absence de preuve biopsique de rejet; à l'hétérogénéité ethnique des populations étudiées ou encore à des erreurs méthodologiques comme l'absence de calcul de puissance adéquate ou de correction statistique pour hypothèses multiples (Almoguera et al., 2014; Goldfarb-Rumyantzev and Naiman, 2010). Le seul fait de répéter ces études à l'envie, augmente naturellement les chances de tomber par hasard sur une association dès lors fortuite. Il

est même arrivé qu'on publie dans des journaux prestigieux des résultats non reproductibles (Brown et al., 2006; Varagunam et al., 2009).

**Selon nous, il n'existait au moment d'écrire cet ouvrage qu'une seule étude portant sur la recherche de déterminants génétiques associés à la tolérance** (Danger et al., 2012b). En l'occurrence, Danger et collègues ont recherché si des polymorphismes génétiques fréquents (les *SNPs* pour *Single Nucleotide Polymorphisms*) pouvaient rendre compte des différences d'expression génique observées dans leur étude antérieure comparant patients tolérants, patients en rejet chronique et sujets sains (Brouard et al., 2007). Parmi les 1152 *SNPs* testés, représentant 49 gènes, aucun n'a atteint le seuil de signification statistique requis pour être retenu définitivement. Notons que l'étude incluait plus de cent contrôles mais seulement 11 patients tolérants. Le gène *PARVG* (*Gamma-Parvin*) se détachait cependant comme celui dont l'expression était la plus influencée (18%) par plusieurs des *SNPs* testés. La protéine PARVG se lie à l'actine et intervient notamment dans les processus de remodelage du cytosquelette et d'adhésion cellulaire. Les patients tolérants exprimaient davantage la combinaison de *SNPs* (haplotype) associée à une expression réduite de PARVG que les sujets contrôles greffés (60 versus 28%,  $p = 0,068$ ). A ce jour et en l'attente d'une éventuelle validation, la signification de cette découverte n'est pas claire.

### 1.4.3 *Développements génétiques récents*

**Plusieurs méthodes de séquençage permettent désormais l'exploration non-biaisée du génome entier. Ces avancées récentes bouleversent les perspectives.** Moyennant l'utilisation de la méthodologie appropriée, on peut désormais comparer des cas, porteurs d'un trait donné, à des contrôles à l'échelle du génome entier et espérer ainsi mettre en évidence les éventuels variants pertinents pour le trait donné *sans s'être limité à quelques hypothèses mécanistiques préalables*

Les études "génomiques-entières" présentent plusieurs avantages. Par comparaison aux études "gènes candidats", les approches pangénomiques permettent d'identifier des gènes dont le rôle dans le phénotype étudié était jusque-là totalement insoupçonné. En soi, ces études ouvrent la voie à d'authentiques découvertes mécanistiques (Manolio,

2010). Par comparaison avec les études d'expression génique cette fois, qui reflètent un accomplissement à un moment  $t$ , les études génétiques laissent entrevoir la possibilité d'approcher sans ambiguïté des mécanismes primaires, causaux.

### **Il existe actuellement deux types d'explorations pangénomiques.**

1° Les études pangénomiques d'association, ciblées sur un nombre défini de variants fréquents de type *SNPs*, ou **GWAS pour "Genome-Wide Association Study"** exploitent la technologie des puces à ADN pour génotyper en une seule opération plusieurs centaines de milliers de *SNPs* représentatifs de tout le génome. Ceci est possible parce que de nombreux *SNPs*, souvent proches les uns des autres, ont tendance à être transmis en bloc d'une génération à l'autre. On parle de *blocs haplotypiques* ou tout simplement d'*haplotypes*. La connaissance de l'un ou l'autre *SNPs* dit *tags* permet d'inférer raisonnablement sur les *SNPs* du voisinage

2° Le séquençage "direct" de tout le génome - **"Whole Genome Sequencing" (WGS)** - ou son succédané, le séquençage de l'exome - **"Whole Exome Sequencing" (WES)** - sont désormais possibles grâce au déploiement des séquenceurs à haut débit dits de seconde génération (confer section 1.6).

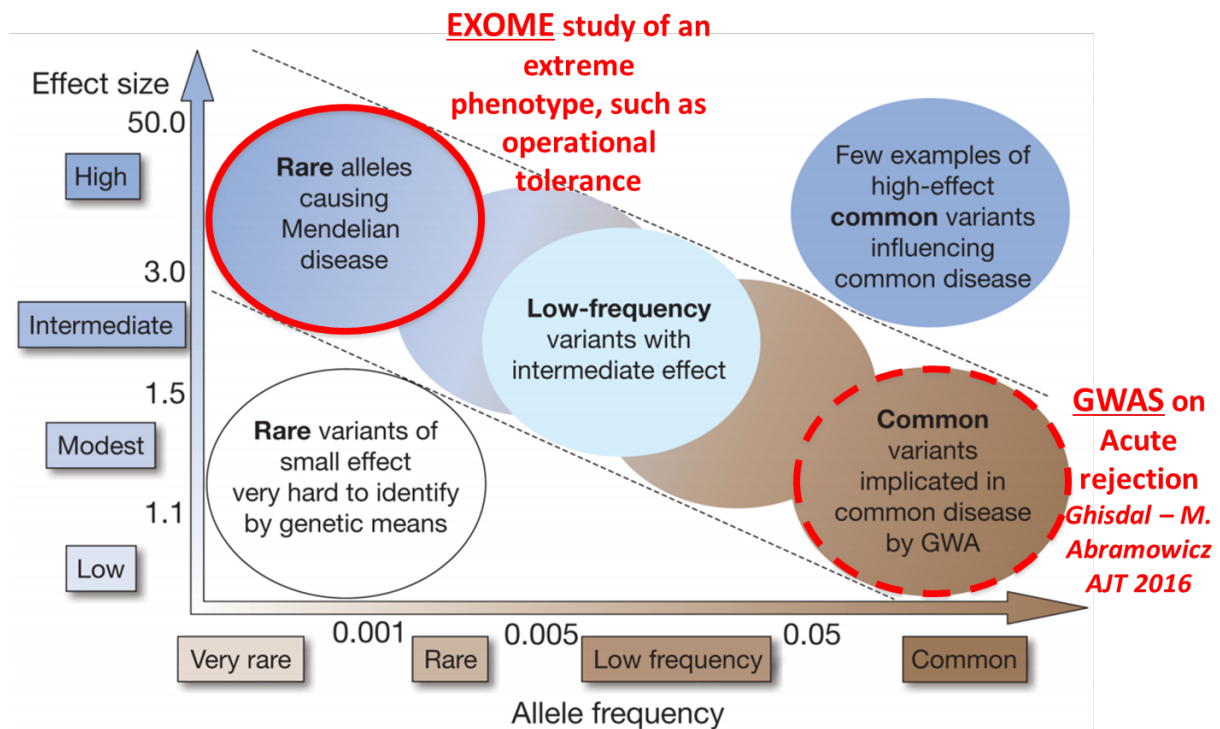
### **Champs d'applications des méthodes d'exploration pangénomiques.**

En pratique, le choix entre *GWAS* et *WGS* / *WES* s'opérera sur base de critères budgétaires mais aussi en fonction de l'architecture génétique supposée du trait étudié.

Le séquençage direct permet d'appréhender l'ensemble des variants de séquence génomique, qu'ils soient fréquents ou très rares. Cependant, le coût-patient du séquençage du génome reste prohibitif. Ainsi, les *GWAS* offrent la possibilité de se limiter à l'étude des polymorphismes communs pour un coût plus abordable. Il faut cependant noter que la toute grande majorité des variations communes du génome humain - c'est-à-dire celles explorées par les *GWAS* - sont introniques ou intergéniques, c'est-à-dire non codantes, et généralement sans conséquence majeure sur le phénotype des patients (Manolio, 2010). Dès lors, les *GWAS* seront utiles dans le cas de maladies complexes (multigéniques et/ou multifactorielles) où une accumulation de contributions génétiques ancestrales semblent

influencer le phénotype mais peu pertinentes en cas de variants très pénétrants<sup>12</sup> et de phénotypes retentissants. Le séquençage direct du génome, incluant obligatoirement les régions codantes du génome, demeure indispensable si l'on soupçonne des variants rares et hautement délétères d'être directement à l'origine du phénotype observé (maladies monogéniques pénétrantes). Ces raisonnements généraux sont illustrés en **Figure 3**. Ci-dessous, nous décrivons plus en détails ces deux méthodologies dites "génomique-entière" et en filigrane, suggérons comment les mettre à profit dans le contexte particulier de la transplantation rénale.

**Figure 3** - Place des différentes méthodes d'exploration pangénomique



**Légende:** possibles méthodes d'exploration pangénomique selon la fréquence et l'impact présumé des variants recherchés. En rouge; application à la transplantation rénale (adapté de Manolio et al. 2009).

<sup>12</sup> La notion de pénétrance fait référence à la proportion des sujets porteurs d'un génotype qui exprimeront le phénotype associé. Un génotype ou un variant sont dits hautement pénétrants lorsque virtuellement tous les sujets qui en sont porteurs développent le phénotype associé le moment venu. Les génotypes ou les variants peu pénétrants sont transmis à la descendance mais plus rarement le phénotype (par exemple par ce que, outre le génotype, d'autres conditions génétiques ou environnementales doivent être réunies pour que la maladie se développe).

- **En cas de trait fréquent et, en apparence, multifactoriel (comme le *rejet aigu*) on recherchera prioritairement une association entre le phénotype et des variants communs d'impact faible à modéré.** En fait, comme on l'a dit plus haut, la plupart des variants communs sont peu délétères, raison pour laquelle, pense-t-on, ils ont pu prendre souche dans les populations humaines concernées. Dès lors, pour rendre compte des phénotypes observés, il a été proposé que des combinaisons de variants communs<sup>13</sup> - sans qu'aucun pris isolément ne soit ni nécessaire ni suffisant - présidaient au développement des maladies complexes les plus répandues. Dès lors que l'on se limite à examiner une population ayant une large base d'ancestralité commune (par exemple, les "*européens*"), cela revient à se demander si pour un trait complexe donné, il existe des variants précis (ils sont identiques puisque partagés par ancestralité) qui ségréguent avec le phénotype et en constituent le terreau. Cette hypothèse, vulgarisée sous le nom anglais de "*common disease - common variant ou CD-CV*" est à la base des études pangénomiques d'association ou encore "**GWAS**".
- **En pratique,** jusqu'à un million de polymorphismes génétiques communs répartis dans tout le génome sont génotypés simultanément grâce une méthode de capture par hybridation sur puce à ADN (*microarray*). L'opération est réalisée pour les cas et les contrôles séparément de façon à établir puis à comparer la fréquence de ces polymorphismes dans les deux groupes. Plusieurs milliers d'individus par groupe sont généralement requis pour atteindre la puissance statistique utile compte-tenu du nombre élevé de comparaisons effectuées. Les polymorphismes dont la fréquence dans un groupe s'écarte significativement de celle de l'autre groupe (après corrections diverses) ont de fortes chances d'être soit directement associés au phénotype soit en déséquilibre de liaison avec le véritable variant génétique causal. Les *GWAS* permettent ainsi d'identifier les régions génétiques ou *loci* critiques pour un phénotype mais pas forcément les mutations responsables. Une analyse plus fine des *SNPs* présents

---

<sup>13</sup> Par variants *communs*, on entend les variants dont la fréquence allélique est > 5%; par variants de *basse fréquence* ceux dont la fréquence est comprise entre 1 et 5% et enfin par variants *rare*s ceux dont la fréquence n'atteint pas le pourcent.

aux abords du marqueur (*fine mapping*) et un séquençage ciblé des régions détectées par *GWAS* sont souvent nécessaires<sup>14</sup> pour identifier le variant opérant.

- **Les *GWAS* positives débouchent rarement sur la découverte de variants cliniquement pertinents.** En 2009, l'*odds ratio* médian des *SNPs* ayant été associés à des traits était de 1,33 par allèle, ce qui représente une augmentation de risque peu significative en particulier s'il on considère des maladies de faible prévalence. Jusqu'ici, les *GWAS* ont donc peu contribué à déchiffrer les prédispositions individuelles. Ceci est une conséquence directe des régions génomiques explorées (voir ci-dessus) L'intérêt des *GWAS* est ailleurs et réside plutôt dans leur capacité à mettre en lumière les voies métaboliques impliquées dans le développement des désordres étudiés, et ce parfois de façon tout à fait inattendue. Des *GWAS* ont permis, des avancées remarquables dans la compréhension, entre autres, de la maladie de Crohn et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.
- **En cas de trait rare (comme la *tolérance rénale*), possiblement monogénique et dû à une mutation à haute pénétrance on cherchera en premier lieu un ou plusieurs variants rares et codants.** Outre l'aspect de fréquence, les variants rares apparaissent comme particulièrement intéressants car bien plus souvent délétères, ces derniers étant maintenus à une fréquence allélique basse par pression de sélection négative (Genomes Project et al., 2010). Par définition, les variants rares ne sauraient faire l'objet d'une capture sur une puce à ADN préconçue et dès lors, le séquençage direct s'impose. Longtemps la perspective de séquencer le génome entier (*WGS pour Whole-Genome Sequencing*) est restée irréaliste et coûteuse. Intelligemment, la priorité a été donnée à la capture et au séquençage à haut débit des seules séquences codantes du génome car les variants qui altèrent les structures protéiques ont bien plus souvent des conséquences cliniques marquées. Ainsi les variants exoniques, quoique plus rares que les variants introniques car soumis à une pression de sélection négative

---

<sup>14</sup> Ceci confirme que, s'il n'y avait les aspects financiers, le séquençage direct du génome entier serait préférable aux *GWAS* du fait que premièrement; il identifie les variants fréquents et rares, deuxièmement; il met en valeur les variants pertinents sans spéculation ni procédure fastidieuse, donc avec plus de sûreté. Il est suspecté, mais cela sort du cadre de la présente thèse, que les traits communs sont expliqués non seulement par des variants génétiques fréquents mais aussi par un excès de variants rares (pris individuellement) dans les mêmes gènes.



intense, expliquent à eux-seuls la toute grande majorité des maladies mendéliennes (Botstein and Risch, 2003). Par maladie "mendélienne" on entend "une maladie transmise au sein des familles sur un mode autosomique dominant, autosomique récessif ou lié au chromosome X) et typiquement contrôlée par des variants de large impact situés dans un seul gène" (Cirulli and Goldstein, 2010). Les séquences codantes de l'ADN sont entièrement comprises dans les exons, encore appelés collectivement "*exome*" et représentent un peu moins de 2% du génome humain. La capture et le séquençage de l'exome entier porte le nom anglais de "**WES**" pour *Whole-Exome Sequencing*. Des explications techniques sont disponibles en section 1.6.

Notre groupe a réalisé la première et à ce jour la seule *GWAS* validée dans le domaine du rejet aigu. Nous la présentons dans le chapitre 3.

Par ailleurs, nous exposerons les résultats d'une étude portant sur la comparaison de patients tolérants et de contrôles à l'échelle de l'exome entier (chapitre 3). Cette stratégie porte aussi le nom anglais de "**EWAS**" pour "*Exome-Wide Association Study*".

A notre connaissance il s'agit de la première exploration génétique globale *sans a priori* ayant jamais été entreprise dans le contexte de la tolérance opérationnelle.

## 1.5 NOTRE THÈSE

Les patients spontanément tolérants constituent à ce jour des aberrations dans le paysage de la transplantation rénale.

En pathologie humaine, les extrêmes phénotypiques ont fréquemment des causes génétiques et même monogéniques. Les variants génomiques impliqués se situent habituellement dans les régions du génome codant pour des protéines, donc au sein des séquences exoniques du génome. Les variants exoniques sont également très pénétrants, c'est-à-dire qu'ils donnent lieu à un phénotype dans la majorité des cas.

En guise d'illustration, plus de 85% des maladies mendéliennes trouvent leur origine dans les régions exoniques du génome (Botstein and Risch, 2003). Mais, au-delà des maladies monogéniques, il est commun que des variants exoniques contribuent à expliquer les présentations inhabituelles de maladies communes et parfois très peu héréditaires. Ceci a par exemple été joliment démontré dans le cas des patients présentant des valeurs biologiques extrêmes de lipides sanguins (Cohen et al., 2004; Johansen et al., 2010), la survenue anormalement précoce d'une infection par pyocyanique en cas de mucoviscidose (Emond et al., 2015a; Emond et al., 2012) ou encore celle d'un infarctus du myocarde à un jeune âge (Do et al., 2015).

Comme d'autres l'ont écrit avant nous, la causalité génétique est *partout et tout le temps* présente en biologie, en fait, elle détermine "en creux", les bornes des nombreux possibles phénotypiques (Morange, 2003). Il nous paraît dès lors légitime de penser, qu'une fois encore, une présentation phénotypique extrême, nonobstant son caractère multifactoriel, soit causée par l'une ou l'autre mutation génomique hautement pénétrante.

Dès lors, nous émettons l'hypothèse que:

***Les greffés rénaux spontanément tolérants se distinguent dans leur ensemble du reste de la population par un excès de variants à haute pénétrance localisés dans les exons de gènes jouant un rôle critique dans le développement de la dite tolérance.***

Identifier de tels gènes pourrait avoir d'importantes retombées en transplantation: détecter les patients devant recevoir moins d'immunosuppression, développer des biomarqueurs qui permettront de tester des stratégies d'induction de tolérance, identifier directement des cibles thérapeutiques pour induire de la tolérance aux greffes... Mais également en dehors du contexte artificiel de la transplantation, dans d'autres disciplines intéressées à la reconnaissance antigénique (oncologie, auto-immunité, allergologie, infectiologie, ...)

La section suivante présente plus amplement les outils de séquençage modernes: elle est destinée à familiariser les lecteurs et lectrices novices aux concepts, techniques et terminologie propres à cette jeune discipline. Ceux et celles qui le souhaitent peuvent se rendre

directement au chapitre 2 1 (page 55) où nous nous attachons à montrer comment nous avons établi une cohorte de patients tolérants et par quelle méthode, établie sur-mesure, nous escomptons vérifier notre thèse.

## **1.6 Bases générales du séquençage à haut débit et de l'analyse bioinformatique des données génomiques**

### **1.6.1 A propos de cette section**

En premier lieu nous expliquons comment il est désormais possible de déchiffrer la séquence nucléotidique du génome entier en quelques jours seulement, ce qui était encore récemment inimaginable et pourquoi, en dépit de ces possibilités pantagruéliques, les régions exoniques continuent à focaliser toute l'attention (0). Déchiffrer des milliards de paires de bases devient commode mais réclame des ressources bioinformatiques considérables. D'une part il faut stocker les données génomiques (150 à 500 GB pour un génome entier) dans de coûteuses "*fermes de calcul*" (*computer clusters*), d'autre part il faut traiter ces torrents de données en réduisant le temps/ unité. Des algorithmes sophistiqués sont nécessaires à chaque étape pour traiter les données en parallèle mais également des ingénieurs et des bioinformaticiens pour les développer et les exploiter. Enfin, un taux d'erreurs de l'ordre du pourcent, qui aurait pu paraître modeste il y a dix ans, se transforme en une gageure de plusieurs dizaines de millions d'erreurs à l'échelle du génome humain (3 milliards de bases).

Dans la section suivante, nous exposons, étape par étape, le traitement bioinformatique nécessaire pour passer des séquences nucléotidiques à l'énumération, la plus fiable possible, de l'ensemble des variants nucléotidiques individuels ou "*variome*" (1.6.3). Enfin, nous montrons comment des comparaisons judicieuses entre variomes permettent d'élucider les causes génétiques des traits héréditaires (1.6.4).

## 1.6.2 Développement et principes du séquençage à haut débit

### Evolution des techniques de séquençage

Le séquençage d'ADN vise à établir la succession précise des nucléotides au sein des molécules d'ADN. Mise au point en 1977, le séquençage par la méthode de Sanger ("*first generation*") est resté pendant plus de 25 ans la référence en la matière. Son principe est basé sur le déchiffrement par synthèse, c'est-à-dire que la séquence du brin étudié est déduite de l'incorporation de nucléotides dans un nouveau brin d'ADN complémentaire en construction. Cette synthèse s'effectue en présence de concentrations choisies de nucléotides et de nucléotides modifiés (les ddNTPs, plus de détails en **Figure 4**, page 38.) de sorte que ces derniers empêchent régulièrement l'élongation des brins d'ADN. Il en résulte des molécules d'ADN de tailles variées qui peuvent ensuite être triées sur base de leur charge<sup>15</sup> et moyennant des fluorochromes spécifiques, la séquence du brin modèle est déduite facilement. Cette méthode permet de séquencer de 700 à 900 bases par capillaire, un séquenceur automatisé pouvant en compter 96. Cette méthode a permis le premier déchiffrement d'un génome humain, soit 3,2 milliards de paires de bases (*pb*), au bout de 11 ans d'efforts collectifs intenses (McPherson et al., 2001).

Les années 2000 ont vu le développement de la seconde génération de séquenceurs ("*next generation*", "*à haut débit*"), immensément plus performants et accessibles, permettant le séquençage simultané ou "*en parallèle*" d'une dizaine de milliards de petits fragments d'ADN (de quelques dizaines à quelques centaines de pb chacun) en seulement quelques jours (Metzker, 2010). En revanche, la fragmentation des molécules d'ADN introduit une nouvelle étape de réassemblage du génome que nous détaillerons par la suite.

Il existe en réalité différentes méthodes de séquençage à haut débit. Ci-dessous nous nous intéressons tout particulièrement aux méthodes appliquées sur les plateformes ILLUMINA<sup>®</sup>, les plus vendues dans le monde et également celles utilisées dans ce travail.

---

<sup>15</sup> Dans les molécules d'ADN, le rapport charge sur taille (en paires de bases) est constant.

## Le séquençage à haut débit par synthèse

Il repose en général sur 2 étapes-clés (Metzker, 2010).

1) La préparation de la **librairie**, c'est-à-dire la sélection et l'apprêtement des molécules d'ADN à séquencer. Cette étape vise d'abord à obtenir un échantillon représentatif et non biaisé du génome sous investigation. Ensuite; à apprêter les fragments d'ADN (*inserts*) à l'aide d'adaptateurs universels (séquences nucléotidiques) qui permettront tout à la fois de les immobiliser sur un support et de séquencer tous les différents fragments d'ADN au départ d'un seul jeu d'amorces. Chez ILLUMINA<sup>®</sup>, 100 à 200 millions de fragments sont fixés sur une plaque de verre avant d'être amplifiés spécifiquement et localement (*clusters* ou *clones*). L'amplification clonale a pour but de rendre détectable, ultérieurement, l'ajout de nouveaux nucléotides à l'extrémité des brins d'ADN en formation.

2) La phase de **séquençage** à proprement parler: les centaines de millions de fragments d'ADN fixés et amplifiés servent de modèles pour la synthèse de brins d'ADN complémentaires au départ de nucléotides marqués. Un jeu de laser complexe permet de détecter les incorporations successives de nucléotides marqués et d'établir la séquence des centaines de millions de brins d'ADN modèles. Chaque *cluster* est à l'origine d'une séquence ou "*read*". Selon le mode de préparation de la librairie, il est possible de produire pendant la même opération des séquences sens et antisens des mêmes fragments (*séquençage en paires* ou "*paired ended*"), ce qui facilitera ultérieurement la détection des erreurs.

Ces deux étapes sont illustrées en **Figure 4**.

## Séquençage ciblé

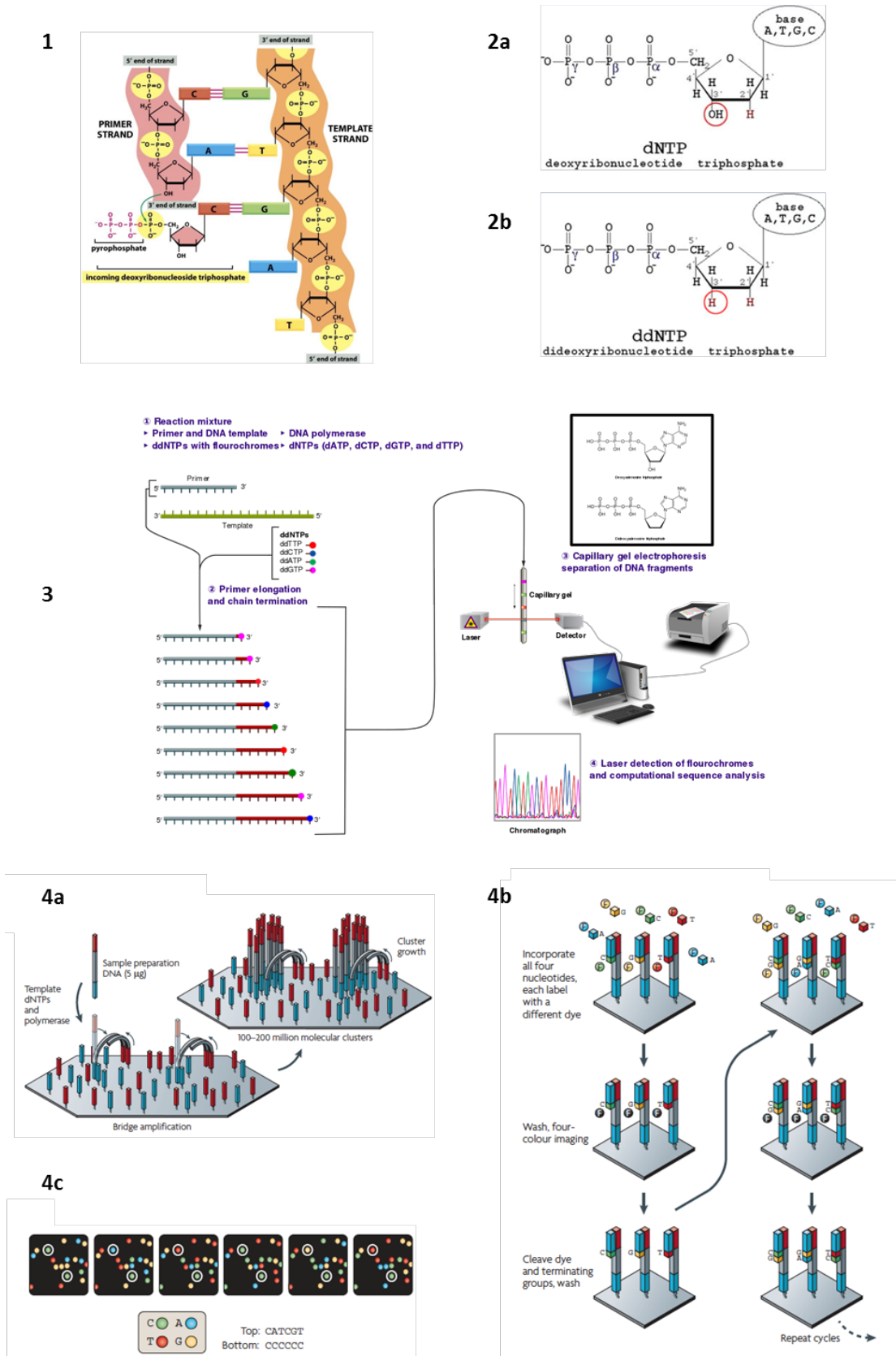
En dépit des capacités formidables décrites plus haut, le séquençage reste une entreprise coûteuse<sup>16</sup>. Il peut être intéressant de restreindre le séquençage à une région d'intérêt comme un panel des gènes possiblement impliqués (*gene panel*) ou, en recherche, lorsque le gène coupable est inconnu, à "*l'exome*".

Le terme "*exome*" fait référence à l'ensemble des exons, soient les régions des gènes qui après transcription et épissage donneront naissance aux ARN matures. L'exome contient l'ensemble des séquences génomiques qui codent pour des protéines sans s'y limiter.

---

<sup>16</sup> Pour la première fois en 2014, le coût expérimental du séquençage d'un génome humain en entier a baissé jusqu'à 1.000 dollars US (Hayden. Nature 2014).

**Figure 4** - Bases générales du séquençage d'ADN: méthode Sanger et synthèse à haut débit selon ILLUMINA®.



---

### Légende :

(1) Molécule d'ADN simple brin (à droite) et amorce nucléotidique (à gauche). L'ADN est un polymère de nucléotides lesquels sont composés d'une base azotée (adénine/A, thymine/T, guanine/G ou cytosine/C), d'un sucre (2'désoxyribose, pentagone) et d'un groupement phosphate (cercle jaune). L'enzyme ADN polymérase (non représentée) peut exclusivement ajouter un nouveau nucléotide à l'extrémité 3' d'un brin d'ADN. Le processus libère un groupement pyrophosphate (lettres roses) et crée un lien phosphodiester. Les bases sont faiblement reliées entre elles par des ponts hydrogènes (traits).

(2) dNTP: 2' désoxynucléotide (a) et ddNTP: 2'3' didésoxynucléotide (b). Le remplacement du groupement hydroxyle en position 3' par un atome d'hydrogène empêche irréversiblement la poursuite de la synthèse d'ADN et constitue la base du séquençage Sanger. Plusieurs méthodes de séquençage à haut débit se basent sur l'utilisation de terminateurs réversibles (non montrés - ex. ajout d'un radical 3'-O-azidométhyl chez ILLUMINA©) pour bloquer l'élongation de l'ADN. Dans chacune de ces méthodes, des fluorochromes spécifiques sont fixés sur les différentes bases pour en assurer la détection.

(3) Dans la méthode de Sanger, des quantités précises de dNTPs et ddNTPs marqués (fluorochromes), sont mis en présence de l'ADN à séquencer (en vert), d'amorces spécifiques (en gris) et d'ADN polymérase (a). L'élongation de l'ADN est régulièrement stoppée par des ddNTPs, aboutissant à des fragments de toutes tailles, marqués eux aussi (b). L'électrophorèse de ces différents fragments dans un capillaire unique, puis la lecture du gel d'électrophorèse par un laser ad hoc permettent d'établir la séquence de nucléotides au sein de l'ADN modèle (c). Rendu traditionnel sous forme de chromatogramme (d).

(4) Méthode de séquençage à haut débit par synthèse selon ILLUMINA©

(a) Préparation des échantillons: établissement d'une librairie et amplification clonale. Un à plusieurs microgrammes du génome à étudier sont fragmentés aléatoirement, mécaniquement (ex. sonication, nébulisation) ou enzymatiquement (ex. tagmentase) en molécules de quelques dizaines à 300 pb selon les protocoles, représentant toutes les régions du génome à analyser (non montré). Les fragments sont assortis à leurs extrémités, d'adaptateurs universels, en fait des amorces nucléotidiques, et répartis sur un support en verre, saturé en amorces complémentaires. En présence de dNTPs (non marqués) et d'ADN polymérase, les brins d'ADN sont multipliés pour former des clones dont la détection ultérieure sera facilitée. Une plaque de verre de quelques centimètres carrés peut abriter, avant amplification clonale, jusqu'à 200 millions de brins modèles d'ADN séparés spatialement.

(b) Séquençage proprement dit. A la différence de l'étape précédente, les molécules d'ADN amplifiées vont cette fois servir de modèles à leur propre synthèse en présence de nucléotides modifiés (de type terminateurs réversibles) et marqués selon la base qu'ils portent (A/T/G/C). A chaque cycle, de nouveaux terminateurs sont incorporés aux molécules en formation de façon complémentaire aux brins d'ADN modèles (ligne un, par simplification, les clones sont représentés par un seul brin d'ADN). Un rinçage permet d'éliminer les nucléotides non incorporés et un jeu complexe de lasers permet d'identifier le nucléotide incorporé à l'emplacement de chaque clone (ligne deux). Le groupe terminateur et le fluorochrome sont clivés et éliminés chimiquement. Après rinçage, un nouveau cycle peut reprendre (ligne 3).

(c) Rendu. Chaque vignette noire représente la capture pour un cycle  $c$  des nucléotides incorporés à des emplacements fixes. La succession rapide des cycles, par exemple 125 fois, permet de déterminer des séquences nucléotidiques d'une taille maximale fixe (125 nucléotides). Ces séquences portent le nom de *reads*. L'ensemble des *reads* est délivré sous forme d'un fichier FastQC qui rassemble à la fois les données brutes des séquences et des informations qualitatives sur le signal émis par chaque base incorporée.

Note importante: le séquençage par cluster s'accompagne d'un taux élevé - environ 1% - d'erreurs dans la détection des bases (substitutions). Lors du séquençage du cluster, l'un ou l'autre fragment d'ADN peut manquer de fixer un nucléotide (*lagging strand* ou  $n-1$ ) ou au contraire en capter 2 (*leading strand* ou  $n+1$ ). Il en résulte un déphasage au sein du cluster qui compromet l'identification précise des bases pour tous les cycles restants. Le séquençage de clusters produit en revanche peu de fausses détections d'Indels. Une large partie du traitement bioinformatique en aval du séquençage proprement dit est dédié à contrôler le risque qui résulte de ces erreurs initiales.

Outre les ARN messagers qui sont les ARN codants, les exons entrent dans la composition d'ARN non codants<sup>17</sup>. On compte environ 200.000 exons différents qui ne totalisent pas moins de 55 Mb soit un peu moins de 2% du génome. Le reste du génome est composé de régions répétitives et/ou régulatrices encore mal connues. Néanmoins, à ce jour plus de 85 % des maladies génétiques connues trouvent déjà une explication dans les seules régions codantes. C'est dire comme à la fois le volume et la nature de l'exome en font une cible de choix pour les explorations génomiques agnostiques (Gilissen et al., 2012).

Plusieurs kits commerciaux permettent de capturer sélectivement l'exome avant séquençage. Généralement, l'ensemble du génome est fragmenté aléatoirement ("*shotgun library*") et les fragments exoniques sont ensuite sélectionnés spécifiquement grâce à un jeu d'amorces nucléotidiques regroupées sur une puce ou en solution. Les fragments retenus font ensuite l'objet d'une amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avant d'être séquencés. Ce type de méthode permet de capturer 98% des cibles exoniques, ce qui est excellent mais incomplet (Hodges et al., 2007; Ng et al., 2009). Dans le futur, lorsque les prix auront baissé, les comparaisons d'exomes passeront sans doute toutes par le séquençage des génomes entiers, assorti d'un ciblage informatique des exomes. Séquencer les génomes entiers élimine les problèmes de couverture intrinsèques aux étapes de capture. En outre, cela dispense d'une amplification par *PCR* source d'erreurs en soi.

### 1.6.3 *Traitement bioinformatique des données de séquençage*

Le séquençage à haut débit génère un ensemble colossal de séquences ou "*reads*". L'abondance extraordinaire des données générées va mobiliser des ressources conséquentes tant du point de vue du traitement bioinformatique que du stockage (Bao et al., 2014; Nielsen et al., 2011).

Dans cette section, nous nous limiterons à aborder les enjeux liés au traitement bioinformatique des données issues du séquençage, au nombre de 4:

---

<sup>17</sup> ARN de transfert, longs ARN non-codants, microARN. Notons que les ARN messagers contiennent également des régions exoniques non traduites dénommées 5' et 3' UTR pour "*5' et 3' Untranslated Transcribed Regions*" et qui interfèrent avec l'expression du gène concerné.



- 1) Reconnaître les acides nucléiques, établir les *reads* ("**base calling**"),
  - 2) Une fois les *reads* établis, attribuer à chaque séquence une localisation génomique ("**alignment**" ou "**read mapping**"),
  - 3) Identifier fidèlement les variants et les génotypes ("**variant calling**"),
  - 4) Enfin, à chaque niveau, quantifier l'incertitude et le risque d'erreur. Là où il y a un doute, retrouver la solution correcte par des procédures d'inférence statistique.
- Cette notion est capitale car les séquenceurs à haut débit, et en particulier les plateformes ILLUMINA<sup>®</sup>, génèrent avant traitement un taux d'erreur évalué à 1%.

Le but ultime du processus est d'établir la liste de l'ensemble des variants à l'échelle individuelle, ou "**variome**". Les variomes ou, en pratique, les fichiers .VCF, font ensuite l'objet d'intenses manipulations pour devenir comparables entre individus et permettre d'établir ultimement des corrélations géno-phénotypiques.

Ces dernières étapes seront abordées séparément dans la section suivante.

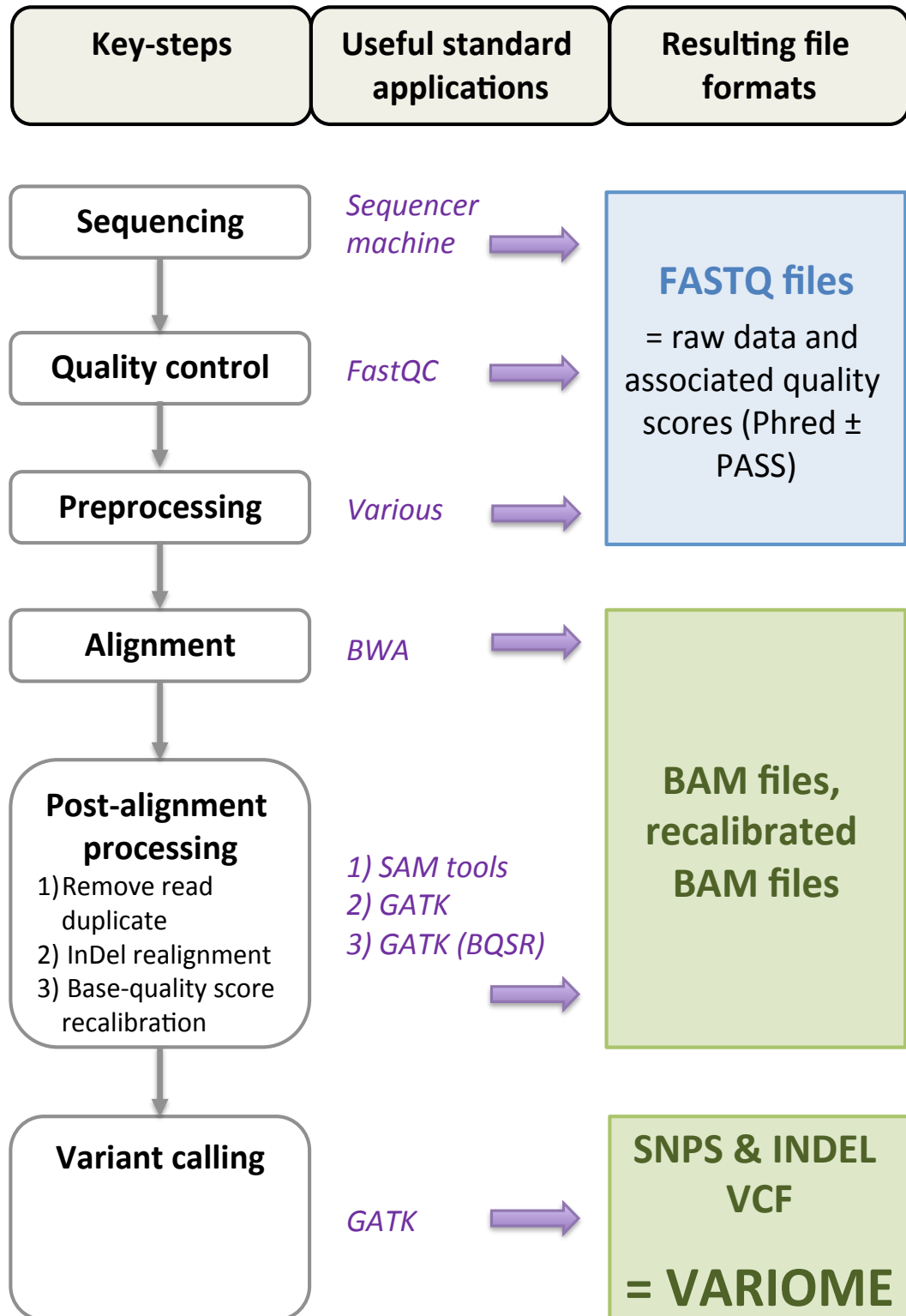
Une vision synthétique de la présente section est disponible en **Figure 5**.

### **1. Appel des bases (Fichier FASTQ)**

Chaque opération de séquençage ou "*run*" permet de déchiffrer entre 30 et 90 milliards de bases (30 à 90 Gb) assemblées en quelques centaines de millions de séquences appelées "*reads*". Chaque *read* compte au maximum de quelques dizaines à une centaine de nucléotides, selon le nombre de cycles permis par la plateforme de séquençage. Outre ces informations descriptives, les plateformes de séquençage vont générer, pour chaque base, des indices de qualité ou de confiance ("*confidence*") nécessaires à l'interprétation correcte des données.

En premier lieu, le *score Phred* estime, base par base, la probabilité d'une identification erronée. Inspiré du score éponyme en séquençage Sanger, le score Phred permet d'inférer la validité du séquençage au départ des observations de l'expérience en cours (profils d'intensité, ratio signal sur bruit, ...) et de *tables de qualité* préalablement établies avec des génomes connus.

**Figure 5** - Description simplifiée du traitement bioinformatique des données de séquençage, exemples de programmes, fichiers standards (toutes plateformes confondues, adapté d'après Bao et al. 2014).



Pour des raisons ergonomiques, le score Phred s'exprime sous forme logarithmique:

$$\text{Score Phred} = Q = - 10 \log_{10} P,$$

où  $P$  est la probabilité d'une identification erronée de la base

Ainsi un score Phred de 10 correspond à une erreur toutes les 10 bases; un score de 20, toutes les 100 bases et un score de 30 à 1 erreur toutes les 1.000 bases séquencées. Dit autrement, une base avec un  $Q \geq 30$  a 99,9% de chance d'être juste. Le pourcentage de bases séquencées avec un  $Q \geq 30$  ("Q30") sert souvent de référence pour évaluer la performance globale du séquençage (Illumina, 2011, 2014) autrement, une base avec un  $Q \geq 30$  a 99,9% de chance d'être juste. Le pourcentage de bases séquencées avec un  $Q \geq 30$  ("Q30") sert souvent de référence pour évaluer la performance globale du séquençage (Illumina, 2011, 2014).

En second lieu, les séquenceurs ILLUMINA<sup>®</sup> établissent en temps réel pour chaque cluster un score dit de *chasteté* basé sur les intensités lumineuses obtenues au cours des 25 premiers cycles<sup>18</sup>. Seuls les clusters contenant au maximum une base n'atteignant pas 60% de ce score sont qualifiées et reçoivent la mention "*pass-filter*") (Illumina, 2017).

Les données nominatives (bases, *reads*) et qualitatives (*pass-filter*,  $Q$ ) sont généralement regroupées dans un fichier de type FASTQ sous forme codée et compactée.

Les *reads* dont la qualité est établie font encore l'objet d'interventions particulières regroupées sous le terme de "*preprocessing*". D'abord, les *reads* issus de des fragments d'ADN les plus courts<sup>19</sup> doivent être débarrassés de leurs extrémités 3', reliquats du système d'adaptateurs universels mis en place lors de l'établissement de la librairie (section 0). Ensuite, il existe des applications, la plus couramment utilisée étant FastQC, qui permettent de contrôler plus avant la qualité des *reads* (études de la distribution des Phred scores le long des *reads*, contenu en nucléotides CG, distribution des longueurs de *reads*,

---

<sup>18</sup> Chasteté = (intensité de la base la plus lumineuse) / [(intensité de la base la plus lumineuse) + (intensité de la seconde base la plus lumineuse)]

<sup>19</sup> Les molécules d'ADN comptant moins de nucléotides que le séquenceur ne réalise de cycles.

niveau de duplication des séquences)(Bao et al., 2014) et au besoin de réaliser d'autres opérations telle que l'élimination de bases de moins bonne qualité à l'extrémité des *reads*.

## 2. Alignement des séquences (fichier BAM)

Les centaines de millions de fragments séquencés sont la plupart du temps de taille suffisante que pour pouvoir être assignés sans équivoque à un seul emplacement dans le génome. Chaque séquence est donc *alignée*, virtuellement, à une assemblée génomique de référence. A chaque emplacement, de multiples séquences ou *reads* se chevauchent<sup>20</sup>.

Un rendu visuel de cette étape est fourni en **Figure 6** et plusieurs termes techniques de base sont également présentés.

- Ainsi une séquence de type:

*lue*: ACTGTTGGAATCGATTAC (*read A*)

si elle est assez longue pourra souvent être alignée sans ambiguïté à une seule position ("*hit*") d'une assemblée génomique prise comme référence:

*ref*: ACTGTTGGAATCGATTAC (*emplacement A*)<sup>21</sup>

Plusieurs facteurs peuvent néanmoins fausser l'alignement (Li et al., 2008):

- Des erreurs de séquençage et/ou d'authentiques variants (A--> G; C--> T):

*lue*: ACTGTTGGGATCGATTT (*read A comprenant des erreurs ou des variants*)

pourraient entraîner un alignement incorrect à cette position (si elle existe):

*ref*: ACTGTTGGGATCGATTT (*emplacement B, incorrect*),

au lieu de:

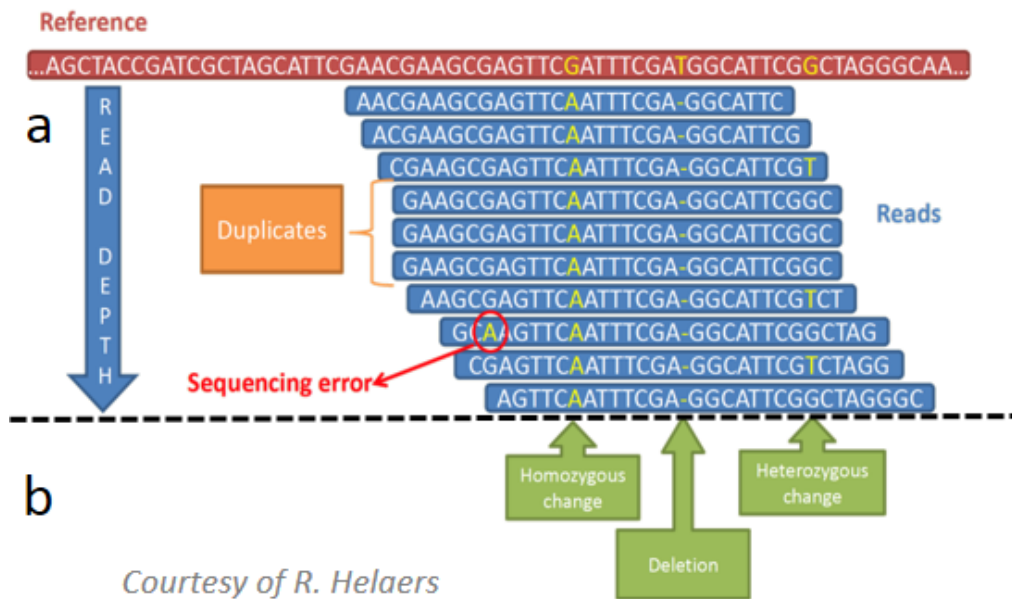
*ref*: ACTGTTGGAATCGATTAC (*emplacement A, correct*),

et dès lors générer ultérieurement des informations erronées.

---

<sup>20</sup> L'étape initiale de fragmentation aléatoire du génome s'effectue sur un grand nombre de molécules d'ADN, produisant de nombreux fragments pour chaque position.

**Figure 6** - Principes de l'alignement et de la détection des variants



Courtesy of R. Helaers

Légende:

(a) Alignement des séquences. Longues d'une centaine de nucléotides, la plupart des séquences (en bleu) peuvent être assignées à une localisation unique dans le génome de référence (en rouge).

Éléments de terminologie élémentaires. Sur base de ce graphique, on peut définir:

- la profondeur (ou *depth*): le nombre de séquences à une position X (flèche verticale bleue);
- la couverture (ou *coverage*): se réfère à la présence ou non de séquences en une région d'intérêt X (nucléotide / codon / exon / gène / ...).
- la profondeur de couverture (ou *depth of coverage*): se réfère quantitativement à la présence de séquences en une région d'intérêt X (nucléotide / codon / exon / gène / ...). Plus souvent parle de couverture  $\times n$ . La couverture  $\times 20$ , est une mesure fréquemment utilisée.
- les duplicats (ou *duplicates*): il s'agit de l'accumulation de plusieurs *reads* identiques à une même position. Les duplicats peuvent soit résulter d'une authentique anomalie du nombre de copie de gènes ("*CNV*" pour "*copy number variant*") soit d'aberrations techniques lors de la préparation de la librairie, plus ou moins nombreuses selon la technologie de séquençage utilisée.

(b) Principe de la détection des variants. L'alignement de nombreuses séquences superposées permet de détecter des "variants" (lettres jaunes). En pratique, un variant isolé a toutes les chances d'être une erreur de séquençage; un variant présent dans la moitié des séquences, environ, est fort probablement un variant hétérozygote, c'est-à-dire porté par un allèle seulement; enfin, un variant présent dans l'ensemble des séquences est fort probablement un variant homozygote. Le séquençage à haut débit permet la détection de variants de type "*SNV*" (single nucléotide variant – changement d'une paire de bases) ou encore de courts "*InDel*" (insertions / délétions de quelques nucléotides, < 50 pb) ainsi que le génotype (c'est-à-dire la composition allélique: homozygote versus hétérozygotie). A noter la détection des *InDels* requiert habituellement l'exploitation des données de *reads* pairés.

A noter, les variants structuraux, soient les variants impliquant un ajout, une perte ou un déplacement de matériel génétique sans anomalie de séquence nucléotidique (insertion / délétion / inversion / translocation de plus de 50 pb) ne sont actuellement pas encore parfaitement détectés par séquençage à haut débit.

Trois types de stratégies permettent de contrôler ces écueils.

- En premier des *reads* plus grands et chevauchants assurent une meilleure résolution (Whiteford et al., 2005). Cette stratégie a cependant ses limites car la qualité du séquençage *en clusters* se dégrade avec l'allongement des *reads* (Chaisson et al., 2009).
- En deuxième lieu, l'exploitation combinée des données *en paires*, c'est-à-dire des brins sens et antisens d'une même molécule d'ADN permet de détecter plus d'erreurs.
- Enfin, des méthodes d'inférence statistique permettent de classer les emplacements selon leur plausibilité relative. La hiérarchisation initiale des emplacements part du principe simple que le meilleur alignement possible est celui qui minimise les discordances entre bases. Ainsi, les *reads* pour lesquels la somme des scores de qualité (scores Phred) aux niveaux des *mismatches* est élevée, soient des discordances certaines, sont relégués en bas de liste, tandis que les *reads* dont la somme des scores de qualité aux niveaux des *mismatches* est la plus faible, somme toute des discordances sujettes à caution, sont surclassés<sup>22</sup>. Ensuite, ce classement est raffiné sur base des performances générales de l'assemblage en cours (nombre et somme des scores des discordances dans les deux meilleurs *hits*, nombre de *hits* avec un nombre de *mismatches* égaux au second meilleur hit, qualité moyenne des bases, ...) (Li et al., 2008). Les algorithmes utilisés relèvent directement de la statistique bayésienne<sup>23</sup>.

---

<sup>22</sup> Ceci ne peut avoir de sens que si une qualité minimale de séquençage a été obtenue. Sinon, cela reviendrait à mettre en avant les *reads* les plus douteux. Cette qualité est obtenue en n'autorisant qu'un nombre limite de discordances dans la portion du *read* la plus sûre (par exemple, autoriser au plus deux discordances parmi les 28 premières bases).

<sup>23</sup> A titre d'illustration. Comme explicité plus haut; la somme des scores Phred au niveau des bases discordantes informe sur le risque d'alignement erroné des séquences. Ainsi, en présence de deux discordances, l'une avec un Q=20 et l'autre un Q=10, on conclura que la probabilité a priori que la séquence *z* vienne de la position *u*;

$$p(z|u) = 10 \cdot (10+20)/10 = 0,001$$

Il s'agit en réalité d'une probabilité théorique qui ne tient pas compte du contexte de l'expérience réelle d'alignement.

La statistique bayésienne permet d'affiner les probabilités *a priori* des évènements (*p pré-test*), autrement dit de générer des probabilités *postérieures* (*p post test*) qui tiennent compte des observations et des lois de probabilité qui en découlent (adapté d'après Wikipédia, Théorème de Bayes, 18 avril 2018).

Appliquer le théorème de Bayes permet d'écrire:

$$p_s(u|z) = p(z|u) \cdot p(u) / \sum p(z|v) \text{ où:}$$

$p_s(u|z)$  = la probabilité postérieure que l'emplacement *u* soit la référence de la séquence *z*;  
 $p(z|u)$  = la probabilité *a priori* que la séquence *z* vienne de la position *u* (calculée plus haut);  
 $p(u)$  = la probabilité *a priori* de trouver l'emplacement *u*. Distribuée uniformément, elle peut être négligée;  
 $\sum p(z|v)$  = la somme des probabilités d'obtenir le *read z* pour chaque position *v* dans le génome.

Comme pour les bases, on choisit d'exprimer par un logarithme la probabilité que l'alignement soit *faux*

Les données alignées sont généralement regroupées dans un fichier de type BAM. Là encore, divers artéfacts sont possibles et traditionnellement on procède encore à trois opérations désignées sous le nom de *postprocessing*. Il s'agit de l'élimination des *duplicats* artéfactuels; de *réalignement local* dans les zones cibles d'InDels<sup>24</sup> et enfin d'une *recalibration* des scores Phred (Bao et al., 2014).

1) Les duplicats peuvent résulter soit d'une amplification abusive lors de la préparation de la librairie (artéfact de PCR), soit être d'authentiques duplications génétiques (*CNV* pour *Copy Number Variants*). Des programmes comme SAM-tools écartent les duplicats supposés artéfactuels sur base de leur étude poussée (coordonnées sur la microplaque de séquençage, orientation des reads).

2) L'alignement des *reads* autour des InDels est plus délicat car il implique des *reads* raccourcis, incomplets. Des algorithmes spécialisés sont nécessaires pour ces régions.

3) Les scores Phred issus des données la plateforme de séquençage sont rarement précis et sont fréquemment la source de biais systématiques. Il est impératif de réajuster le score Phred de chaque base sous peine d'erreurs massives en aval lors de l'identification des variants. Les programmes courants (exemple: BQSR) établissent la covariance des scores Phred d'un set de variants polymorphiques et peu suspects selon divers caractéristiques (score Phred, position de la base dans le *read* et base adjacente). Après ajustements utiles, ces valeurs permettent de revoir à la hausse ou à la baisse les scores Phred établis initialement par le séquenceur.

---

$$Q_s = -10\log_{10} p \text{ (que la séquence soit mal alignée).}$$
$$= -10\log_{10} p [1 - (p_s(u|z))]$$

Ces formules sont les plus précises mais elles sont fastidieuses, en particulier la computation de  $\sum p(z|v)$  à l'échelle du génome. En pratique on utilise une approximation de  $Q_s$  basée sur le nombre et la somme des scores Phred au niveau des *mismatches* des deux meilleurs emplacements et autres indices de qualité globale (adapté d'après Li et al. 2008).

<sup>24</sup> L'abréviation "Indel" désigne une courte insertion ou délétion de moins de 50 pb.

### 3. Principe de l'appel des variants (fichier .VCF)

La comparaison des séquences obtenues au génome de référence permet de détecter des variants au cours d'un processus nommé variant calling et schématisé en **Figure 6**.

Selon la proportion du variant au sein de la pile de *reads* (*pileup*), on peut également déterminer le **génotype** du patient (pour un variant donné: homozygotie pour l'allèle naturel; homozygotie pour le variant; hétérozygotie). Variants et génotype sont donc d'abord détectés sur une base numérique.

Naturellement, la qualité de l'appel des variants et la détermination des génotypes reposent directement sur la qualité des étapes précédentes; en particulier la quantification des erreurs de *base-calling* lors de la composition des *reads*, la sûreté des de l'alignement et des réalignements et de la méthodologie qui permet de définir les génotypes (Genomes Project et al., 2010).

Une nouvelle fois, la statistique bayésienne est appelée à la rescousse pour donner une appréciation fine de la probabilité des génotypes possibles à chaque position, compte-tenu des observations réalisées, et en particulier des scores Phred recalibrés au terme de l'assemblage des séquences<sup>25</sup> (McKenna et al., 2010).

*In fine*, pour chaque *read*, le génotype retenu sera celui qui obtiendra la plus haute probabilité a posteriori. Seuls les génotypes qui atteignent un seuil minimal fixé par l'utilisateur

---

<sup>25</sup> Pour chaque position génomique, le théorème de Bayes permet de calculer la probabilité postérieure que l'ensemble des *reads* trouvés sous cette position (*pileup*) rendent compte du génotype G:

$$p(G|D) = P(G) p(D|G) / p(D) \text{ où:}$$

$p(G|D)$  est la probabilité d'observer le génotype G quand on a les données D;

$p(G)$  est la probabilité *a priori* d'avoir tel ou tel génotype. Ces probabilités peuvent par exemple être extraites de larges bases de données génomiques publiques.

$p(D)$  est la probabilité *a priori* d'observer ces données, comme en pratique, elle ne change pas en fonction du génotype testé, cette valeur est la plupart du temps ignorée.

$p(D|G)$  est la probabilité d'observer les données observées, donc les bases b sur l'ensemble des *reads* retrouvés sous la position étudiée, si le génotype est G.  $p(D|G)$  est donc une fonction de  $p(b|G)$  qui s'écrit:

$$p(D|G) = \prod_{b \in \text{pileup}} p(b|G) \text{ où:}$$

$p(b|G)$  est la probabilité de retrouver la base b si la génotype est G, elle-même fonction du score Phred de la base b. (Adapté de McKenna et al. 2010).



(*threshold for emitting*) sont émis vers le disque et entrent dans la composition du fichier final au format .VCF (*Variant Call Format*)<sup>26</sup>.

#### 1.6.4 Filtration des variants (annotation, filtration et priorisation)

La comparaison d'un exome humain européen à une séquence de référence de la même ethnie révèle typiquement entre 20 et 23.000 variations majoritairement de type *Single nucleotide variants* ou *SNVs*<sup>27</sup> dont la moitié environ sont des variants synonymes<sup>28</sup> (Genomes Project et al., 2010) et parfois autant de faux positifs (Gilissen et al., 2012).

Afin d'être manipulables et comparables entre individus, ces ensembles colossaux de variants ou *variomes* doivent d'abord faire l'objet d'*annotations* précises (positionnelles et fonctionnelles) puis d'une *filtration* sur base de critères qualitatifs et finalement être priorisés en fonction de l'hypothèse clinique. Ultimement, un lien génotype - phénotype pourra être retrouvé sur base de recoupements entre sujets porteurs du trait et sujets contrôles (aussi appelé "*disease mapping*").

**L'annotation des variants.** Cette étape vise à caractériser chacun des variants du .VCF en vue des étapes de tri ultérieures. Les annotations de base comportent les coordonnées génomiques, le nom du gène couvert s'il y a lieu, le caractère exonique ou intronique, et en cas de variant codant, le changement d'acide aminé attendu. Plusieurs programmes mettent en relation ces données élémentaires avec une collection de données issues de bases de données publiques. Ainsi, il est aisé d'ajouter des spécifications aux variants telles que leur fréquence allélique (d'après les bases de données dbSNP, 1.000 genomes,

---

<sup>26</sup> Lorsque l'appel des variants et des génotypes est réalisé pour plusieurs milliers d'individus en même temps (*multi-sample calling*), il peut être rendu bien plus performant par l'implémentation d'algorithmes bayésiens basés sur l'observation des déséquilibres de liaison et/ou sur la loi de la distribution génotypique d'Hardy-Weinberg. Par exemple, si la série compte deux haplotypes à une position: ATT et CGA; en cas de doute sur la deuxième base appelée à cet emplacement mais entre un A et un T très sûrs, l'algorithme renforcera la probabilité postérieure d'un T. Nous avons choisi de ne pas détailler plus avant ces possibilités compte-tenu de l'échelle de notre travail (comme nous verrons plus tard, nous avons procédé à l'appel des variants patient par patient soit du *single-sample calling*).

<sup>27</sup> L'acronyme "*SNV*" - pour *Single Nucleotide Variant* - désigne un changement nucléotidique n'impliquant qu'une seule paire de bases. Les *SNVs* incluent les "*SNPs*" - pour *Single Nucleotide Polymorphisms* - qui sont des *SNV* dont la fréquence allélique dépasse 1%.

<sup>28</sup> Un variant synonyme est un changement nucléotidique qui entraîne un codon différent mais qui in fine, grâce aux redondances du code génétique, codera pour le même acide aminé que le codon qu'il remplace. Les variants synonymes ont plus rarement des conséquences cliniques (pour certains on a décrit des conséquences délétères à cause d'interférence avec le processus d'épissage des ARN).

ESP6500 ou Ensembl, ...) ou encore de préjuger de leur caractère pathogène sur bases de prédictions structurales au niveau des protéines ou de données épidémiologiques (CADD, Polyphen, ClinVArrest, ...). Le programme libre d'accès ANNOVAR par exemple, parmi les plus utilisés, collige les informations de plus de 4000 bases de données publiques (Bao et al., 2014; Wang et al., 2010).

**Filtration selon la qualité.** L'investigateur, même non bioinformaticien peut, à l'aide d'interfaces libres ou commerciales, s'adonner à la filtration des variants. Il s'attachera à éliminer en premier les variants de moindre qualité (par exemple avec une profondeur de couverture inférieure à 10 ou des scores Phred médiocres - avec une tolérance plus ou moins grande selon la profondeur de séquençage disponible) ou encore les erreurs évidentes telle que la présence isolée de 3 allèles différents chez un même patient.

**Priorisation sur base de l'hypothèse clinique.** L'investigateur peut encore réduire le nombre de variants examinés par individu sur base du modèle de maladie étudié.

Un des filtres les plus importants revient à se limiter à investiguer les séquences exoniques: les séquences génomiques codant pour des protéines sont dramatiquement sensibles aux mutations et en conséquence, elles rassemblent à ce jour, une large majorité des mutations identifiées dans le cadre des maladies mendéliennes (Botstein and Risch, 2003). Se limiter à examiner les exomes revient à examiner un peu moins de 2% du génome soit 60 Mb en lieu et place de 3 Gb. Même lorsque les exons ont été capturés d'entrée de jeu au moment de la réalisation de la librairie (*WES* et pas *WGS*), il est important d'appliquer un tel filtre car beaucoup de fragments introniques adjacents aux exons sont capturés au passage avec les kits de capture.

Enfin, il est souvent utile de filtrer les variants sur base de leur fréquence allélique ou "*MAF*" (*minor allele frequency*). D'abord lorsque l'on suspecte une cause monogénique de fréquence connue, mais pas seulement. Plus généralement, il peut être utile de focaliser les recherches sur les variants les plus rares qui contiennent le plus de variants fonctionnels délétères par pression de sélection (Genomes Project et al., 2010).

### **Association génotype-phénotype**

Lorsque la liste des variants individuels a été réduite à quelques centaines de variants dits privés, il devient possible de les comparer, à la manière d'ensembles, en cherchant ce qui est commun aux malades mais absent chez les sujets contrôles.

Lorsque le trait étudié semble être transmis dans une famille selon un mode mendélien (autosomique ou lié à l'X, dominant ou récessif), quelques individus exomés seulement peuvent suffire, moyennant les comparaisons judicieuses, à retrouver le gène coupable (Gilissen et al., 2012; Ng et al., 2009).

Lorsque le trait étudié est largement polygénique voire multifactoriel, on doit en général se limiter à des tests d'association qui permettent d'établir, si elle existe, une surreprésentation d'un variant ou des variants d'un seul gène dans un groupe de "*cas*" soigneusement sélectionnés, par comparaison à des "*contrôles*". Ces différents tests d'association seront présentés dans le chapitre 3, dans le contexte particulier de l'étude de patients tolérants et nous n'en dirons donc pas plus ici.



## **ANNEXE I - article de revue dans *Clinical Experimental Immunology***

Article: Operational Tolerance In Kidney Transplantation and Associated Biomarkers

Type: article de revue

Auteur.e.s: **Massart A**, Ghisdal L, Abramowicz M, Abramowicz D.

Référence: Clin Exp Immunol. 2017; 189: 138–157.



# Operational tolerance in kidney transplantation and associated biomarkers

## OTHER ARTICLES PUBLISHED IN THIS REVIEW SERIES

*Immune tolerance in transplantation. Clinical and Experimental Immunology 2017, 189: 133–4.*

*Transplantation tolerance: the big picture. Where do we stand, where should we go? Clinical and Experimental Immunology 2017, 189: 135–7.*

*Immune monitoring as prerequisite for transplantation tolerance trials. Clinical and Experimental Immunology 2017, 189: 158–70.*

*Transplantation tolerance: don't forget about the B cells. Clinical and Experimental Immunology 2017, 189: 171–80.*

*Murine models of transplantation tolerance through mixed chimerism: advances and roadblocks. Clinical and Experimental Immunology 2017, 189: 181–9.*

*Chimerism-based tolerance in organ transplantation: preclinical and clinical studies. Clinical and Experimental Immunology 2017, 189: 190–6.*

*Regulatory T cells: tolerance induction in solid organ transplantation. Clinical and Experimental Immunology 2017, 189: 197–210.*

A. Massart <sup>\*</sup>, L. Ghisdal,<sup>†</sup>

M. Abramowicz<sup>‡</sup> and

D. Abramowicz<sup>§</sup>

<sup>\*</sup>Department of Nephrology, Dialysis, and Transplantation, CUB Hôpital Erasme and Institute of Interdisciplinary Research in Molecular and Human Biology (IRIBHM), Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium,

<sup>†</sup>Department of Nephrology, Centre Hospitalier EpiCURA, Baudour, Belgium, <sup>‡</sup>Department of

Human Genetics, CUB Hôpital Erasme and Institute of Interdisciplinary Research in Molecular and Human Biology (IRIBHM),

Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium, and <sup>§</sup>Department of Nephrology, Universitair Ziekenhuis Antwerpen and Antwerp University, Antwerp, Belgium

## Summary

In the 1960s, our predecessors won a historical battle against acute rejection and ensured that transplantation became a common life-saving treatment. In parallel with this success, or perhaps because of it, we lost the battle for long-lived transplants, being overwhelmed with chronic immune insults and the toxicities of immunosuppression. It is likely that current powerful treatments block acute rejection, but at the same time condemn the few circulating donor cells that would have been able to elicit immunoregulatory host responses towards the allograft. Under these conditions, spontaneously tolerant kidney recipients – i.e. patients who maintain allograft function in the absence of immunosuppression – are merely accidents; they are scarce, mysterious and precious. Several teams pursue the goal of finding a biomarker that would guide us towards the 'just right' level of immunosuppression that avoids rejection while leaving some space for donor immune cells. Some cellular assays are attractive because they are antigen-specific, and provide a comprehensive view of immune responses toward the graft. These seem to closely follow patient regulatory capacities. However, these tests are cumbersome, and require abundant cellular material from both donor and recipient. The latest newcomers, non-antigen-specific recipient blood transcriptomic biomarkers, offer the promise that a practicable and simple signature may be found that overcomes the complexity of a system in which an infinite number of individual cell combinations can lead possibly to graft acceptance. Biomarker studies are as much an objective – identifying tolerant patients, enabling tolerance trials – as a means to deciphering the underlying mechanisms of one of the most important current issues in transplantation.

**Keywords:** biomarker, cellular assays, immunoquiescence, kidney transplantation, operational tolerance

Accepted for publication 19 April 2017

Correspondence: A. Massart, Department of Nephrology, Dialysis, and Transplantation, CUB Hôpital Erasme and Institute of Interdisciplinary Research in Molecular and Human Biology (IRIBHM), Université Libre de Bruxelles, 808 route de Lennik, Brussels, 1070, Belgium. *CE*-mail: anmassar@ulb.ac.be

## Introduction

As described initially in 1953 by Billingham, Brent and Medawar in a murine model, transplantation tolerance is an acquired state in which immunocompetent recipients have developed donor-specific unresponsiveness [1]. Sixty years later, tolerance appears, more than ever, to be a highly desirable goal in transplantation. The use and development of immunosuppressive drugs have provided a means of

controlling acute transplant rejection and have established transplantation as a part of daily medical practice. However, successes in early transplant management have not been accompanied by significant improvements in long-term graft outcomes [2]. Also, non-specific immunosuppression burdens patients with serious side effects such as infections, malignancies, nephrotoxicity and metabolic complications [3,4]. In kidney transplantation alone, the

**Table 1.** Reported kidney recipients who discontinued all immunosuppressive medications for at least one year without experiencing graft failure

First author or group	Year of first report	Number of original operationally tolerant patients	Time range without immunosuppression at the time of the report
Owens [17]	1975	4	17–52 months
Hussey (reply to Owens) [18]	1976	1	40 months
Uehling [19]	1976	1	36 months
Seigler (reply to Uehling) [19]	1976	1	> 4 years
Zoller [20]	1980	14	1–8 years
Strober [21,22]	1989	2	69 months and 12 years
Burlingham [23,24]	1995	1	7 years
Fischer [25]	1996	1	9 years
Christensen [26]	1998	1	> 3 years
Van Buskirk [27]	2000	2 <sup>§</sup>	> 5 and > 27 years
Cai [28]	2004	1 <sup>§</sup>	32 years
Starzl [5]	2004	7	3–38 years
University of Nantes, France [29,30]	2006	27 <sup>‡</sup>	2–20 years (one missing data)
Xu [31]	2007	2	Not available
Indices of Tolerance (IOT) [32]	2010	11	2–21 years
Immune Tolerance Network (ITN) [33–35]	2010	39	Divided into 3 groups: (1) $n = 25$ , mean time: $16 \pm 10.4$ (2) $n = 7$ , mean time: $14 \pm 17.1$ (3) $n = 7$ , not available
Azancot [36]	2011	2 <sup>‡</sup>	14 months and > 6 years
Inal [37]	2011	1	8 years
University of São Paulo, Brazil [38–40]	2012	5	1.5–8 years
Becker [41]	2012	4	1–19 years
Roedder [42]	2014	69	Not available
GAMBIT study [43,44]	2016	14 <sup>#</sup> 1 common	1–22.5 years
DESCARTES–Nantes Survey [8]	2016	40 <sup>#</sup> 1 common	1–25 years (5 missing data)
Kesiraju [45]	2016	1	> 3 years
Total	41 years of reports	247	–

It is likely that some operationally tolerant patients were involved in more than one report. When known, shared cases have been marked by identical symbols (<sup>‡</sup>, <sup>#</sup>, <sup>§</sup>). We did not mention reports concerning exclusively patients with a history of combined kidney and bone marrow transplantation.

achievement of lifelong tolerance is expected, intuitively and on the basis of compelling observations, to improve long-term patient and graft outcomes dramatically [5–9].

Several protocols have succeeded in inducing tolerance in human leucocyte antigen (HLA)-mismatched human kidney recipients through the achievement, at least transiently, of mixed chimerism [10–12]. Mixed chimerism refers to a ‘hybrid immune system whereby donor pluripotent haematopoietic stem cells engraft and coexist with recipient stem cells giving rise to hematopoietic lineages in the recipient [13]. Eventually, if the engraftment is successful, recipient immune cells develop a selective and durable acceptance to organ and tissue transplants from the same donor [14]. Chimerism can be obtained via various regimens combining non-myeloablative lympho-depleting or immunomodulating interventions in the recipient with a bone-marrow infusion derived from the kidney donor.

Although revolutionary, these procedures remain hampered by the need for highly specialized management, life-threatening conditioning regimens, a non-competitive success rate and, finally, a failure to prevent slow alloimmune responses [6,7,15]. As a result, they have not entered routine clinical

practice to date. As detailed by Lombardi *et al.* in the same issue of *CEI*, growing efforts are being undertaken by different groups to develop cellular therapies that may contribute to the achievement of more sustainable allograft tolerance [16].

Conversely, a limited number of kidney recipients who discontinued all immunosuppressive drugs have been able to maintain good allograft function for prolonged periods, in the absence of overt immunodeficiency (see Table 1). These patients were qualified as ‘clinically operationally or spontaneously tolerant’. They have been studied extensively with three goals in mind: identify specific biomarkers that predict safe immunosuppression minimization in some patients; promote clinical trials aimed at testing strategies of tolerance induction; and discover innovative pharmacological targets for treating rejection or generating tolerance.

The present review aims to summarize current knowledge on operationally tolerant kidney recipients.

### Defining an enigma: the need for operational criteria

In animal studies, the claim that an individual has become tolerant has to meet very stringent criteria [46].



**Table 2.** The definitions of operational tolerance used in different collaborative studies and original cohort characteristics

First author (consortium, year)	Operational tolerance definition	Reason for immunosuppression withdrawal	HLA A-B-DR mismatches	Donors
Brouard (Canada–US–Europe collaboration, 2007) [47]	Stable Cockcroft–Gault calculated creatinine clearance > 60 ml per min per 1.73 m <sup>2</sup> with absent or low-grade proteinuria (<1.5 g/day), without any immunosuppressive drug for at least 2 years	Medical reasons: 2 (malignancy 1) Non-compliance: 15 Missing data: 0	Mean: 3.2 in the training set ( <i>n</i> = 5), 3 in the test set ( <i>n</i> = 12)	Deceased: n.a. Living, related: 1 Living, unrelated: n.a.
Newell (ITN, 2010) [33,34]	Stable renal function and serum creatinine within 25% of baseline (as evaluated by 3 experienced transplant physicians), without any immunosuppressive drug for at least 1 year	Medical reasons: 2 Non-compliance: 20 Missing data: 3	Mean: 1.1 ± 1.71 (10 missing data)	Deceased: 5 Living, related: 18 Living, unrelated: 1 Missing data: 1
Sagoo (RISET, IOT, 2010) [32]	Functionally stable kidney transplant recipients with serum creatinine <160 µmol/l and <10% rise in the last 12 months, without any immunosuppressive drug for at least 1 year	Medical reasons: 2 (malignancy 2, BMT 1) Non-compliance: 7 Missing data: 2	Mean HLA A-B-C-DQ-DR: 3.5 ± 2.4	Deceased: 7 Living, related: 4 Living, unrelated: 0 Missing data: 0
Brouard (Nantes University-driven project, 2012) [30]	Stable kidney transplant function with <150 µmol/l creatinaemia and <1 g/day proteinuria, without any immunosuppressive drug for at least 1 year	Medical reasons: 7 (malignancy 6) Non-compliance: 19 Missing data: 0	Mean: 3 ± 2	Deceased: 22 Living, related: 5 Living, unrelated: 0 Missing data: 0
Roedder (US–Mexico collaboration, 2014) [42]	Long-term stable graft function, without any immunosuppressive drug for at least 2 years and no history of rejection off immunosuppression	Medical reasons: n.a. Non-compliance: n.a.	Mean: 0.75 ± 1.5 ( <i>n</i> = 43) (n.a. data 26)	Deceased: n.a. Living, related: 18 Living, unrelated: n.a. n.a. data 51
Massart (DESCARTES–Nantes survey, 2016) [8]	Creatinaemia <150 µmol/l and proteinuria <1 g/day or <1 g/g creatinine for at least 1 year or higher but stable values for at least 1 year without any immunosuppressive drug for at least 1 year	Medical reasons: 10 (whose malignancy 8) Non-compliance: 51 Missing data: 0	Mean: 2.8 ± 1.1 (in 41 mismatched pairs, 7 missing data, 13 full-matched pairs)	Deceased: 42 Living: 19 Missing data: 0

BMT = bone marrow transplantation; DESCARTES = Developing Education Science and Care for Renal Transplantation in European States; IOT = Indices of Tolerance; ITN = Immune Tolerance Network; n.a. = not available; RISET = Reprogramming the Immune System for the Establishment of Tolerance.

Investigators must provide measurable evidence of prolonged allograft survival in the absence of any immunosuppression with normal function, normal histology and the suppression of donor-specific responses using *in-vitro* assays. Frequently, the demonstration of acceptance by the tolerant recipient of a second donor strain graft, but rejection of a third-party graft is also required. This extensive demonstration is naturally not suitable for patients, for obvious ethical and practical reasons. Histological examination, although theoretically feasible, is rarely performed due to the reluctance of both patients – who are often poorly compliant – and clinicians to biopsy a well-functioning kidney. *In-vitro* assays require donor material that is often not available. In addition, no assay has been validated so far that correlates with the maintenance of tolerance, questioning the value of monitoring.

Disappointingly, in clinical practice, the ultimate definition of clinical tolerance will be limited to the demonstration of long-lasting, good allograft function, without overt signs of rejection or immunodeficiency [29,46]. Depending on the authors, good graft function is defined as either

stable or excellent kidney function with a serum creatinine below 150 µmol/l and no gross glomerular proteinuria (< 1 g/day) [29] (for details, see Table 2). All authors agreed upon a strict minimal period of 1 year without immunosuppression before evoking tolerance. Importantly, this choice of duration criterion strongly impacts the prevalence of tolerance. Zoller *et al.* showed that among a selected population of 48 kidney transplant patients, the majority of whom were recipients of a living-related transplant who discontinued their immunosuppression, 16 maintained good graft function at 1 year but only six at 3 years. Notably, none of the cadaveric transplant recipients maintained stable graft function for longer than 2 years without immunosuppressive therapy [20].

This gap between experimental and clinical definitions of tolerance has a major implication: we cannot assume that all operationally tolerant patients are truly immunologically tolerant. The first reason is technical. While obtaining a kidney biopsy is problematic, as mentioned above, serum creatinine is known to be a poor surrogate of early-stage immune injuries. Consequently, a patient

developing subclinical rejection following discontinuation of immunosuppression will meet operational tolerance criteria as long as he maintains a stable creatinine. In addition, several authors have reported that longstanding drug-free graft function can be associated with the presence of donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) [8,30,33,41,48].

In conclusion, the terminology of 'operational tolerance' is somewhat misleading, because it suggests an equivalence between operational and experimental tolerance which may not be appropriate for all cases [49]. An increasing number of authors talk about 'longstanding absence of nondeleterious/nondestructive immune responses' [48,50] or 'immunoquiescence' [42] instead. The lack of formally ruled-out subclinical rejection in supposedly operationally tolerant patients may suggest there is no value in studying those patients [51,52]. We believe that, from a clinical perspective, all patients displaying prolonged allograft survival without immunosuppression deserve our interest, regardless of the mechanism involved.

## Clinical presentation

### Circumstances of discovery

In current practice, operational tolerance is a rare serendipitous finding, occurring in a limited number of circumstances and patients. Most tolerant individuals are non-compliant patients who weaned themselves off treatment for various reasons (e.g. personal beliefs, excessive side effects, oversight, mental disorder, social issues) (Massart *et al.*, unpublished). Those who felt well or 'better' continued in that direction. Furthermore, they often hide this behaviour from the medical team; for instance, by taking immunosuppressive drugs that can be monitored in blood only before visits [53]. Drug discontinuation could take months or years with several phases of 'stop-and-start' [29]. A second group of tolerant patients includes those who were advised to suspend immunosuppressive drugs by the medical team when confronted with a life-threatening complication, either oncological (typically a lymphoma) or infectious. Thirdly, some patients who have benefited from an external intervention such as total lymphoid irradiation [21] or combined/successive kidney and bone marrow transplantations (BMT) from the same donor, in the setting of a haematological malignancy, have developed operational tolerance (reviewed in [54]). Two other papers have included recipients of BMT in their cohort of spontaneously tolerant patients ([30] – case no. 19, and [32]). In support of that inclusive view, Sagoo *et al.* did not detect any differences between bone-marrow transplanted patients and any other tolerant subjects in any of the assays performed in their biomarker study. However, for the purpose of clarity, this review does not include BMT patients. Finally, we are aware of two cases of tolerance that developed in the context of pregnancy ([8] – case no. 34,

unpublished data and [25]). While this is an intriguing observation, the low number of cases does not allow us to draw firm conclusions about facilitated kidney allograft acceptance during pregnancy.

### Frequency

It has been known from the early days of transplantation that recipient immunosuppression is required to maintain kidney allograft function beyond 48 h [55]. Attempts to reduce immunosuppression from standard treatment levels after the first semester/year of transplantation were also associated with a significant risk of graft loss [56]. Recently, two prospective controlled trials of gradual calcineurin inhibitor weaning in highly selected patients were terminated prematurely because of unacceptably high rates of rejection and alloimmunization [57,58]. Finally, patient non-compliance [59] has been shown to increase significantly rates of late acute kidney rejection [59] and graft loss [60,61].

To our knowledge, fewer than 250 patients, from among several hundred thousand transplantations (see Table 1 for details), have been reported to have discontinued treatment successfully. Operationally tolerant patients, under the current era of immunosuppression, are very rare [5]. We recently performed a Europe-wide survey to identify how frequently these observations were made [8]. A total of 147 centres with a cumulative experience of 218 913 kidney transplantations participated. Overall, we estimated the cumulative incidence of operational tolerance at three per 10 000 kidney recipients (0.03%). We concluded that this rate was an under-estimate for methodological reasons and because non-compliance is, by nature, surreptitious. However, in the similar context of liver transplantation, clinical tolerance is achieved in 20–40% of selected patients [49,62], supporting the view that tolerant kidney recipients are definitely much more rare.

Interestingly, operationally tolerant patients seemed to be, proportionally, significantly more frequent in the early days of transplantation. Starzl and colleagues reported that among the 46 recipients of allografts from living related donors treated in Colorado between 1962 and 1963, nine achieved extra-long graft function for approximately 4 decades. Seven of nine patients displayed an immunosuppression-free period ranging from 3 to 38 years, in spite of HLA mismatches and even ABO incompatibility in one [5]. Starzl and co-workers theorized that immune cell migration and repopulation in the recipient was a critical step in every transplantation, either haematological or solid [63]. This very powerful theory is at the origin of the very first successes in inducing tolerance in humans [64]. By the end of 1963, most teams worldwide started using stronger immunosuppressive treatments, in particular prophylactic steroid bolus, in order to thwart the occurrence of irreversible acute rejection. Starzl and colleagues postulated that these new therapeutic

practices may have eliminated migratory donor cells ('passenger leukocytes'), thus blocking rejection but in return also preventing the 'coexistence of donor and recipient cells each to the other', currently termed 'chimerism'. Our successes in opposing acute rejection seemed to come at the price of a dramatic reduction in long-term survival.

### Patient description

Baseline characteristics of operationally tolerant kidney recipients 'do not seem to differ greatly from other kidney recipients in general' [29]. The recent Developing Education Science and Care for Renal Transplantation in European States (DESCARTES)–Nantes survey, which sums up the characteristics of 61 active or past tolerant kidney recipients from across all of Europe, the largest phenotypical description so far, supports that contention. Indeed, most patients were male in their 30s at the time of transplantation and they received an HLA-mismatched cadaveric transplant (average HLA A/B/DR-mismatch number of  $2.8 \pm 1.1$  in 41; no mismatches in 13; proportion of cadaveric transplants *versus* living donors was 42 of 61). More than one-third were allosensitized before transplantation. All conventional immunosuppressive drugs seemed to be compatible with the later development of tolerance, including induction with steroids and monoclonal antibodies. In terms of background, autoimmune diseases were sometimes observed but, notably, few diabetic nephropathies (four of 61). Donors were quite young ( $30.7 \pm 13$  years) and, together with others, we suggest that the quality of the graft could facilitate the establishment of tolerance [8,29]. Importantly, a past history of acute rejection was common (eight biopsy-proven in 61 patients), as reported previously [17,23,25,30,34,36]. Taken together, data on the preliminary characteristics of tolerant patients support the view that tolerance is an acquired condition rather than a constitutive predisposition, the result of favourable matching or immunosenescence.

The state of tolerance results from an active process specific to the allograft. During their immunosuppression-free period, tolerant patients experienced fewer infections compared to the period before drug weaning and compared to stable, matched controls under immunosuppression [29]. Ballet and colleagues have shown that some tolerant patients, although not all, were able to mount a humoral response following influenza vaccination [65].

A few histological examinations of tolerant allografts have been published [21,24,27,29–31,36,41]. Biopsies from stable tolerant patients revealed lymphoid infiltrates in peritubular regions of the cortical interstitium, without tubulitis [41]. Such infiltrates are common in well-functioning allografts [66]. Compared to stable and rejecting patients, tolerant patients displayed an increased proportion of forkhead box protein 3 (FoxP3)-positive lymphocytes and distinct expression of several proteins

involved in the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway [41]. Interestingly, FoxP3 CD4<sup>+</sup> T cells were not distributed uniformly in the interstitium, but were found in cell aggregates. These agglomerates could be part of tertiary lymphoid structures [31] and the cortical interstitium is notable for the presence of resident dendritic cells [67]. Xu and collaborators demonstrated the presence of numerous transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1<sup>+</sup> mononuclear cells inside the infiltrates, mainly CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup>. Together, those findings are compatible with the presence of two distinct populations of regulatory T cells (T<sub>regs</sub>) within tolerized allografts, including natural CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>, thought to suppress immune responses in a contact-dependent manner, and adaptive TGF- $\beta$ -producing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T<sub>regs</sub> [T helper type 3 (Th3)/TGF- $\beta$ ] [68]. In models of metastable tolerance in Rhesus monkeys, the disappearance of TGF- $\beta$  cells coincided with the onset of rejection [69]. It is thought that inflammation + TGF- $\beta$ -induced T<sub>regs</sub> (Tr1/IL10) could give rise to a more stable tolerance [35].

Operational tolerance seems to be a metastable condition that could be limited to several years or persist for decades [8,30]. Biopsies performed in cases of declining function have shown two main patterns, either lesions resembling antibody-mediated rejection with characteristic peritubular capillaritis, lymphomacrophagic infiltrates and glomerulitis, slight immune deposits but, notably, no C4d staining, or nephroangiosclerosis with interstitial fibrosis and tubular atrophy [29,30]. To our knowledge, a single case of confirmed humoral rejection with positive anti-C4d staining has been described [36]. Circulating anti-HLA antibodies were reported in both histological patterns [30] and do not seem to predict graft outcome reliably [48].

### Biomarkers: somewhere between hope and reality

In contrast to liver recipients, kidney recipients who fail to develop tolerance during an immunosuppression weaning protocol are at risk of irreversible graft rejection and loss of function [49,70]. Today, the lack of clinically validated biomarkers is a crippling obstacle to bringing tolerance to a larger set of kidney recipients. Immediate objectives for the use of biomarkers would be to detect already tolerant patients and also patients who might potentially develop tolerance in the future, presenting a pivotal signature indicating their aptitude or not for further tapering of immunosuppressive drugs. As operational tolerance is not stable in nature – actually no more in the experimental context [1,69,71] than in humans [6,8] – the ultimate goal would be to identify actionable biological targets in order to programme or refresh selective tolerance as necessary.

### Antigen-specific assays for measuring tolerance

*T cell reactivity.* Consistent with the original description of tolerance by Billingham and colleagues [1], *ex-vivo*

assessments of donor antigen-specific T cell responses were explored early on as a way to detect or predict tolerance. Those assays measured either: (1) proliferation of recipient T cells in a mixed lymphocyte reaction (MLR) [23,26], (2) lysis of donor T cells in a cytotoxic T lymphocyte assay (CTL) [23] or (3) production of interleukins with either an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), enzyme-linked immunospot assay [interferon (IFN)- $\gamma$  ELISPOT] [32] or intracellular staining [33]. A systematic description of these assays is beyond the scope of this review and can be found in [72,73].

Most of the above tests were used to investigate T cell responses towards antigens presented by donor cells (direct pathway). They provided evidence that operationally tolerant patients were hyporesponsive towards donor antigens while fully responsive to third-party donors [23,26,32] and microbial antigens [19]. However, hyporesponsiveness of T cells against donor antigens in CTL or MLR has also been a common finding in stable immunosuppressed long-term kidney recipients [74–76]. Donor-specific hyporesponsiveness is not synonymous with tolerance. In support of that, Weimar *et al.* described a patient who was diagnosed with acute rejection weeks after having stopped all his medication, despite favourable CTL results [77]. Nevertheless, several longitudinal studies support the idea that the assessment of direct T cell responses by CTL-derived or IFN- $\gamma$  ELISPOT methods might be a valuable tool in predicting limited uneventful drug tapering, either from steroids [78,79], anti-metabolite [77,80] or calcineurin inhibitors [81,82].

So far, the use of such cellular assays has been hindered by the lack of large and consistent studies [83] and low practicability. Indeed, cellular tests require recurrent live donor cell samples [72]. This could, however, be overcome by cell culture followed by cryopreservation [21,84]. Finally, there has been a concern that this approach was neglecting exploration of the indirect pathway of allorecognition [72,85], thought by many to have a critical role in driving long-term transplant immunogenicity.

More recently, authors have favoured assays that are able to explore the indirect pathway over traditional MLR and CTL, and have tried to focus upon the most relevant memory T cells [85] that are only weakly eliminated by traditional depleting agents [86]. Indirect allorecognition testing is feasible on condition that donor antigens be presented as protein lysates together with recipient antigen-presenting cells [72]. In kidney transplantation, this is performed via ELISPOT [87] or *trans-vivo* delayed-type hypersensitivity (tvDTH) assays [27]. Basically, the tvDTH assay consists of injecting sensitized recipient T cells, collected after transplantation, with donor antigens and recipient antigen-presenting cells into the footpad or the ear of a severe combined immunodeficiency mouse. Responding recipient cells will produce a DTH reaction locally, apparent as a swelling, which can be measured with a calliper.

This assay was the only one to be explored among tolerant kidney recipients. First, Van Burskirk *et al.*, in a study of three tolerant patients, demonstrated a selective absence of tvDTH responsiveness to donor antigens. Importantly, the non-responsiveness was transmissible to control immunogenic recall antigens [either tetanus toxin or Epstein–Barr virus (EBV) lysates] injected with donor antigens into the same footpad, suggesting the presence of an active suppressive mechanism triggered by donor proteins [27]. The same team from the University of Wisconsin showed, in non-human tolerant primates and in humans, that this process relied upon CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> adaptive T<sub>regs</sub> [31,69]. Also, it was dependent upon cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and TGF- $\beta$  or IL-10 [27,28].

Once more, defective indirect responses are not the privilege of tolerant patients and can be observed in half of stable kidney recipients [87,88] with no clear prognostic significance [88]. However, Haynes *et al.* observed that stable recipients displayed a wider range of tvDTH response intensities compared to the uniform unresponsiveness of tolerant recipients. Actually, there was a progression of tvDTH responses between, in ascending order, tolerant patients, stable patients on steroid monotherapy and on standard therapy and, finally, rejecting patients. They demonstrated that tvDTH responses in rejecting patients required both IL-17 and IFN- $\gamma$ . Conversely, the lack of tvDTH responses in tolerant patients ( $n = 11$ ) relied upon TGF- $\beta$  but not on IL-10 (three patients explored), evoking a T regulatory pattern of the Th3 subtype.

Also, and importantly, aside from tvDTH unresponsiveness, donor-specific regulation, the capacity of donor cells to transfer their hyporesponsiveness to recall antigens injected at the same place, seemed to be notably less frequent in stable immunosuppressed recipients [89] than in tolerant recipients. In a cohort of 71 stable kidney recipients, donor regulation was correlated strongly with the quality of the HLA matching, thus indirectly offering a possible explanation for the better graft survival observed with better matching [90]. In a longitudinal study of 32 stable kidney recipients, donor-specific regulation capacity neatly predicted the outcomes following steroid withdrawal [91]. To date, however, clinical evaluations and possible applications of tvDTH are limited by the cumbersome technique, the requirement of mice and the need for high cell numbers.

*B cell sensitization.* The detection of DSA, a current practice in clinical transplantation, appears to be less sensitive with current methods than T cell sensitization [88,89]. The appearance of *de-novo* DSA has been associated with poorer prognosis in renal transplantation, but recent studies have shown that DSA toxicity depends upon the antibody isotype and capacity to fix complement fractions [92,93]. The appearance of *de-novo* DSA in tolerant

patients does not seem to preclude, in all cases, the continuation of tolerance [48]. Further studies on DSA subtypes are needed. It is undisputable that the presence of a specific alloimmunization is not, *per se*, an irreconcilable obstacle to tolerance, as is proven every day in the fetomaternal model of tolerance [94].

### The search for antigen-independent biomarkers

There is an important need to find a practicable biomarker that allows for repeated and non-traumatic monitoring and is affordable, sensitive and highly specific in order to avoid abusive drug minimization in patients. The ideal biomarker would recapitulate, without delay, the situation inside the allograft. Urine seems to be the most pertinent fluid in our context, but its handling often requires tricky and limiting procedures [95,96]. Blood gene expression studies and cell phenotyping have been the most explored routes and are developed in the following sections.

Two methodological issues have complicated the development of blood signatures in the field of kidney transplantation. The first difficulty in finding a reliable biomarker of tolerance lies in the rarity of patients. This constraint has been overcome through the development of large research consortia in the United States ['Immune Tolerance Network' (ITN)] and in Europe ['Indices of Tolerance' (IOT), 'Reprogramming the Immune System for the Establishment of Tolerance' (RISET), 'Genetic Analysis and Monitoring of Biomarkers of Immunological Tolerance' (GAMBIT Study), 'The ONE Study', 'Bio-DRIM']. These include active initiatives and those that have just begun (for details see [97]). Beyond their ability to recruit patients, these initiatives have added value in that they have developed standardized operating procedures that promote patient comparisons. Recently, the DESCARTES European Renal Association–European Dialysis and Transplant Association (ERA–EDTA) working group has taken advantage of its unique Europe-wide network devoted to kidney transplantation to support these efforts by collecting biological samples from very rare operationally tolerant patients in order to support further molecular studies ['Tolerance MOlecular and Genome-wide studies with Renal Allograft recipient Material' (TOMOGRAM study), ongoing].

The second challenge in studying potential biomarkers of tolerance is the lack of an adequate control population [95], illustrated in Fig. 1. Basically, operationally tolerant patients have been compared to patients without transplant (e.g. healthy volunteers) or to transplanted patients with various degrees of kidney disease and immunosuppression (e.g. stable transplants, under standard or reduced immunosuppression, or rejecting patients, most often chronically rejecting, as it has been postulated that they display a more distant gene expression profile from tolerant patients than patients in acute rejection [47]).

In addition, as illustrated in Fig. 1, countless confounding factors may influence transcriptomic signatures including personal features (age, gender, ethnicity or other genetic background features [98,99]), environment (transplant, immunological, and infectious history [100]), medications, sampling procedures [101] or blood cell subset composition [102]. Regarding the limited number of tolerant patients enrolled in studies, all these sources of heterogeneity promote bias and complicate generalization. Finally, in the absence of a clear gold standard for diagnosis of operational tolerance, it is likely that some tolerant patients who are ignorant about their condition contaminate the control groups. Depending on the studies, tolerance biomarkers were detected in zero (at 1 year post-transplant) to one-fourth of the presumed stable controls [42,47,103–105] (illustration in Table 3). This overlap makes comparison less powerful.

### Phenotypical studies of circulating immune cells

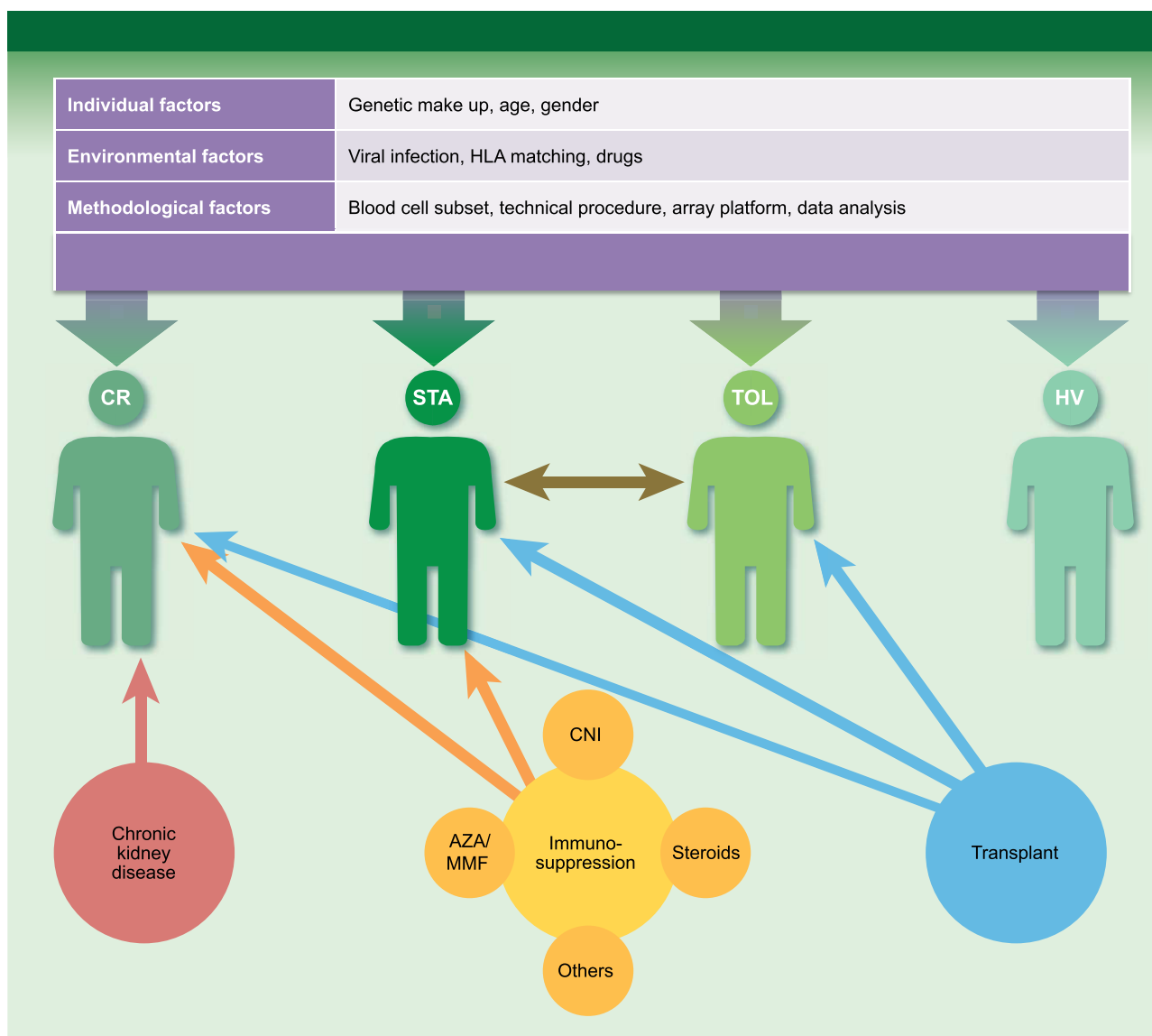
Flow cytometry analysis allows the description of cell subset composition in operationally kidney recipients.

*T cell counts seem to be only minimally altered.* Operationally tolerant patients display similar [32] or reduced [42] numbers of CD3<sup>+</sup> T cell counts compared to healthy subjects. Similar proportions of CD8<sup>+</sup> effector, CD8<sup>+</sup> memory and CD4<sup>+</sup> T cells have been noted [42,107,108]. Within the CD4<sup>+</sup> T cell subset, Sagoo *et al.* observed an increased expression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>int</sup> T cells that can broadly be termed 'activated T cells'. Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells and FoxP3 transcripts are similar between tolerant and healthy volunteers [32,38,107], while they are decreased in chronically rejecting patients [38,107].

The apparent lack of modification of the global CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> FoxP3 T<sub>reg</sub> population in spontaneously tolerant patients may come as a surprise, as their role in establishing tolerance has been documented widely [109]. We illustrate below how current blood cell immunophenotyping methods have masked the presence of genuine expansions of donor-specific T<sub>reg</sub> populations in operationally tolerant patients.

First, blood levels of FoxP3 T cells are most probably poor surrogates of the situation inside the graft. Indeed, direct investigations on biopsies from operationally tolerant kidney recipients reveal a proportional increase in FoxP3 expression in allograft infiltrates compared to stable, rejecting patients and healthy controls [41]. In subclinical and acute rejections alike, intragraft and urinary explorations support the view of locally enhanced FoxP3 T cells playing a role in counter-regulation towards deleterious alloimmune responses [110,111]. However, data are less clear in chronic injuries [111].

Secondly, it appears that T cell regulatory functions may actually dissociate from FoxP3 mRNA expression [112] and may be appraised more adequately by the



**Fig. 1.** The multiplicity of factors that influence blood transcriptomic signatures. The four men represent specific patient group signatures (CR, STA, TOL and HV represent patients in chronic rejection, stable patients under immunosuppression, operationally tolerant patients and healthy volunteers, respectively). In the absence of univocal diagnostic criteria for operational tolerance, the STA group is contaminated by unrecognized tolerant patients. The boxes above the figures contain non-exhaustive lists of confounding factors that can alter a group's signature if they arise as uncontrolled stratification factors. The circles below the figures represent the factors that will affect certain patient groups selectively. None of the groups are distinct from tolerant patients solely by lack of tolerance. Overall, the heterogeneity of factors, particularly in the context of small group sizes, promotes bias and complicates generalisation.

demonstration of DNA demethylation at the FoxP3 gene locus [113]. As proof of concept, based on this last method, Braza *et al.* showed a specific increase in CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>high</sup> memory regulatory T cells in the blood of tolerant kidney recipients compared to rejecting or stable patients and healthy controls [114]. In addition, they demonstrated that the memory T<sub>regs</sub> from tolerant subjects had intact suppressive properties *in vitro* and, with regard to healthy volunteers, harbour higher surface levels of CD39 and glucocorticoid-induced tumour necrosis factor (TNF)-

related receptor (GITR), two molecules with established immunoregulatory functions.

*Patent changes in B cell distribution.* Several groups have consistently shown increased numbers and percentage of B cells within peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in tolerant recipients compared to various groups of immunosuppressed recipients [32,33,35,106,107,115]. With very few exceptions [32], B cell counts were similar to those of healthy controls. Tolerant patients consistently exhibited a

Table 3. Large collaborative genome-wide expression studies in blood

Study reference and characteristics	Study minimal signature	Main highlighted pathways*	Diagnostic capabilities	Signature frequency among stable immunosuppressed patients
Brouard [47] Number of tolerant patients Training set: 5 test set: 12 Cells PBMC Array Custom cDNA lymphochip	AKR1C1, AREG, BRRN1, BTLA*, BUB1B, C1S, CCL20*, CDC2, CDH2, CHEK1*, DEPDC1*, DHRS2, ELF3, HBB*, IGFBP3, LTB4DH, MS4A1 (CD20), MTHFD2, PARVG, PLXNB1, PODXL, PPAP2C, RAB30*, RASGRP1, RBM9, RHOH, SLC29A1, SMILE*, SOX3*, SPON1*, SYNGR3, TK1, TLE4*	When focusing on the genes that were also statistically significant by PCR (*), we see that several of them are involved in: Cell cycle (CCL20, CHEK1) Cell communication: chemotaxis (CCL20), adhesion (SPON1), co-stimulation signalling (BTLA) Regulation of or GTPase activity (CCL20, DEPDC1, RAB30) Calcium ion homeostasis (CCL20, SPON1) Neuronal development (SOX3, SPON1)	In comparison to CR Specificity 99%	8.3% (n = 1)
Sagoo [32]: IOT signature Number of tolerant patients Training set: 11 Test set: 25 Cells Whole blood Array RISET 2.0 Agilent custom microarray	CD79B <sup>F</sup> , TCL1A <sup>F</sup> , HS3ST1, SH2D1B <sup>F</sup> , MS4A1 (CD20) <sup>F</sup> , TLR5, FCRL1 <sup>F</sup> , PNOC, SLC8A1, FCRL2 <sup>F</sup>	B cell-related genes <sup>(F)</sup> Heparan sulphate biosynthetic enzyme family (HS3ST1) Toll-like receptor family (TLR5) Ligand of the opioid receptor-like receptor OPRL1 (PNOC) Calcium ion homeostasis (SLC8A1)	In comparison to CR/CAN and various STA Specificity 89%, Sensitivity 86%, PPV 71%, NPV 93%, In comparison to CR/CAN, various STA and HC Specificity 80%, Sensitivity 81%	Some patients
Newell [33] Number of tolerant patients Training set: 19 Test set: 6 Cells Whole blood Array Affymetrix whole-genome	IGKV1D-13, IGKV4-1, IGLL-1	All 3 are expressed during the differentiation of B cells from pre- to mature B cells or during B cell activation-induced transition.	In comparison to STA PPV 86%, NPV100%	16.7% (n = 1)
Lozano [106] Number of tolerant patients 3 × 12 independent subjects Cells PBMC Array Affymetrix whole-genome	ADAM28 <sup>F</sup> , AFF3 <sup>F</sup> , ASB2, ASPM, BACE2, BTLA <sup>F</sup> , CD19 <sup>F</sup> , CD200 <sup>F</sup> , CD22 <sup>F</sup> , CD79A <sup>F</sup> , CNOT2, DTX1 <sup>F</sup> , EBI1 <sup>F</sup> , FCER2 <sup>F</sup> , FCRL2 <sup>F</sup> , FNBP4 <sup>F</sup> , GNG7 <sup>F</sup> , HLA-DOB <sup>F</sup> , ID3 <sup>F</sup> , IGHM <sup>F</sup> , IGKC <sup>F</sup> , IGLL3 <sup>F</sup> , KRT18, MGC29506 <sup>F</sup> , MS4A1 <sup>F</sup> , PEX3, PLEKHG1 <sup>F</sup> , PNOC <sup>F</sup> , QRSL1 <sup>F</sup> , RFC1, RFC4, RPS21, SWAP70 <sup>F</sup> , ZNF264, ZNF606.	B cell-related genes <sup>(F)</sup> Protein catabolism (ASB2, BACE2) Cortex development/function (ASPM, BACE2) Cell cycle (CNOT2, KRT18) Cell communication: adhesion (KRT18) Cytoskeleton organization/vesicular trafficking (KRT18, PEX3) Regulation of nucleic acid metabolism (RFC1, RFC4, RPS21, ZNF264, ZNF606) DNA-/metal-binding protein (ZNF264, ZNF606)	Operationally tolerant recipients differed from STA but not from HVs Predictive accuracy not determined	Not available

Table 3. Continued

Study reference and characteristics	Study minimal signature	Main highlighted pathways*	Diagnostic capabilities	Signature frequency among stable immunosuppressed patients
Rocdder [42] Number of tolerant patients Training set 1: 16 Test set: 31 Training set 2: 17 Cells Whole blood Array Agilent whole-genome	KLF6, BNC2, CYP1B1	BNC2: DNA-/metal-binding protein, KLF6: leucocyte growth, development, differentiation, activation CYP1B1: cytochrome P450 family	In comparison to STA and HVs Specificity 90.2%, Sensitivity 84.6% ROC 95%	7.3% (n = 11)
Baron [105] Number of tolerant patients 50 from 6 data sets being in turn testing set Methods: Meta-analysis of 6 data sets	TCL1A <sup>‡</sup> , MZB1 <sup>‡</sup> , CD22 <sup>‡</sup> , BLK <sup>‡</sup> , MS4A1 <sup>‡</sup> , CD79B <sup>‡</sup> , BLNK <sup>‡</sup> , FCRL2 <sup>‡</sup> , IRF4, ID3 <sup>‡</sup> , AKR1C3, HINT1, RFC4, ANXA2R, CD40 <sup>‡</sup> , FCER2 <sup>‡</sup> , CTLA4, AKIRIN2, EPS15, PLBD1	B cell-related genes (‡) T cell differentiation (IRF4, CTLA-4) Regulation of or GTPase activity (AKR1C3) Calcium ion homeostasis (AKR1C3, HINT1, EPS15) Apoptosis signalling (HINT1) Regulation of nucleic acid metabolism (RFC4) Toll-like receptor downstream signalling (AKIRIN2)	In comparison to STA Specificity 90%, Sensitivity 94.4% PPV 85%, NPV 96.4% ROC 91.7%	3% (n = 8)
Rebollo-Mesa [44] Number of tolerant patients Training set: 11 Test set: 14 Cells Whole blood Method Fluidigm Bio-Mark quantitative real-time PCR (qPCR) platform	ATXN3, BCL2A1 <sup>‡</sup> , EEF1A1 <sup>‡</sup> , GEMIN7, IGLC1 <sup>‡</sup> , MS4A4A, NFKBIA, RAB40C, TNFAIP3	Phospholipase activity (PLBD1) Regulation of nucleic acid metabolism (GEMIN7, NFKBIA, TNFAIP3) Cell communication activities (RAB40C) Transcription factor activity (EEF1A1, NFKBIA, TNFAIP3) B cell-related genes (‡) (only IGLC1 seems to be observed exclusively in B cells)	In comparison to immunosuppressed patients (STA, CR) Sensitivity 92%, Specificity 88% ROC = 81%	11.6% (n = 20)

\*Either reported by the authors or as deduced by Uniprot database (<http://www.uniprot.org/>).

Gene names in bold type represent the gene names or close family members encountered in several signatures.

PBMC, peripheral blood mononuclear cells; CAN, patients diagnosed with a chronic allograft nephropathy; CR, chronic rejection; HVs, healthy volunteers; STA, stable patients under immunosuppression; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; ROC, receiver operating curve.



redistribution between B cell subsets characterized by expanded naive ( $CD20^+CD38^{low}CD24^{low}$ ) and transitional ( $CD20^+CD24^{high}CD38^{high}$ ) populations in comparison to immunosuppressed patients [32–35,116] and, occasionally, to healthy subjects [33]. Consistent with this finding, Chesneau and colleagues reported a decreased frequency of terminally differentiated plasma cells [116] in tolerant recipients compared to stable transplanted patients, suggestive of a truncated differentiation profile. However, discordant observations were made with regard to memory subsets [32,33,115,116], which are perhaps related to the choice of different surface antibodies (summarized in [50]).

In line with these observations, several fundamental [117,118] and mechanistic studies presented here support the view that B cells play a critical role in transplant tolerance [119]. B cells taken from tolerant patients proliferate normally *in vitro* but display a regulatory phenotype, attested by the expression of inhibitory signals [decreased  $Fc\gamma RIIA/Fc\gamma RIIB$  mRNA ratio, increased B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1 (BANK1) mRNAs, increased surface expression of CD1d and CD5] [115] and an enhanced production of IL-10 upon stimulation compared to stable recipients and/or healthy controls [33,39,43,115,116,120]. Regulatory B cells have been shown to inhibit  $CD4^+CD25^-$  effector T cell proliferation and to promote their apoptosis through a contact- and granzyme B-dependent, TGF- $\beta$  and IL-10-independent mechanism [120]. This latter point is, however, debated, as another report in tolerant patients has advanced that IL-10 has a central role in mediating CD86 down-regulation in B cells and indirectly decreases T cell proliferation [43]. B cells with an inhibitory profile are not found exclusively in tolerant patients, but are more prevalent compared to healthy controls and stable transplants [115,120]. Their number is IL-21 dose dependent and, in turn, in tolerant patients only, increases the number of IL-21-producing T cells [120]. The skewed B cell distribution results from a unique differentiation profile driven along actively with an increased apoptosis rate [116]. Regulatory B cells ( $B_{regs}$ ) have been recognized to play a role in various clinical situations [121]. However, no specific biomarker has been identified so far. Different levels of maturation are compatible with this regulatory phenotype. It is not yet clear whether they play a determinant role in the development of tolerance or are just involved in its maintenance.

Interestingly, B cells that look to be the hallmark of kidney tolerance do not appear to play a major role in liver tolerance [106,122]. Blood transcriptomic and cellular features of liver tolerance have predominantly designated NK and  $\gamma\delta$  T cell receptor ( $TCR^+$ ) T cells as the major players.

*Many cell subsets are involved.* In renal transplantation, some groups have also reported changes in other blood cell populations [32,33,42]. A significant shift towards higher

numbers and ratios of NK cells compared to stable transplants or healthy controls has been reported [32,42] but, again, inconsistently [107]. A shift toward monocyte-derived dendritic cells at the expense of T cells has also been reported compared to both stable and tolerant kidney recipients [42].

Currently, numerous cell populations are recognized, through immunophenotyping, gene signature (below) and/or mechanistic studies, to play a role in driving or maintaining allograft tolerance. The presence of regulatory cells has been attested by their regulatory phenotype and by their suppressive properties *in vitro*. It is probable that no single cell subset alone is sufficient to trigger graft acceptance but that, altogether, they represent a complex tolerogenic interplay.

### Blood transcriptional signatures

Several groups have worked to identify, in the peripheral blood, an enhanced gene expression signature that would characterize operationally tolerant kidney recipients. Here we chose to focus upon whole genome microarray-based transcriptional profiling studies, confirmed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), applied to relatively large cohorts, and either cross-validated or validated on external array platforms. The main findings from these studies are summarized in Table 3.

The prototype for these studies was that of Brouard *et al.* [47], in which they identified 2986 genes of 11 820 spotted on a custom cDNA lymphochip that were expressed differentially between tolerant and rejecting patients. The identified genes suggested a pattern of reduced co-stimulatory signalling, immune quiescence, apoptosis and memory T cells in tolerant patients. Intriguingly, 27% of those genes are assumed to be regulated by TGF- $\beta$ , though TGF- $\beta$  protein and RNA levels were similar in both groups. Among differentially expressed genes, they identified a minimal set of 33 genes that were expressed abundantly and that allowed tolerance detection with a specificity of 99%.

Newell *et al.* [33], from the ITN, studied a different patient cohort, with distinctly better HLA matches (see Table 2). They first compiled a 228-candidate gene list based on an original whole-genome microarray study (Affymetrix array), on previously identified transcripts associated with liver transplant tolerance [123], and on relevant biological targets. They performed multiplex PCR and settled on a set of 31 transcripts that were expressed differentially between tolerant subjects compared to stable patients but not to healthy volunteers. Most of the genes identified were B cell-specific, with many encoding  $\kappa/\lambda$  light chains of immunoglobulins. None of the transcripts associated with liver tolerance were identified in this setting. From those 31 gene transcripts, they delineated a reduced set of three genes [immunoglobulin kappa variable

(IGKV)1D-13, IGKV4-1, immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (IGLL-1) with excellent predictive capabilities in an independent subgroup of their cohort.

In subsequent studies, the same team and others demonstrated that IGKV1D-13 transcripts remained persistently elevated, with either IGLL-1 or IGKV4, in tolerant patients over years [34] and increased over time among calcineurin inhibitor-treated patients [34,103]. Interestingly, IGKV1D-13 was also increased in patients rendered tolerant via induction of transient mixed chimerism [11,124] and in stable transplants on sirolimus monotherapy [89], suggesting that the signature may be a common theme to various tolerogenic strategies [34].

Taking advantage of the original gene expression data set of Newell and colleagues [33], Sagoo *et al.* [32] identified 170 genes, very enriched in B cell-related genes, that were expressed differentially among all patient groups in both platforms, i.e. the RISET Agilent 2.0 custom microarray and the one used by Newell *et al.* As partially expected from the study design, the identified genes were particularly enriched in B cell-related genes, but also in protein tyrosine kinase and other T cell activation-related genes. Through an additive binary regression model, they were able to build receiver operating curves (ROC) with optimal diagnostic capabilities with a restricted set of 10 genes. Of interest, three of those 10 highly discriminating genes [CD79B, T cell leukaemia/lymphoma 1A (TCL1A) and membrane-spanning 4A (MS4A1) (CD20)] are B cell transcripts that were validated further in other transplantation studies. TCL1A and MS4A1 were found eventually to be up-regulated in tolerant recipients in other analyses [34,113]. In addition, all three genes were reported to be up-regulated in stable rejection-free patients [125,126]. TCL1A is an oncogene expressed in naive and transitional B cells and directly reflects their abundance [127]. This gene promotes B cell survival and is low or absent from mature B cells. The close relation between TCL1A expression, immature populations of B cells with recognized suppressive properties and immune activation suggests fine regulation of immune responses all along the spectrum of alloimmunity. Also, the over-expression of an oncogene in renal operational tolerance is intriguing. It raises the possibility that, among tolerant patients who stopped their treatment due to a malignancy, a common latent immunosuppression predisposed them to both cancer while under immunosuppression and, finally, tolerance.

Lozano *et al.* [106] compared the gene expression patterns from the last two cohorts described above [32,33] with 12 tolerant patients from Nantes. They found that a limited number of 35 common transcripts (more than 3921 for Newell, 433 for Sagoo *et al.* and 524 for Lozano) were expressed differentially between tolerant and stable transplanted patients in the three cohorts. Twenty-four transcripts of the 35 were related closely to B cell function.

One conclusion derived from these early works may be that, surprisingly, tolerance signatures eventually indicate shared pathways but have very few genes in common. This heterogeneity has been attributed to small sample sizes, a lack of standardization in sampling methods and data analysis and to wide patient and cellular heterogeneity. Also, it is also possible that several different homeostatic mechanisms allow for tolerance development. The pathways to tolerance could be innumerable, and may take into account personal immune history combined with unique heterologous immunity, memory cell populations and environmental factors [41,128]. Capturing common trends among a huge number of tolerogenic combinations is complicated further by the rarity of tolerant patients.

Several authors have also reported the poor overlap between liver and kidney transplant tolerance signatures [33,106]. In their study, Lozano and colleagues observed that only three genes were expressed differentially in both kidney- and liver-tolerant patients when compared to their respective controls (NF- $\kappa$ B2 – involved in NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK)/NF- $\kappa$ B signalling and germinal centre formation, MPAK1, involved in the Ras pathway, and HIPK2 – that promotes p53/TP53-mediated cellular apoptosis and angiogenesis). In fact, liver- and kidney-tolerant recipients appear to have deeply contrasting gene expression profiles. Using blood cell lineage-specific transcripts, Lozano *et al.* showed that B cell-specific transcripts best characterize tolerant kidney transplants but were down-regulated in liver-tolerant recipients and, conversely, NK-related genes were up-regulated in liver- but not in kidney-tolerant recipients. The discrepancies observed between liver- and kidney-tolerance signatures may be due, at least in part, to methodological differences, as was discussed earlier. However, several lines of evidence suggest that liver and kidney tolerance also differ mechanistically. In liver transplantation, an important prospective study by Bohne and colleagues revealed that tolerant recipients displayed altered iron homeostasis, demonstrated by intragraft transcriptomic and histomorphological studies, well before drug minimization [129]. Compared to non-tolerant liver recipients, tolerant patients exhibited enhanced iron deposits in periportal hepatocytes, higher serum ferritin levels and, compared to normal individuals, lower hepcidin/ferritin ratios. Because hepcidin is secreted by hepatocytes, the authors hypothesized that adjustments in iron metabolism may be part of liver-specific tolerogenic mechanisms needed to deal with the continual arrival of antigens via the portal venous blood.

In renal transplantation, repeated findings of B cell-related biomarkers in tolerance signatures suggest that these cells may play an active role in the development and/or the maintenance of tolerance. Using IFN- $\gamma$  ELISPOT assays, Shiu *et al.* [130] demonstrated recently the major contribution of B cells in driving effective *versus* regulatory indirect T cell responses in the setting of antibody-

mediated rejection ( $n = 65$ ). Prior to this, Haynes and colleagues had failed to demonstrate that B cell antigen presentation was necessary for generating suppressive indirect T cell responses in a tvDTH-based study on tolerance. However, their conclusion relied upon only two patients, and further experiments were needed [35]. In the liver, multiple, specialized, non-B cells are responsible for antigen presentation with the aim of dampening local inflammatory responses, so the absence of a B cell signal in liver tolerance signatures should not come as a surprise. In conclusion, tolerance signatures are organ-specific and not interchangeable [131]. This is consistent with the daily experience of transplant clinicians. Liver tolerance is relatively common, kidney tolerance is rare and other cases of transplant tolerance (heart, lungs) seem anecdotal.

In an attempt to reconcile discordant renal data, Baron *et al.* [105] recently performed a meta-analysis of six earlier data sets [32,33,47,106,132]. Beyond the confirmation of the strong involvement of B cells, they pointed out a role for CD4<sup>+</sup> T cells and an inhibition of CD14<sup>+</sup> monocyte-related functions. From an initial data set encompassing 1846 differentially expressed genes between stable and tolerant kidney recipients in all studies, they were able to isolate 20 genes with good classification (91.7%) in an external validation cohort. The expression of those 20 genes in tolerant recipients was superimposed on that of healthy subjects.

Early biomarker studies often focused upon identifying a biomarker that would, as a priority, discriminate tolerant recipients from stable transplanted ones from the perspective of drug-weaning trials [32,33]. Nevertheless, it was a surprise to observe how close tolerant recipients were to healthy subjects. From a physiopathological point of view, this raised the question of whether tolerant patients under immunosuppression had a 'reinitialization of the immune system resulting in recognition of the transplanted graft as self' [123]. In this scenario, alloreactive cells would have been deleted centrally. However, a blood signature, based on unsorted immune cells, would lack the sensitivity to detect subtle transcript changes restricted to particular cell subsets that would differentiate tolerant from healthy subjects. Also, pressing questions emerged regarding whether most of the previously identified tolerance signatures might just mirror the absence of immunosuppression [35]. It seems obvious now that several of the first-generation tolerance signatures were influenced deeply by immunosuppression [44,103,133]. Whether immunosuppressive drugs rightly perturb tolerance signatures in line with their tolerogenic properties or act purely as confounding factors is not clear. However, until we know, it seems prudent to look for tolerance signatures that account for the effects of immunosuppressive regimens to limit sources of error.

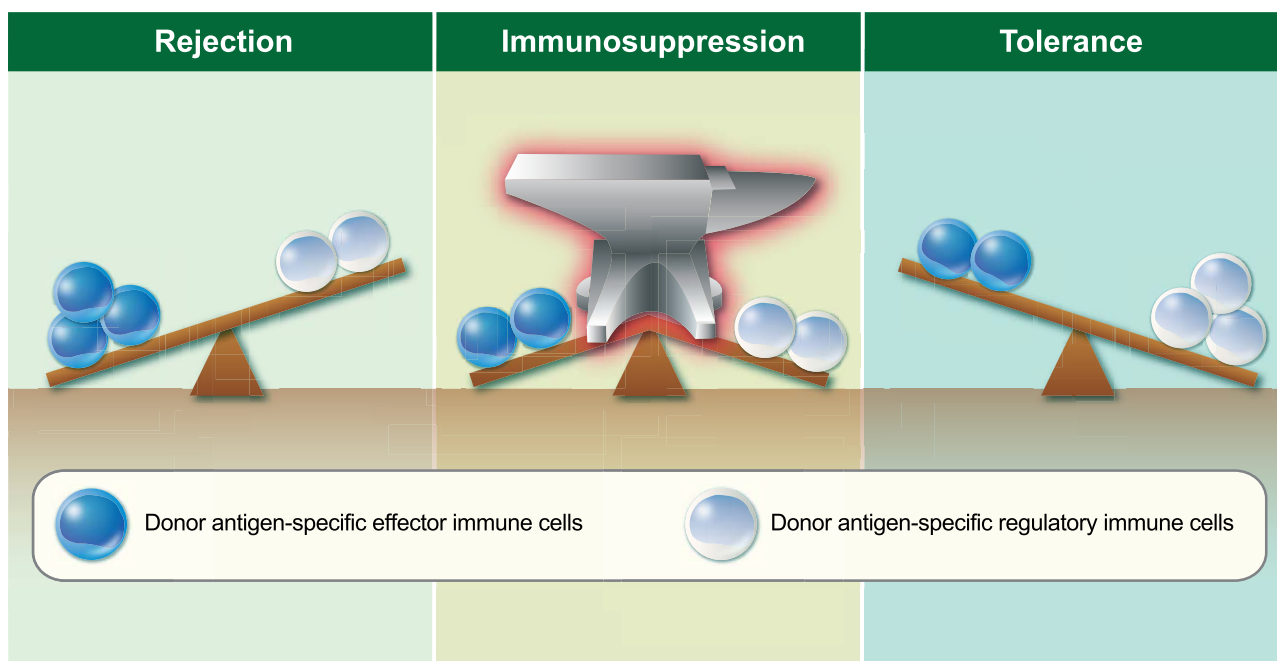
In an effort to build a signature that is independent of the immunosuppressive regimen, Rebollo-Mesa *et al.* applied a multivariate linear model for immunosuppressive

drugs on the IOT data set [32] and determined the level of immunosuppression-independent expression for each gene [44]. The genes best discriminating between tolerant and stable patients were connected with NF- $\kappa$ B, CD40, TNF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and glucocorticoid networks. The first two can be classified as B cell-related. The team was able to refine this selection into a nine gene-signature with good predictive value in the GAMBIT validation cohort by qPCR measurement (Table 3). This signature appeared to be influenced only minimally by immunosuppressive drugs, was stable over time and was almost two times less prevalent in healthy controls (45 *versus* 85%). No gene overlapped with the previous IOT signature. In line with this, this new signature predicts completely different individuals as being tolerant in the group of stable patients from the IOT cohort.

The Rebollo-Mesa *et al.* publication brought into question the previously published evidence. In our opinion, although such a study is progress, one should be careful before rejecting all the conclusions of the previous studies. In particular, the strong B cell signal in transcriptomic signatures was also consistent with experimental data (above), along with repeated occurrences of multi-modal markers that distinguished tolerant from healthy controls. Paradoxically, the systematic gap between kidney and liver transplant signatures of tolerance also conveys that those signatures, even if partly impaired, were due to more than the simple absence of immunosuppressive drugs.

The recent multi-modal biomarker study by Roedder *et al.* contributed markedly to deciphering the cellular landscape in operational tolerance. They first used a whole-genome Agilent microarray to identify a minimal set of 21 genes that discriminate operationally tolerant ( $n = 16$ ), rejecting and healthy controls in a three-class comparison. Seventeen of 21 genes were validated by qPCR in a second external cohort of tolerant ( $n = 31$ ) and stable patients. Finally, they circumscribed a minimal set of three genes – Kruppel-like factor 6 (KLF6), basonuclin 2 (BNC2) and cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1 (CYP1B1) – which predicted patient groups in a third independent cohort with 17 additional tolerant patients with 95% accuracy. The primary 21-gene set pointed towards apoptosis networks centred on TNF, IL-6, IL-4, the complement system and, again, B cell activation pathways. Interestingly, CYP1B1 and BNC2 were reported previously in studies on kidney and liver tolerance, respectively [33,47,129].

Restarting from those 21 genes, they identified the cell populations over-expressing each of them in a large public database. They found that seven, seven and six genes of the 21 were expressed characteristically in dendritic cells, B cells and NK cells, respectively. According to a hypergeometric analysis, this could not be expected by chance with this array. They noticed a parallel enrichment in dendritic



**Fig. 2.** A schematic view of alloreactive immune cells during kidney transplantation. Unique unbalanced compositions of alloreactive cells, varying in subset, function, reactivity, and memory ensure graft rejection or acceptance. Current immunosuppressive regimens are thought to crush down all alloreactive responses and beyond. Immunosuppression is compulsory to avoid rejection but to a certain extent – we are not yet able to determine individually – compromises the rise of regulatory responses needed to promote long-term graft acceptance, tolerance and reduced reliance on immunosuppression.

cells and NK cells, but not in B cells, in the blood of tolerant patients compared to healthy controls. Finally, they showed that their three-gene signature was reproducible with sorted CD11c<sup>+</sup> dendritic cells only. Taken together, Roedder and co-workers brought evidence for a strong role for new players, dendritic cells and NK cells in operational tolerance and its signatures.

#### Other soluble biomarkers in plasma and or urine

Newell *et al.* reported that several RNAs were increased significantly in the urinary sediment of tolerant patients in comparison to healthy subjects (FoxP3, CD20, CD3 and perforin) or to stable transplants (CD20). While interesting, the predictive value of these tests is unknown [33].

Sagoo and colleagues described a significantly increased expression of the FoxP3/alpha-1,2 mannosidase ratio in the blood of tolerant recipients compared to different controls. The prognostic value of this finding was not stated, but this could prove useful in combination with other tests. Finally, Danger *et al.* showed that tolerant patients could be differentiated from stable patients on the basis of the micro-RNA, miR-142-3p, originating mainly from B cells, and independently of immunosuppression therapy [134].

Biomarker studies are full of promise and have already shed light on possible new roles for different cell types in operational tolerance. So far, however, the lack of consistency among studies has restrained clinician confidence

and slowed down clinical applications. The final validation of any signature will only come from a successful prospective trial of drug minimization that would represent real, life-changing progress for the transplantation community and patients.

#### Mechanisms

Numerous experimental methods allow researchers to induce immune tolerance in laboratory rodents [135]. Apart from chimerism, none of those various reductionist approaches can, alone, induce tolerance in human transplantations [14]. Because the immune system is dedicated to react (or not) towards countless antigens, it is highly redundant and plastic, adapting to changing contexts and over time. It is now generally suspected that tolerance after transplantation in humans reflects this complexity and relies upon a compilation of mechanisms, regulatory dominating over cytotoxic, that act in a timely manner [72,85] (Fig. 2).

The concept of ‘chimerism’ developed by Starzl and co-workers over decades [63] includes, as a corollary, the idea that any solid organ transplantation can be managed as a variation of bone marrow transplantation [64]. Accordingly, they hypothesized that chimerism probably underlies the development of operational tolerance in kidney recipients [5]. In fact, notwithstanding those postulates, later

## Take-home messages

---

### Definitions

- In kidney transplantation 'operational tolerance' is a very rare clinical condition characterized by the maintenance of stable graft function in the absence of immunosuppressive drugs for at least 1 year
- Operational tolerance does not imply the total lack of anti-donor reactivity as shown by the occasional presence of anti-donor HLA antibodies, but the absence of clinically detectable deleterious immune responses directed against the graft

### Mechanistic studies

- *In vitro*, T cells from operationally tolerant patients are hyporesponsive toward donor antigens yet fully responsive to third-party donors and microbial antigens
- *In trans vivo* DTH assays, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> adaptive regulatory T cells from operationally tolerant patients can transfer their hyporesponsiveness to other reactive cells in a TGF- $\beta$ - and/or IL-10-dependent mechanism that is triggered by dominant donor allopeptides
- B cells isolated from tolerant patients display a regulatory phenotype demonstrated by an increased expression of inhibitory signals. They are able to inhibit the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> effector T cells

### Biomarker findings

- Both operationally tolerant patients and rejection-free stable kidney recipients show an expansion of naive and transitional B cell populations with their associated transcripts, in comparison to immunosuppressed patients and rejecting patients, respectively
- Several antigen-specific cellular assays predicted graft outcomes following drug minimization in longitudinal studies
- Transcriptomic signatures of operationally tolerant patients recently demonstrated the involvement of multiple cell subsets and biological pathways. However, those signatures still lack validation in prospective drug minimization trials
- There is little overlap between liver and kidney transplant tolerance blood signatures. These differences probably account for organ specialization in antigen management

### Clinical presentation

- Baseline characteristics of operationally tolerant kidney recipients do not seem to differ greatly from other kidney recipients in general. A previous medical history of rejection is common
  - Operational tolerance is a metastable phenomenon that could be limited to several years or persist for decades
- 

studies have revealed that donor T cell engraftment (i.e. donor T cell-recipient chimera, instead of donor blood cell-recipient chimera) was the critical step for inducing tolerance [13,14,136].

Most of the current strategies devoted to creating tolerance in human kidney recipients (reviewed in [137]) can be interpreted, broadly, as attempts to neutralize alloreactive T cells and/or, conversely, attempts to increase the pool of regulatory cells [14]. However, the precise mechanisms by which operational tolerance proceeds are yet to be elucidated. Hypotheses have been built in reference to other mechanisms identified in other settings such as neonatal, infectious and self-tolerance, as well as experimental findings. They include 'central' (thymic deletion) and 'peripheral' mechanisms (ignorance, anergy, regulation or suppression, apoptosis or peripheral deletion) [14,138].

Ignorance seems to count for little in the setting of operational tolerance [128]. Ignorance refers to all the factors that prevent recipient T cells to be primed by donor antigens in lymph nodes. The use of intensive T cell-depleting agents (rabbit anti-thymocyte globulins: rATG, alemtuzumab) as the ultimate means of preventing antigen-T cell contacts may have unexpected effects.

First, these drugs affect predominantly naive and regulatory T cells [86,139]. Secondly, and consequently, repopulation by homeostatic proliferation will favour memory or memory-like T cells that have previously encountered antigens cross-reactive to the transplant antigens (heterologous immunity) and elicit a specific response towards the allograft [140,141]. Re-emerging memory CD8<sup>+</sup> T cells have been associated with failure to induce tolerance in liver transplantation following rATG induction [142].

Biomarker studies presented above are supportive evidence for active processes of regulation in operational tolerance. Both B and T regulatory cells, either natural or adaptive, are present in higher proportions in the blood and/or in the allograft of tolerant kidney recipients. They exert their regulatory properties through surface inhibitory molecules (CD39, GITR, CTLA-4 on T cells; CD1D and CD5 on B cells), cytokine production (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-21), and most probably also by inhibiting antigen presentation by dendritic cells via a cell-contact-dependent mechanism [143]. T cell regulatory properties could be transferred adoptively to other reactive T cells [27,144], even memory [28]. Suppression is triggered by dominant

allopeptides from the donor (HLA molecules or minor antigens, either membrane-bound or soluble) and executed by regulatory T cell subsets, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> [28,31]. The most recent transcriptomic studies demonstrated a role for other cell subsets, notably NK and dendritic cells, and an inhibition of monocyte functions.

As suggested by those numerous regulatory mechanisms, or by the onset of DSA during an otherwise uneventful tolerance period, clonal deletion is unlikely to be the central mechanism of operational tolerance. As a more formal demonstration, the group from the University of Wisconsin demonstrated that they could regrow specific cytotoxic lymphocytes from hyporesponsive mixed lymphocyte cultures derived from tolerant patients. This could be either performed positively by means of repeated cultures and IL-2 stimulation [23] or negatively by the addition of anti-TGF- $\beta$ 1 antibodies to the culture to deplete regulatory cell populations [31]. In Nantes, Brouard and colleagues observed markedly altered TCR CD3 transcript length distributions inside V $\beta$  chain families in tolerant and minimally immunosuppressed patients compared to all traditional controls. The phenomenon was marked mainly in CD8<sup>+</sup> T cells, which accumulated V $\beta$  transcripts in an oligoclonal pattern. However, the lack of donor specificity in this method did not allow them to draw formal conclusions on the possibility of partial clonal deletion. Methods based on the direct sequencing of TCR V $\beta$  CDR3 may contribute to solving the question in the near future [145]. In contrast to tolerance induced by formal bone marrow transplantation, operational tolerance seems to be dominated by regulation.

## Conclusion

Intensive and elegant studies have enabled us to capture several important acts of the tolerance play. However, the acquaintances between the players, of their roles and relationships, and the beginning of the script still elude us. Deciphering more finely the dynamics of tolerance signatures is expected to promote customized patient management and allow cessation of immunosuppression in some. In addition, as it probably stems from a fundamental mechanism, better understanding of operational tolerance will be of general interest far beyond the field of transplantation.

## Acknowledgements

This work was supported by project grant 23670170 from the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, Brussels, Belgium. The authors acknowledge the contribution of a medical writer, Sandy Field PhD, for editing of the manuscript.

## Disclosure

The authors do not report any conflicts of interest pertaining to the work shown in this manuscript.

## Author contributions

A. M. performed research, wrote and edited the manuscript and is the guarantor of this paper. L. G. performed research, contributed to discussion, wrote and reviewed the manuscript. M. A. and D. A. contributed to discussion, wrote and reviewed the manuscript.

## References

- 1 Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; **172**:603–6.
- 2 Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; **4**:378–83.
- 3 Ghisdal L, Van Laecke S, Abramowicz MJ, Vanholder R, Abramowicz D. New-onset diabetes after renal transplantation: risk assessment and management. *Diabetes Care* 2012; **35**: 181–8.
- 4 Braconnier P, Del Marmol V, Broeders N *et al.* Combined introduction of anti-IL2 receptor antibodies, mycophenolic acid and tacrolimus: effect on malignancies after renal transplantation in a single-centre retrospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 2012; **27**:2547–53.
- 5 Starzl TE, Murase N, Demetris AJ *et al.* Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* 2004; **77**:926–9.
- 6 Kawai T, Sachs DH, Sprangers B *et al.* Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant* 2014; **14**:1599–611.
- 7 Scandling JD, Busque S, Shizuru JA *et al.* Chimerism, graft survival, and withdrawal of immunosuppressive drugs in HLA matched and mismatched patients after living donor kidney and hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant* 2015; **15**:695–704.
- 8 Massart A, Pallier A, Pascual J *et al.* The DESCARTES–Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2016; **31**: 1002–13.
- 9 Madariaga ML, Spencer PJ, Shanmugarajah K *et al.* Effect of tolerance versus chronic immunosuppression protocols on the quality of life of kidney transplant recipients. *JCI Insight* 2016; **1**:e87019.
- 10 Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S *et al.* Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008; **358**:362–8.
- 11 Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR *et al.* HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008; **358**:353–61.
- 12 Leventhal J, Abecassis M, Miller J *et al.* Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-

- mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med* 2012; **4**:124ra28.
- 13 Xu H, Ildstad ST. Transplantation: is donor T-cell engraftment a biomarker for tolerance? *Nat Rev Nephrol* 2012; **8**:560–1.
  - 14 Salisbury EM, Game DS, Lechler RI. Transplantation tolerance. *Pediatr Nephrol* 2014; **29**:2263–72.
  - 15 Leventhal JR, Elliott MJ, Yolcu ES *et al.* Immune reconstitution/immunocompetence in recipients of kidney plus hematopoietic stem/facilitating cell transplants. *Transplantation* 2015; **99**:288–98.
  - 16 Duran-Struuck R, Sondermeijer HP, Buhler L *et al.* Effect of *ex vivo* expanded recipient regulatory T cells on hematopoietic chimerism and kidney allograft tolerance across MHC barriers in cynomolgus macaques. *Transplantation* 2017; **101**:274–83.
  - 17 Owens ML, Maxwell JG, Goodnight J, Wolcott MW. Discontinuation of immunosuppression in renal transplant patients. *Arch Surg* 1975; **110**:1450–1.
  - 18 Hussey JL. Letter: Discontinuation of immunosuppression. *Arch Surg* 1976; **111**:614.
  - 19 Uehling DT, Hussey JL, Weinstein AB, Wank R, Bach FH. Cessation of immunosuppression after renal transplantation. *Surgery* 1976; **79**:278–82.
  - 20 Zoller KM, Cho SI, Cohen JJ, Harrington JT. Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey. *Kidney Int* 1980; **18**:110–4.
  - 21 Strober S, Dhillon M, Schubert M *et al.* Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation. *N Engl J Med* 1989; **321**:28–33.
  - 22 Strober S, Benike C, Krishnaswamy S, Engleman EG, Grumet FC. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* 2000; **69**:1549–54.
  - 23 Burlingham WJ, Grailer AP, Fechner JH Jr *et al.* Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* 1995; **59**:1147–55.
  - 24 Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, VanBuskirk A, Orosz CG, Lee JH, Kusaka S. Loss of tolerance to a maternal kidney transplant is selective for HLA class II: evidence from *trans-vivo* DTH and alloantibody analysis. *Hum Immunol* 2000; **61**:1395–402.
  - 25 Fischer T, Schobel H, Barenbrock M. Specific immune tolerance during pregnancy after renal transplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; **70**:217–9.
  - 26 Christensen LL, Grunnet N, Rudiger N, Moller B, Birkeland SA. Indications of immunological tolerance in kidney transplantation. *Tissue Antigens* 1998; **51**:637–44.
  - 27 VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E *et al.* Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000; **106**:145–55.
  - 28 Cai J, Lee J, Jankowska-Gan E *et al.* Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J Exp Med* 2004; **199**:1017–23.
  - 29 Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; **6**:736–46.
  - 30 Brouard S, Pallier A, Renaudin K *et al.* The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant* 2012; **12**:3296–307.
  - 31 Xu Q, Lee J, Jankowska-Gan E *et al.* Human CD4+CD25low adaptive T regulatory cells suppress delayed-type hypersensitivity during transplant tolerance. *J Immunol* 2007; **178**:3983–95.
  - 32 Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B *et al.* Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; **120**:1848–61.
  - 33 Newell KA, Asare A, Kirk AD *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; **120**:1836–47.
  - 34 Newell KA, Asare A, Sanz I *et al.* Longitudinal studies of a B cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2015; **15**:2908–20.
  - 35 Haynes LD, Jankowska-Gan E, Sheka A *et al.* Donor-specific indirect pathway analysis reveals a B-cell-independent signature which reflects outcomes in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2012; **12**:640–8.
  - 36 Azancot MA, Moreso F, Cantarell C, Torres IB, Seron DR. Histological findings in two renal transplants accomplishing operational tolerance criteria. *NDT Plus* 2011; **4**:198–200.
  - 37 Inal S, Erten Y, Onec K, Ebinc FA, Arinsoy T. Operational tolerance after immunosuppressive withdrawal in a case with renal transplantation. *South Med J* 2011; **104**:74.
  - 38 Moraes-Vieira PM, Silva HM, Takenaka MC *et al.* Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Hum Immunol* 2010; **71**:442–50.
  - 39 Silva HM, Takenaka MC, Moraes-Vieira PM *et al.* Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol Med* 2012; **18**:733–43.
  - 40 Moraes-Vieira PM, Takenaka MC, Silva HM *et al.* GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. *Clin Immunol* 2012; **142**:117–26.
  - 41 Becker LE, de Oliveira Biazotto F, Conrad H *et al.* Cellular infiltrates and NFkappaB subunit c-Rel signaling in kidney allografts of patients with clinical operational tolerance. *Transplantation* 2012; **94**:729–37.
  - 42 Roedder S, Li L, Alonso MN *et al.* A three-gene assay for monitoring immune quiescence in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**:2042–53.
  - 43 Nova-Lamperti E, Fanelli G, Becker PD *et al.* IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses. *Sci Rep* 2016; **6**:20044.
  - 44 Rebollo-Mesa I, Nova-Lamperti E, Mobillo P *et al.* Biomarkers of tolerance in kidney transplantation: are we predicting tolerance or response to immunosuppressive treatment? *Am J Transplant* 2016; **16**:3443–57.
  - 45 Kesiraju S, Ch UM, Paritala P, Reddy S, Reddy VS, Sahariah S. Unexplained post-renal transplant tolerance: a case report. *Immunol Res* 2016; **64**:791–4.
  - 46 Newell KA. Clinical transplantation tolerance. *Semin Immunopathol* 2011; **33**:91–104.
  - 47 Brouard S, Mansfield E, Braud C *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated

- with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:15448–53.
- 48 Souillou JP, Giral M, Brouard S. Operational tolerance in kidney transplantation-improved terminology may enable more precise investigation. *Transplantation* 2013; **96**:e36–8.
  - 49 Lerut J, Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2006; **6**:1774–80.
  - 50 Girmanova E, Hruba P, Viklicky O. Circulating biomarkers of tolerance. *Transplant Rev (Orlando)* 2015; **29**:68–72.
  - 51 Leventhal J, Levitsky J, Abecassis MM *et al.* Spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2012; **12**:1350; author reply 1351–2.
  - 52 Brouard S, Sanchez-Fueyo A. Spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients: response. *Am J Transplant* 2012; **12**:1351–2.
  - 53 Shemesh E, Fine RN. Is calculating the standard deviation of tacrolimus blood levels the new gold standard for evaluating non-adherence to medications in transplant recipients?. *Pediatr Transplant* 2010; **14**:940–3.
  - 54 Orlando G, Hematti P, Stratta RJ *et al.* Clinical operational tolerance after renal transplantation: current status and future challenges. *Ann Surg* 2010; **252**:915–28.
  - 55 Hamburger J, Vaysse J, Crosnier J, Auvert J, Lalanne CM, Hopper J Jr. Renal homotransplantation in man after radiation of the recipient. Experience with six patients since 1959. *Am J Med* 1962; **32**:854–71.
  - 56 Opelz G, Dohler B. Effect on kidney graft survival of reducing or discontinuing maintenance immunosuppression after the first year posttransplant. *Transplantation* 2008; **86**:371–6.
  - 57 Dugast E, Souillou JP, Foucher Y *et al.* Failure of calcineurin inhibitor (tacrolimus) weaning randomized trial in long-term stable kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2016; **16**:3255–61.
  - 58 Hricik DE, Formica RN, Nickerson P *et al.* Adverse outcomes of tacrolimus withdrawal in immune-quiescent kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**:3114–22.
  - 59 Vlaminc H, Maes B, Evers G *et al.* Prospective study on late consequences of subclinical non-compliance with immunosuppressive therapy in renal transplant patients. *Am J Transplant* 2004; **4**:1509–13.
  - 60 Takemoto SK, Pinsky BW, Schnitzler MA *et al.* A retrospective analysis of immunosuppression compliance, dose reduction and discontinuation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; **7**:2704–11.
  - 61 Gaynor JJ, Ciancio G, Guerra G *et al.* Graft failure due to non-compliance among 628 kidney transplant recipients with long-term follow-up: a single-center observational study. *Transplantation* 2014; **97**:925–33.
  - 62 Benitez C, Londono MC, Miquel R *et al.* Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology* 2013; **58**:1824–35.
  - 63 Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992; **339**:1579–82.
  - 64 Starzl TE. Immunosuppressive therapy and tolerance of organ allografts. *N Engl J Med* 2008; **358**:407–11.
  - 65 Ballet C, Roussey-Kesler G, Aubin JT *et al.* Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am J Transplant* 2006; **6**:2796–801.
  - 66 Burdick JF, Beschorner WE, Smith WJ *et al.* Characteristics of early routine renal allograft biopsies. *Transplantation* 1984; **38**:679–84.
  - 67 Kaissling B, Le Hir M. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol* 2008; **130**:247–62.
  - 68 Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:253–7.
  - 69 Torrealba JR, Katayama M, Fechner JH Jr *et al.* Metastable tolerance to rhesus monkey renal transplants is correlated with allograft TGF-beta 1+CD4+ T regulatory cell infiltrates. *J Immunol* 2004; **172**:5753–64.
  - 70 Roodnat JJ, Hilbrands LB, Hene RJ *et al.* 15-year follow-up of a multicenter, randomized, calcineurin inhibitor withdrawal study in kidney transplantation. *Transplantation* 2014; **98**:47–53.
  - 71 Young JS, Daniels MD, Miller ML *et al.* Erosion of transplantation tolerance after infection. *Am J Transplant* 2017; **17**:81–90.
  - 72 Najafian N, Albin MJ, Newell KA. How can we measure immunologic tolerance in humans? *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**:2652–63.
  - 73 Azzi J, Sayegh MH. Clinical transplantation tolerance: a myth no more, but. *Am J Kidney Dis* 2009; **54**:1005–11.
  - 74 Wonigeit K. Suppression of specific MLC responsiveness during the effector phase of skin allograft rejection in rats [Proceedings]. *Z Immunitätsforsch Immunobiol* 1976; **152**:320–3.
  - 75 Thomas J, Thomas F, Mendez-Picon G, Lee H. Immunological monitoring of long-surviving renal transplant recipients. *Surgery* 1977; **81**:125–31.
  - 76 Goulmy E, Persijn G, Blokland E, D'Amato J, van Rood JJ. Cell-mediated lympholysis studies in renal allograft recipients. *Transplantation* 1981; **31**:210–7.
  - 77 Weimar W, Rischen-Vos J, de Kuiper P *et al.* Tapering immunosuppression in recipients of living donor kidney transplants. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**:iv61–3.
  - 78 Beik AI, Higgins RM, Lam FT, Morris AG. Steroid withdrawal and donor-specific hyporeactivity after cadaveric renal transplantation on maintenance triple therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1997; **12**:1949–55.
  - 79 Goulmy E, Bittner K, Blokland E *et al.* Renal transplant patients with steroid withdrawal evaluated longitudinally for their donor-specific cytotoxic T cell reactivity. *Transplantation* 1991; **52**:1083–5.
  - 80 van Besouw NM, van der Mast BJ, de Kuiper P *et al.* Donor-specific T-cell reactivity identifies kidney transplant patients in whom immunosuppressive therapy can be safely reduced. *Transplantation* 2000; **70**:136–43.
  - 81 Viklicky O, Hruba P, Tomiuk S *et al.* Sequential targeting of CD52 and TNF allows early minimization therapy in kidney transplantation: from a biomarker to targeting in a proof-of-concept trial. *PLOS ONE* 2017; **12**:e0169624.
  - 82 Bestard O, Cruzado JM, Lucia M *et al.* Prospective assessment of antidonor cellular alloreactivity is a tool for guidance of immunosuppression in kidney transplantation. *Kidney Int* 2013; **84**:1226–36.
  - 83 Goulmy E, Stijnen T, Groenewoud AF *et al.* Renal transplant patients monitored by the cell-mediated lympholysis assay.



- Evaluation of its clinical value. *Transplantation* 1989; **48**: 559–63.
- 84 Zand MS, Bose A, Vo T *et al.* A renewable source of donor cells for repetitive monitoring of T- and B-cell alloreactivity. *Am J Transplant* 2005; **5**:76–86.
- 85 Derks RA, Burlingham WJ. *In vitro* parameters of donor-antigen-specific tolerance. *Curr Opin Immunol* 2005; **17**:560–4.
- 86 Pearl JP, Parris J, Hale DA *et al.* Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant* 2005; **5**:465–74.
- 87 Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**:1643–51.
- 88 Pelletier RP, Hennessy PK, Adams PW, Orosz CG. High incidence of donor-reactive delayed-type hypersensitivity reactivity in transplant patients. *Am J Transplant* 2002; **2**:926–33.
- 89 Knechtle SJ, Pascual J, Bloom DD *et al.* Early and limited use of tacrolimus to avoid rejection in an alemtuzumab and sirolimus regimen for kidney transplantation: clinical results and immune monitoring. *Am J Transplant* 2009; **9**:1087–98.
- 90 Rodriguez DS, Jankowska-Gan E, Haynes LD *et al.* Immune regulation and graft survival in kidney transplant recipients are both enhanced by human leukocyte antigen matching. *Am J Transplant* 2004; **4**:537–43.
- 91 Jankowska-Gan E, Sollinger HW, Pirsch JD *et al.* Successful reduction of immunosuppression in older renal transplant recipients who exhibit donor-specific regulation. *Transplantation* 2009; **88**:533–41.
- 92 Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M *et al.* Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**:457–67.
- 93 Comoli P, Cioni M, Tagliamacco A *et al.* Acquisition of C3d-binding activity by de novo donor-specific HLA antibodies correlates with graft loss in nonsensitized pediatric kidney recipients. *Am J Transplant* 2016; **16**:2106–16.
- 94 Suci-Foca N, Reed E, Rohowsky C, Kung P, King DW. Antidiotypic antibodies to anti-HLA receptors induced by pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**:830–4.
- 95 Sarwal MM. Fingerprints of transplant tolerance suggest opportunities for immunosuppression minimization. *Clin Biochem* 2016; **49**:404–10.
- 96 Danger R, Sawitzki B, Brouard S. Immune monitoring in renal transplantation: the search for biomarkers. *Eur J Immunol* 2016; **46**:2695–704.
- 97 Viklicky O, Hribova P, Brabcova I. Molecular markers of rejection and tolerance: lessons from clinical research. *Nephrol Dial Transplant* 2013; **28**:2701–8.
- 98 Sarwal M, Chua MS, Kambham N *et al.* Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003; **349**:125–38.
- 99 Fischereder M, Luckow B, Hocher B *et al.* CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet* 2001; **357**: 1758–61.
- 100 Bohne F, Londono MC, Benitez C *et al.* HCV-induced immune responses influence the development of operational tolerance after liver transplantation in humans. *Sci Transl Med* 2014; **6**: 242ra81.
- 101 Asare AL, Kolchinsky SA, Gao Z *et al.* Differential gene expression profiles are dependent upon method of peripheral blood collection and RNA isolation. *BMC Genomics* 2008; **9**:474.
- 102 Watkins NA, Gusnanto A, de Bono B *et al.* A HaemAtlas: characterizing gene expression in differentiated human blood cells. *Blood* 2009; **113**:e1–9.
- 103 Moreso F, Torres IB, Martinez-Gallo M *et al.* Gene expression signature of tolerance and lymphocyte subsets in stable renal transplants: results of a cross-sectional study. *Transpl Immunol* 2014; **31**:11–6.
- 104 Brouard S, Le Bars A, Dufay A *et al.* Identification of a gene expression profile associated with operational tolerance among a selected group of stable kidney transplant patients. *Transpl Int* 2011; **24**:536–47.
- 105 Baron D, Ramstein G, Chesneau M *et al.* A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney Int* 2015; **87**: 984–95.
- 106 Lozano JJ, Pallier A, Martinez-Llordella M *et al.* Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *Am J Transplant* 2011; **11**:1916–26.
- 107 Louis S, Braudeau C, Giral M *et al.* Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; **81**:398–407.
- 108 Baeten D, Louis S, Braud C *et al.* Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**:294–304.
- 109 Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:199–210.
- 110 Bestard O, Cunetti L, Cruzado JM *et al.* Intra-graft regulatory T cells in protocol biopsies retain foxp3 demethylation and are protective biomarkers for kidney graft outcome. *Am J Transplant* 2011; **11**:2162–72.
- 111 Muthukumar T, Dadhania D, Ding R *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; **353**:2342–51.
- 112 Gavin MA, Torgerson TR, Houston E *et al.* Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**:6659–64.
- 113 Baron U, Floess S, Wiczorek G *et al.* DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 2007; **37**:2378–89.
- 114 Braza F, Dugast E, Panov I *et al.* Central role of CD45RA- Foxp3hi memory regulatory T cells in clinical kidney transplantation tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**:1795–805.
- 115 Pallier A, Hillion S, Danger R *et al.* Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int* 2010; **78**:503–13.
- 116 Chesneau M, Pallier A, Braza F *et al.* Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2014; **14**:144–55.
- 117 Deng S, Moore DJ, Huang X *et al.* Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes. *J Immunol* 2007; **178**:6028–32.

- 118 Le Texier L, Thebault P, Lavault A *et al.* Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant* 2011; **11**:429–38.
- 119 Stolp J, Turka LA, Wood KJ. B cells with immune-regulating function in transplantation. *Nat Rev Nephrol* 2014; **10**:389–97.
- 120 Chesneau M, Michel L, Dugast E *et al.* Tolerant kidney transplant patients produce B cells with regulatory properties. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**:2588–98.
- 121 Mauri C, Ehrenstein MR. The ‘short’ history of regulatory B cells. *Trends Immunol* 2008; **29**:34–40.
- 122 Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G *et al.* Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; **7**:309–19.
- 123 Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I *et al.* Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; **118**:2845–57.
- 124 Kawai T, Sachs DH, Sykes M, Cosimi AB, Immune Tolerance N. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2013; **368**:1850–2.
- 125 Viklicky O, Krystufkova E, Brabcova I *et al.* B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation* 2013; **95**:148–54.
- 126 Heidt S, Vergunst M, Anholts JD *et al.* B cell markers of operational tolerance can discriminate acute kidney allograft rejection from stable graft function. *Transplantation* 2014; **99**:1058–64.
- 127 Kuraishy AI, French SW, Sherman M *et al.* TORC2 regulates germinal center repression of the TCL1 oncoprotein to promote B cell development and inhibit transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:10175–80.
- 128 Newell KA, Larsen CP, Kirk AD. Transplant tolerance: converging on a moving target. *Transplantation* 2006; **81**:1–6.
- 129 Bohne F, Martinez-Llordella M, Lozano JJ *et al.* Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation. *J Clin Invest* 2012; **122**:368–82.
- 130 Shiu KY, McLaughlin L, Rebollo-Mesa I *et al.* B-lymphocytes support and regulate indirect T-cell alloreactivity in individual patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 2015; **88**:560–8.
- 131 Crispe IN. Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 2011; **54**:357–65.
- 132 Braud C, Baeten D, Giral M *et al.* Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *J Cell Biochem* 2008; **103**:1681–92.
- 133 Bottomley MJ, Chen M, Fuggle S, Harden PL, Wood KJ. Application of operational tolerance signatures are limited by variability and type of immunosuppression in renal transplant recipients: a cross-sectional study. *Transplant Direct* 2016; **3**:e125.
- 134 Danger R, Pallier A, Giral M *et al.* Upregulation of miR-142–3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol* 2012; **23**:597–606.
- 135 Sachs DH. Tolerance: of mice and men. *J Clin Invest* 2003; **111**:1819–21.
- 136 Xu H, Chilton PM, Huang Y, Schanie CL, Ildstad ST. Production of donor T cells is critical for induction of donor-specific tolerance and maintenance of chimerism. *J Immunol* 2004; **172**:1463–71.
- 137 Page EK, Dar WA, Knechtle SJ. Tolerogenic therapies in transplantation. *Front Immunol* 2012; **3**:198.
- 138 Starzl TE, Zinkernagel RM. Transplantation tolerance from a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 2001; **1**:233–9.
- 139 Krepsova E, Tycova I, Sekerkova A *et al.* Effect of induction therapy on the expression of molecular markers associated with rejection and tolerance. *BMC Nephrol* 2015; **16**:146.
- 140 Lombardi G, Sidhu S, Daly M, Batchelor JR, Makgoba W, Lechler RI. Are primary alloresponses truly primary?. *Int Immunol* 1990; **2**:9–13.
- 141 Adams AB, Pearson TC, Larsen CP. Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol Rev* 2003; **196**:147–60.
- 142 Donckier V, Craciun L, Miqueu P *et al.* Expansion of memory-type CD8+ T cells correlates with the failure of early immunosuppression withdrawal after cadaver liver transplantation using high-dose ATG induction and rapamycin. *Transplantation* 2013; **96**:306–15.
- 143 Vendetti S, Chai JG, Dyson J, Simpson E, Lombardi G, Lechler R. Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2000; **165**:1175–81.
- 144 Hall BM, Jelbart ME, Gurley KE, Dorsch SE. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. Mediation of specific suppression by T helper/inducer cells. *J Exp Med* 1985; **162**:1683–94.
- 145 Morris H, DeWolf S, Robins H *et al.* Tracking donor-reactive T cells: evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. *Sci Transl Med* 2015; **7**:272ra10.

## 2 SUJETS ET METHODOLOGIE

### RESUME

La première section de ce chapitre met en exergue plusieurs des particularités de la tolérance opérationnelle aux greffons rénaux qui ont déterminé nos orientations méthodologiques: à savoir la rareté, le caractère sporadique, l'invisibilité ou encore la bénignité (2.1); la seconde section montre comment nous avons abouti à constituer l'une des plus larges, sinon la plus large, cohorte de patients tolérants en Europe et explicite le choix des sujets contrôles (2.2); la troisième section détaille les outils utilisés pour l'extraction et le séquençage des ADN, la capture des régions exoniques et comment *in fine*, les séquences nucléotidiques sont converties en *liste de variants* (2.3). Dans notre dernière section nous détaillons les tests statistiques utilisés pour identifier, sur base d'une analyse cas-contrôles, des variants spécifiques de la tolérance (2.4).

### SOMMAIRE

<b>2</b>	<b>SUJETS ET METHODOLOGIE</b> .....	<b>55</b>
<b>2.1</b>	<b>Des particularités de la tolérance comme phénotype</b> .....	<b>57</b>
<b>2.2</b>	<b>Rassembler une cohorte</b> .....	<b>59</b>
2.2.1	<i>A propos de cette section</i> .....	59
2.2.2	<i>Une vaste enquête paneuropéenne inédite</i> .....	59
2.2.3	<i>Participants</i> .....	61
<b>2.3</b>	<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>64</b>
2.3.1	<i>A propos de cette section</i> .....	64
2.3.2	<i>Extraction d'ADN et séquençage d'exome</i> .....	64
2.3.3	<i>Alignement des séquences et appel des variants</i> .....	65
2.3.4	<i>Filtration des variants</i> .....	66
<b>2.4</b>	<b>Aspects statistiques</b> .....	<b>67</b>
2.4.1	<i>A propos de cette section</i> .....	67
2.4.2	<i>Test d'association génétique</i> .....	67
2.4.3	<i>L'analyse en composantes principales</i> .....	69

2.4.4	<i>Contrôle des variants issus du SKAT</i> .....	69
2.4.5	<i>Hypothèse statistique a posteriori</i> .....	69
<b>ANNEXE II - article original dans <i>Nephrology, Dialysis and Transplantation</i></b> .....		<b>71</b>

## 2.1 Des particularités de la tolérance comme phénotype

Le phénotype de la tolérance opérationnelle aux greffons rénaux affiche plusieurs spécificités qui rendent son étude génétique sinon plus ardue à tout le moins particulière. Plusieurs de ces caractéristiques ont directement guidé nos choix méthodologiques, ce que nous explicitons ci-dessous. Ces considérations sont résumées dans le **Tableau 4**.

***Le phénotype de tolérance opérationnelle aux greffons rénaux est rare, sporadique, invisible et bénin: ceci a plusieurs conséquences méthodologiques.***

**La tolérance aux greffons rénaux est rare.** Ceci pèse évidemment sur le recrutement des patients. Nous avons été obligés de développer des collaborations internationales mais aussi notre propre plateforme visant à collecter ces échantillons rares à l'échelle européenne (ceci est décrit en section 2.2). Cela fut ensuite une contrainte au niveau statistique tant pour le choix de tests adaptés aux petits échantillons que pour pouvoir détecter les anomalies génétiques tout en gérant le risque d'erreur alpha lié au grand nombre de comparaisons génétiques effectuées lorsque l'on travaille à l'échelle de l'exome (ceci est décrit en section 2.4).

**La tolérance aux greffons rénaux est sporadique,** c'est-à-dire que nous n'avons pas connaissance de présentation familiale de tolérance aux greffons<sup>1</sup>. En génétique, la connaissance du *pedigree* des patients permet bien souvent d'identifier, en un, le type d'hérédité et en deux, le variant causal par *analyse de liaison*, c'est-à-dire en recherchant le plus petit dénominateur génétique commun entre porteurs d'un trait donné. Faute de tels exemples en tolérance aux greffons rénaux, le raisonnement central de notre thèse se

---

<sup>1</sup> Les plus sceptiques diront que cela plaide contre des déterminants génétiques puissants de la tolérance. Au fait, nous pensons que les conditions permettant d'infirmier l'existence de cas familiaux de tolérance - ne fut-ce qu'une hérédité monogénique autosomale dominante - ne furent que très occasionnellement réunies dans la courte histoire de la transplantation rénale que pour tirer des conclusions valables. Ces conditions pourraient se résumer en: présence d'une néphropathie héréditaire > transplantation sur plusieurs générations > transmission de l'allèle de la tolérance > incompliance majeure sur plusieurs générations > 2 cas de tolérance à la greffe dans une même famille portés à la connaissance d'un seul clinicien...). Par ailleurs, nous avons expliqué dans notre introduction les raisons positives pour lesquelles nous jugions utile de rechercher les déterminants génétiques de la tolérance.

bornera à rechercher une augmentation statistiquement significative de tel ou tel variant chez les cas par comparaison à des contrôles choisis.

**La tolérance aux greffons est invisible:** Il n'existe pas à ce jour de biomarqueur permettant de prédire l'arrêt sans danger (ou ne fut-ce que la réduction) des immunosuppresseurs chez tel ou tel sujet, c'est à dire que la tolérance aux greffons est **indétectable**. Qui plus est, les patients incomplicants qui abandonnent toute immunosuppression le font hors de tout contrôle médical, de façon **dissimulée** afin d'éviter la désapprobation, autrement systématique, de la part des néphrologues. L'invisibilité freine la constitution du groupe de patients tolérants mais fait également courir le risque d'une contamination du groupe contrôle par des patients porteurs du génotype étudié. Il faut en tenir compte dans l'élaboration des tests d'association. Enfin, l'incertitude quant à la prévalence de la tolérance empêchait au moment de débiter cette thèse de formuler des hypothèses génétiques concrètes permettant de choisir les tests adéquats

**La tolérance aux greffons est bénigne.** L'équipe de Nantes a montré que les patients tolérants ne font pas particulièrement l'objet de cancers ou d'infections que ce soit pendant ou à l'issue de la période d'immunosuppression (Roussey-Kesler et al., 2006). Il semble donc que, hors de la transplantation et du sevrage des immunosuppresseurs, les patients tolérants ne disposent pas d'un phénotype propre et marqué. Il s'agit donc d'un phénotype **conditionnel** observable dans un contexte particulier et indifférent autrement. En génétique, il est commun de constater que des phénotypes marqués et délétères sont les conséquences de mutations tronquantes (de type *frameshift* ou apparition d'un nouveau codon stop prématuré), lesquelles entraînent la terminaison prématurée de la protéine cible lors de la traduction. Ce critère est souvent d'une grande aide pour identifier *in fine* le ou les variants causaux. Malheureusement, ce présupposé ne peut être retenu *a priori* dans le cas de la tolérance opérationnelle.

**Tableau 4** - Particularités du phénotype "tolérance" et leurs conséquences méthodologiques

Particularités	Conséquences
<b>Rareté</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difficultés d'échantillonnage des cas;</li> <li>• Au niveau statistique: risque majoré d'erreur <i>beta</i> tandis qu'une gestion trop stricte du risque d'erreur <i>alpha</i> peut ruiner l'essai.</li> </ul>
<b>Caractère sporadique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absence de familles, mode d'hérédité inconnu;</li> </ul> <p>→ ceci limite les possibilités de retrouver l'association génotype-phénotype et in fine, on doit se résoudre rechercher une accumulation statistiquement significative de variants chez les cas</p>
<b>Invisibilité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difficultés d'échantillonnage des cas;</li> <li>• Possible contamination du groupe contrôle;</li> </ul> <p>→ prévalence inconnue</p>
<b>Bénignité</b>	→ en première intention, pas de restriction possible aux variants les plus délétères.

## 2.2 Rassembler une cohorte

### 2.2.1 *A propos de cette section*

Dans cette section nous présentons successivement les efforts entrepris pour identifier de nouveaux patients tolérants à leur greffon, décrire leurs principales caractéristiques cliniques et évaluer pour la première leur fréquence (2.2.2) et décrivons les cohortes composées (2.2.3)

### 2.2.2 *Une vaste enquête paneuropéenne inédite*

Dans un effort pour identifier de nouveaux patients tolérants et estimer leur prévalence en vue des de rechercher des variants les plus pertinents, nous avons mis sur pied une vaste enquête européenne.

Grâce au soutien du groupe de travail DESCARTES de l'Association européenne de néphrologie (présidé par le Prof. Daniel Abramowicz, co-promoteur de cette thèse) et à l'équipe de la Prof. Sophie Brouard de l'Université de Nantes, 258 cliniciens suivant des patients transplantés rénaux répartis dans 28 pays ont pu être contactés, et 147 d'entre eux répondirent à notre enquête. Il leur était demandé combien de transplantations rénales avaient été réalisées dans leur centre et de combien de patients tolérants (> 1an, fonction définie dans l'article en Annexe II, page 72) ils avaient connaissance, et ce quel que fût le statut des patients au moment du rapport.

**Sur base de leur expérience cumulée de 218.913 transplantations rénales, les investigateurs purent rapporter 66 cas de tolérance, soient 3 cas / 10.000 patients transplantés.** Si le recensement de patients tolérants est, en l'absence de biomarqueurs validés, obligatoirement aléatoire et imprécis, ce travail aura eu le mérite de donner pour la première fois une estimation, même si très probablement à la baisse, de la fréquence du phénotype. En guise de comparaison, le taux de patients tolérants en greffe hépatique s'élève dans certaines cohortes de 20 à 40%: on voit bien là que l'on a affaire à un tout autre phénotype. (Benitez et al., 2013; Lerut and Sanchez-Fueyo, 2006)

En outre, notre enquête a permis d'affirmer ou de renforcer les 3 conclusions suivantes:

1) Le développement de la tolérance aux greffons est possible chez des sujets jeunes (âge médian 40 ans, IQR 31-52), parfois en présence d'anticorps anti-HLA (33% des patients), d'une maladie auto-immune, ou même au décours d'un rejet aigu (prouvé par biopsie dans 13% des cas). Ces observations **s'opposent à l'hypothèse d'une immunodéficience globale de type immunosenescence ou autre.**

2) **La tolérance peut durer d'une année (par définition) à plusieurs décennies et s'interrompre à tout moment** démontrant ainsi une large variance phénotypique, de loin pas binaire.

3) La tolérance opérationnelle est associée à **des taux exceptionnellement élevés de survie des patients et des greffons** (respectivement de 100 et 87 % après 10 ans de tolérance, années qui s'ajoutent à une médiane de 9.25 années (IQR 5 - 13) déjà passées



sous immunosuppresseurs avant l'arrêt complet des médicaments). Des résultats très loin de ceux habituellement rencontrés après une décade sous immunosuppresseurs (Matas et al., 2008).

Le lecteur qui le souhaite trouvera le détail de cette enquête dans notre publication reprise en Annexe II, page 72.

### 2.2.3 *Participants*

**Critères d'éligibilité.** Etait désigné comme tolérant *i)* tout patient transplanté d'une allogreffe rénale, *ii)* âgé de 18 ans ou plus, *iii)* ayant maintenu un greffon fonctionnel pendant au moins un an en l'absence de toute immunosuppression (fonction définie soit par un taux de créatinine sérique <1.7 mg/dL et une protéinurie <1g/jour ou /g créatinine (*fonction optimale*) soit par des valeurs supérieures mais stables sans variation supérieure à 20% (*fonction suboptimale*). La persistance ou non de la tolérance au moment du prélèvement n'était pas un critère de sélection. Etait exclu, en revanche, tout patient ayant un antécédent d'allogreffe de cellules souches ou autre transplantation solide. Les patients contrôles devaient pour être inclus *i)* être réputés en bonne santé ou à tout le moins non concernés par une affection rénale *ii)* être d'ascendance européenne, *iii)* ne pas être apparentés entre eux.

Tous les participants ont signé un consentement informé et approuvé localement par le comité d'éthique de leur institution de référence. Cette étude a réuni 40 patients tolérants et 209 contrôles

#### **La cohorte Nantaise (n=22)**

Vingt-deux échantillons d'ADN de patients tolérants sont issus de la biocollection de l'université de Nantes (Brouard et al., 2012).

#### **L'étude TOMOGRAM (n=18)**

Dix-huit échantillons d'ADN de patients tolérants sont issus d'une biocollection composée par nos soins à l'échelle européenne et ce, grâce au soutien logistique du groupe DESCARTES déjà cité plus haut. En 2015, nous avons monté l'étude *TOMOGRAM* - pour *TOLerance MOlecular and Genome-wide studies with Renal Allograft recipient Material* - afin

d'échantillonner et de collecter les informations cliniques pertinentes d'un large groupe de patients tolérants au profit de deux projets distincts. La première étude, détaillée dans cet ouvrage, porte sur la génomique de la tolérance (Promoteur: ULB-Erasme / Prof. Marc Abramowicz, investigatrice principale : Dr Annick Massart); la seconde vise à identifier une nouvelle signature de la tolérance basée, peut-être pour la première fois, sur le séquençage aléatoire du transcriptome entier (*RNA-seq*), (Investigateur principal: Prof. Ondrej Viklicky, IKEM, Prague). L'étude TOMOGRAM a rassemblé jusqu'à présent les échantillons de 32 patients répartis dans 11 pays européens. Dix-huit de ces échantillons ont donc servi à la présente étude (référence comité d'éthique principal Erasme-ULB 2015/379).

Le **Tableau 5** récapitule les principales caractéristiques des patients tolérants enrôlés.

### **Sujets contrôles**

En guise de sujets contrôles, nous avons utilisé les données de séquençage d'exome à haut débit de 209 contrôles séquencés *in loco* sur le même séquenceur que les patients de l'étude TOMOGRAM afin de réduire les *effets de lot*. Chaque patient avait au préalable consenti à l'usage anonyme de ses données dans des études académiques.

### **Les hyper-cas**

Nous avons occasionnellement choisi de restreindre nos analyses à des sous-groupes de patients dont nous jugions la tolérance aux greffes plus extrême, afin d'augmenter notre puissance. Nous avons considéré comme plus extrêmes les patients tolérants demeurés tolérants "longtemps" et comptant au moins une incompatibilité HLA avec leur donneur. Cette hypothèse se base sur plusieurs rapports qui laissent suggérer que la tolérance survient plus fréquemment parmi les receveurs d'une allogreffe HLA-identique que parmi ceux d'une greffe peu compatible (Newell et al., 2010; Rodriguez et al., 2004; Roedder et al., 2014; Zoller et al., 1980). Aussi, si la définition la plus commune de la tolérance se base sur un an de fonction du greffon stable sans immunosuppresseurs (voir récapitulatif dans (Massart et al., 2017), table 2 de l'Annexe I (page 53), la tolérance au-delà de 2 ans semble plus rare encore (Zoller et al., 1980). Nous avons donc composé 3 groupes d'hyper-cas, tous demeurés tolérants au moins deux ans et porteurs de plus d'une (groupe a, n=26), plus de 3 (groupe b, n=19) ou enfin 4 à 5 incompatibilités HLA A/B/DR (groupe c, n=9).

**Tableau 5** - Caractéristiques des patients tolérants enrôlés.

Parameters	Full cohort (TOMOGRAM study + Nantes Cohort, n=40)
Tolerant patients (no.)	
- with an optimal function*)	38
- with a stable suboptimal function**)	2
Male sex (no.)	28
Ethnicity (no.)	
- European	31
- North African	3
- Turkish	6
Age at transplantation (yr)	33±16
Age at immunosuppression complete cessation (yr)	43±15
Circumstances of immunosuppression cessation (no.)	
- noncompliance	31
- cancer or severe infection	7
- pregnancy	1
Donor age (yr)	30±13
Donor male sex	11/36
Donor type (no.)	
- deceased	29
- living	11
Full matched recipients (no.)	10/40
HLA mismatches in mismatched recipient (no.)	
- A	1±0.6 (n=29)
- B	1.2±0.6 (n=29)
- DR	0.8±0.7 (n=27)
- A-B-DR	3±1 (n=27)
Immunisation (no.)	
- positive historic PRA before transplantation	7 over 28
- positive PRA at the time of transplantation	2 over 21
- pretransplantation donor-specific antibodies	1 over 25
- De novo donor specific antibodies	8 over 33
Duration of tolerance (months)	96 [50-142] (n= 38)
Duration of period without dialysis nor immunosuppressive drugs (months)	115 [68-156] (n=40)
Last serum creatinine while tolerant (mg/dl)	1.2±0.3
Tolerant patients with a proteinuria ≤ 1 g/day but > 300 mg/day and (no.)	31 over 38

Note: les résultats sont exprimés en tant que nombre; moyenne ± déviation standard ou; médiane et écart interquartile. Une fonction optimale (\*) fait référence à une créatinine sérique <1,7 mg/dL et une protéinurie > 1g par jour ou par gramme de de créatinine pendant au moins un an en l'absence d'immunosuppression. Une fonction suboptimale (\*\*) fait référence à une fonction du greffon n'entrant pas dans les critères sus-cités mais néanmoins n'ayant pas connu de variation supérieure à 20% pendant au moins une année sans immunosuppression. Le nombre de patients impliqués dans chaque analyse est spécifié entre parenthèses lorsqu'il diffère du reste de la colonne.

Abbreviations: PRA désigne *Panel Reactive Antibody*. Positive PRA désigne un PRA non nul.

## 2.3 Matériel et méthodes

### 2.3.1 A propos de cette section

Ici, nous détaillons l'ensemble des étapes nécessaires pour délimiter l'ensemble des variants (ou *variome*) de chaque patient avant l'analyse par groupe (cas/ contrôles): comment fut extrait et séquencé l'ADN des patients (2.3.2); l'alignement des séquences à une assemblée génomique de référence afin d'identifier et *d'appeler* les variants (2.2.3) et finalement; la filtration des variants selon nos critères d'intérêt.

### 2.3.2 Extraction d'ADN et séquençage d'exome.

Les 22 ADN issus de la biocollection nantaise ont été extraits plusieurs années avant de développer ce projet, au départ du sang entier des patients, et selon la méthode du TRIzol à l'aide de phénol et de chloroforme, décrite en détails en référence (Danger et al., 2012b). Une librairie d'ADN a ensuite été préparée grâce au kit TruSeq DNA LT Sample Prep Kit (Illumina, Inc.), selon les instructions du fabricant, impliquant une fragmentation de l'ADN par sonication (Covaris, Inc., Woburn, MA), la réparation des extrémités inégales, leur apprêtement (adénylation<sup>2</sup> et ligation des amorces nucléotidiques) et finalement leur amplification par *polymerase chain reaction (PCR)*. Ces librairies d'ADN *shotgun* ont ensuite été capturées et enrichies pour les séquences exoniques à l'aide du kit TruSeq exome enrichment kit v1.2 (Illumina, Inc.). Enfin les séquences exoniques (45 Mb) ont été séquencées sur 100 paires de base au départ des deux extrémités (*pair-ended*) sur une machine Illumina HiSeq2000 (Aros Applied Biotechnology, Aarhus, Danemark). Le séquençage a résulté en une moyenne de 124±43 millions de *reads* par patient avec une profondeur de couverture minimale de 50x.

---

<sup>2</sup> Les doubles brins d'ADN, fragmentées en différentes positions selon le brin sont de tailles inégales ou *en bouts collants*. Différentes opérations de *réparation* permettent de compléter le brin le plus court ou raccourcir le brin le plus long de façon à aboutir à deux brins complémentaires de même longueur dits *en bouts francs*. A l'extrémité 3' de chaque brin d'ADN sera ajouté une nouvelle excroissance sous la forme d'une adénosine (adénylation) qui permettra la fixation d'adaptateurs double brin aux extrémités de chaque molécule. Chaque fragment de molécule bicaténaire d'ADN se voit donc assorti d'une paire d'adaptateurs universels à ses deux extrémités qui permettront in fine de séquencer l'ensemble des fragments hétéroclites à l'aide de deux amorces nucléotidiques seulement. Pour plus d'informations sur le séquençage à haut débit, se référer à la section 1.6.

Les 18 ADN issus de la biocollektion TOMOGRAM furent extraits du sang entier des patients par une méthode exploitant une résine échangeuse d'anions (Qiagen genomic DNA purification kit). Les concentrations d'ADN ont été estimées par une méthode spectrophotométrique (Nanodrop Instrument, Thermo Fischer, US-MA). Un microgramme d'ADN par patient a ensuite été fragmenté par sonication (Covaris) et est entré dans le processus de confection de la librairie (kit KAPA HyperPrep kit (Roche, Inc. Bâle, Suisse)). Les séquences exoniques (64 Mb) ont été capturées à l'aide du kit SeqCap EZ Human Exome v3.0 (Roche Inc., Bâle, Suisse) et lues par leur deux extrémités (*pair-ended*) sur 125 paires de base sur une plateforme Illumina HiSeq 1500 platform (Brightcore, Brussels). Le séquençage a résulté en une moyenne en  $129 \pm 32$  millions de *reads* par avec une profondeur de couverture minimale de 75x. Les 209 contrôles locaux ont été séquencés antérieurement selon les mêmes méthodes.

### 2.3.3 *Alignement des séquences et appel des variants*

Nous reprenons ici les outils précis qui nous ont été utiles; pour une présentation globale des étapes nécessaires pour aboutir au listage des variants de chaque patient, nous invitons le lecteur à se rendre à la section 1.6 (page 35).

Les données de séquençage de tous les patients (cas et contrôles) ont été traitées individuellement en suivant une procédure unique. Les données brutes de séquençage (*Raw data*) ont été alignées à l'assemblée génomique de référence *human genome build 37 (hg19)* grâce au programme Burrows-Wheeler Alignment BWA version 0.7.12 (Li and Durbin, 2009)). Le contrôle de qualité des *reads* et l'élimination des duplicats artéfactuels ont été réalisées grâce à l'outil Picard MarkDuplicates (Picard-2.9.0). Le réaligement local autour des *indels*, la recalibration du score des bases par un processus bayésien et *in fine*, l'appel des variants tant de type *indels que SNVs* ont été réalisés grâce au programme Genome Analysis ToolKit Haplotype Caller 3.3 (McKenna et al., 2010) selon les recommandations de bonne pratique (Van der Auwera et al., 2013).

L'ensemble des *reads* de séquençage ont été annotées grâce à l'outil Bioconductor package Variant Annotation version 1.20.3 (Obenchain et al., 2014) afin de permettre leur tri ultérieur sur base de nos critères.

### 2.3.4 Filtration des variants

Nous avons filtré les variants selon 4 types de considérations:

- 1) sur base de critères de qualité,
- 2) conformément à notre hypothèse, sur base de leur caractère codant,
- 3) conformément à notre hypothèse, sur base de l'impact fonctionnel attendu des variants.

**Filtres qualitatifs:** seuls les variants passant un filtre portant sur la qualité des signaux émis par le séquenceur ont été retenus (*pass-filter*).

**Filtres liés au biotype des séquences:** conformément à notre hypothèse, nous avons sélectivement retenu les variants correspondant à des séquences exoniques<sup>3</sup> ou encore à des sites d'épissage ou des promoteurs. Par ailleurs, compte-tenu que deux kits de capture des exons furent utilisés (voir section 2.3.2, page 64), nous avons restreint nos analyses aux séquences exoniques couvertes par les deux kits (soient 43.746.610 pb) grâce à l'outil Bedtools (v2.27.0). Les chromosomes sexuels ont été exclus de cette analyse.

**Filtres liés au type de variant (*SNP effect*):** toujours conformément à notre hypothèse, nous nous sommes focalisés sur les variants dont les effets attendus étaient marqués (variants faux-sens non synonymes (*non synonymous missense*)/ variants entraînant un décalage du cadre de lecture (*frameshift mutations*) ou une anomalie de l'épissage (dinucléotides de début ou de fin d'intron)/ variants non-sens (*STOP codons*)). En outre, nous avons annoté nos variants selon le score de pathogénicité CADD de façon à pouvoir sélectionner les variants les plus délétères en cas de pléthore. A titre d'exemple, les variants ayant un score > 10 comptent parmi les 10% présumés les plus délétères du génome (Kircher et al., 2014), ceux ayant un score > 20 représente le pourcent le plus délétère (0.01 ou  $10^{-2}$  selon la logique d'écriture du score Phred: section 1.6.3, page 40).

---

<sup>3</sup> Pour capturer les exons dans leur entièreté, ou tout simplement pour des raisons liées à la confection des amorces, il n'est pas rare que les sondes nucléotidiques destinées à capturer les exons empiètent sur des régions introniques. Il est donc logique et indispensable que la filtration bioinformatique comporte encore une étape de sélection des fragments exoniques véritables.

Le total de ces opérations a abouti à circonscrire un ensemble de 84.643 variants (répartis au sein de 16.343 gènes) présents chez au moins 1 cas ou un contrôle, lesquels variants furent entrés dans les analyses ultérieures.

## 2.4 Aspects statistiques

### 2.4.1 *A propos de cette section*

Nous y présentons brièvement les outils statistiques utilisés pour rechercher des variants génétiques associés à la tolérance: le test *SKAT* et ses avantages dans la recherche qui nous occupe (2.4.2); l'analyse en composantes principales dont les composantes sont intégrées à l'équation du *SKAT* (2.4.3); comment nous procédons aux contrôles initiaux des variants issus du *SKAT* (2.4.4) et enfin une hypothèse statistique *a posteriori*, obtenue par simulation et destinée à appréhender le champs d'exploration couvert par notre recherche (2.4.5).

### 2.4.2 *Test d'association génétique*

Nous avons comparé la distribution des variants des patients tolérants à celle des contrôles à l'aide d'un test d'analyse de la variance nommé *Sequence Kernel Association Test* ou *SKAT* (Wu et al., 2011). Nous avons initialement réalisé l'analyse pour chaque gène (retenu à l'issue de la filtration des variants,  $n= 16.343$ ) ensuite pour chaque variant séparément ( $n=84.643$ ). Nous présentons ci-dessous les possibilités qui s'offraient à nous et justifions le choix de ce test.

Les tests les plus connus pour rechercher des associations panexoniques sont les *Burden tests* qui comparent la fréquence, par gène ou autre région chromosomique, de variants *qualifiants* entre des cas et des contrôles. Les *Burden tests* fonctionnent de manière optimale lorsque les variants comparés sont tous causaux (variants très rares et pathogènes)

et ont des effets allant dans la même direction chez les cas et les contrôles<sup>4</sup>. Les tests dit *SKATs*, qui ne se contentent pas de compter les variants mais comparent la variance de leur distribution ce qui permet de détecter des associations avec des variants plus fréquents ou moins pathogènes qu'on n'aurait pas détectés avec une *Burden test*. Cependant les *SKATs* perdent énormément en puissance lorsqu'il s'agit de détecter des variants rares.

En l'absence de modèle familial de tolérance, il était difficile de faire des hypothèses quant aux fréquences alléliques attendues. Nous avons dès lors choisi d'utiliser le *SKAT* optimisé et unifié (*optimal unified SKAT*, ou *SKAT-O*) qui maintient de bonnes performances dans une très large gamme de fréquences alléliques, depuis les allèles très rares jusqu'aux polymorphismes communs (Ionita-Laza et al., 2013).

Le test *SKAT-O* est dit conservateur en termes d'erreurs alpha, c'est-à-dire qu'il prévient les faux positifs. Il s'agit d'un obstacle dans le cas de très petits échantillons avec pour risque, faute de puissance, d'écarter toute association même véridique. La version du test *SKAT-O* ajustée pour les petits échantillons (*aSKAT-O*), fondée sur une étude de la variance des distributions encore plus sophistiquée, permet d'augmenter la puissance du *SKAT* (Lee et al., 2012). Toujours pour des questions de puissance, nous avons choisi un mode de gestion relativement souple du risque d'erreur alpha en autorisant un *False Discovery Rate (FDR)* limité à 5%, (Benjamini, 1995). Finalement, le test *SKAT* ajusté pour les petits échantillons reste applicable lorsque les groupes comparés sont de tailles inégales ce qui est un obstacle dans beaucoup d'autres tests statistiques (Lee et al., 2012)

Le test *SKAT-O* ajusté pour les petits échantillons nous a paru être l'outil de choix pour explorer un phénotype de prévalence et de transmission incertaine comme la tolérance et gérer la petitesse des échantillons.

---

<sup>4</sup> Ainsi si les cas s'expliquent par une accumulation de variants délétères mais que les contrôles, porteurs du phénotype opposé, présentent des variants du même gène mais cette fois protecteurs, les *Burden tests*, sont susceptibles de manquer l'association génotype-phénotype.



### 2.4.3 *L'analyse en composantes principales*

Nous avons décomposé les données sur l'ensemble des variants des cas et des contrôles en composantes principales (à l'aide de l'outil R package SNPRelate version 1.12.2) afin de pouvoir exclure les sujets trop différents du reste du groupe (*outliers* par ethnicité ou ancestralité) qui peuvent être source de stratification et donc de biais. En outre, les composantes principales de rangs 1 à 3 ont été intégrées dans notre modèle *SKAT* de manière à ajuster d'éventuels facteurs confondants. En dernier lieu, pour corriger pour un éventuel effet de lot (*batch effect*) en lien avec les 2 séquenceurs utilisés (*Arosab versus Brightcore*), nous avons introduit dans notre modèle les composantes principales qui différaient statistiquement significativement en fonction de celui-ci.

### 2.4.4 *Contrôle des variants issus du SKAT*

L'analyse par *SKAT* nous indiquait si la distribution de tel ou tel gène ou variant différait selon le phénotype: cas ou contrôle. A l'issue de l'analyse, chaque gène et/ou variant candidat issu de l'analyse *SKAT* fut contrôlé de deux *manières*:

1° Un nouveau *SKAT* était réalisé pour voir si la distribution du gène ou du variant candidat différait, non plus en fonction du phénotype, mais bien selon qu'il avait été séquencé sur le premier ou le deuxième séquenceur. Ceux pour lesquels le *FDR* égalait ou dépassait les 5 pourcents étaient éliminés.

2° Les fichiers BAM des variants candidats ont été examinés pour écarter toute possibilité de variant non valide par artéfact technique.

### 2.4.5 *Hypothèse statistique a posteriori*

Compte-tenu de la grande difficulté de trouver des patients tolérants nous nous sommes initialement limités à en trouver "le plus grand nombre possible", sans considérations statistiques particulières. Nous avons ainsi rassemblé la plus grande cohorte de ce type sur le territoire européen. Nous faisons aussi le pari que la tolérance, en tant que phénotype extrême, pouvait avoir des causes monogéniques hautement pénétrantes. En situation de

phénotype extrême et d'hérédité mendélienne, il se fait qu'un nombre incroyablement limité de cas (< 10) peuvent parfois suffire à identifier la mutation causale (Emond et al., 2015b; McLaren et al., 2015; Ng et al., 2009).

Au moment de rédiger ces lignes, nous sommes en train d'estimer la puissance de notre étude par "simulation".

En pratique, cette méthode consiste à modifier notre propre set de données en incorporant un variant artificiel selon les critères définis ci-dessous. Cette opération est répétée 10.000 fois. Chaque fois un nouveau variant aléatoire est introduit dans un autre gène du set de données tiré au sort. Ensuite, on détermine la fréquence avec laquelle le variant recherché a été retrouvé. Cette fréquence correspond à la puissance qu'avait le test de détecter le variant dont on avait au préalable défini la fréquence chez les cas et les contrôles. Cette approche est parfois nommée "*hide the variant*".

Le scénario génétique suivant a été choisi: on considère un variant autosomique dominant de pénétrance complète, présent chez 80% des patients tolérants (32/40 soit une fréquence allélique de 0,4) et chez 1% des contrôles (soit, selon la loi d'Hardy-Weinberg<sup>5</sup> une fréquence allélique de 0,005) autrement dit avec un enrichissement d'un facteur 80.

---

<sup>5</sup> La loi d'Hardy-Weinberg postule qu'au sein d'une population (idéale), il y a équilibre des fréquences alléliques et génotypiques d'une génération à l'autre. De cet équilibre de Hardy-Weinberg, découle la loi de distribution génotypique :  $p^2 + q^2 + 2pq = 1$ , où

- $p^2$  représente la fréquence d'un génotype homozygote AA pour deux allèles "A/",
- $q^2$  : la fréquence d'un génotype homozygote aa pour deux allèles "a/",
- $2pq$  : la fréquence d'un génotype hétérozygote Aa pour un allèle "A/" et un allèle "a/".

D'après Wikipedia, octobre 2019.

## **ANNEXE II - article original dans *Nephrology, Dialysis and Transplantation***

Article: The DESCARTES-Nantes Survey of Kidney Transplant Recipients Displaying Clinical Operational Tolerance identifies 35 new Tolerant Patients and 34 Almost Tolerant Patients.

Type: article original

Auteur.e.s: **Massart A**, Pallier A, Pascual J, Viklicky O, Budde K, Spasovski G, Klinger M, Sever MS, Sørensen SS, Hadaya K, Oberbauer R, Dudley C, De Fijter JW, Yussim A, Hazzan M, Wekerle T, Berglund D, De Biase C, Pérez-Sáez M, Mühlfeld A, Orlando G, Clemente K, Lai Q, Pisani F, Kandus A, Baas M, Bemelman F, Ponikvar JB, Mazouz H, Stratta P, Subra JF, Villemain F, Hoitsma A Braun L, Cantarell MC, Colak H, Courtney A, Frasca GM, Howse M, Naesens M, Reischig T, Serón D, Seyahi N, Tugmen C, Alonso Hernandez A, Beña L, Biancone L, Cuna V, Díaz-Corte C, Dufay A, Gaasbeek A, Garnier A, Gatault P, Gentil Govantes MA, Glowacki F, Gross O, Hurault de Ligny B, Huynh-Do U, Janbon B, Jiménez Del Cerro LA, Keller F, La Manna G, Lauzurica R, Le Monies De Sagazan H, Thaiss F, Legendre C, Martin S, Moal MC, Noël C, Pillebout E, Piredda GB, Puga AR, Sulowicz W, Tuglular S, Prokopova M, Chesneau M, Le Moine A, Guérif P, Soullou JP, Abramowicz M, Giral M, Racapé J, Maggione U, Brouard S, Abramowicz D.

Référence: Nephrol Dial Transplant. 2016; 31(6): 1002-13.



## Original Articles

# The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients

Annick Massart<sup>1,2,\*</sup>, Annaïck Pallier<sup>3,\*</sup>, Julio Pascual<sup>4</sup>, Ondrej Viklicky<sup>5</sup>, Klemens Budde<sup>6</sup>, Goce Spasovski<sup>7</sup>, Marian Klinger<sup>8</sup>, Mehmet Sukru Sever<sup>9</sup>, Søren Schwartz Sørensen<sup>10</sup>, Karine Hadaya<sup>11</sup>, Rainer Oberbauer<sup>12</sup>, Christopher Dudley<sup>13</sup>, Johan W. De Fijter<sup>14</sup>, Alexander Yussim<sup>15</sup>, Marc Hazzan<sup>16</sup>, Thomas Wekerle<sup>17</sup>, David Berglund<sup>18</sup>, Consuelo De Biase<sup>19</sup>, María José Pérez-Sáez<sup>4</sup>, Anja Mühlfeld<sup>20</sup>, Giuseppe Orlando<sup>21</sup>, Katia Clemente<sup>22</sup>, Quirino Lai<sup>22</sup>, Francesco Pisani<sup>22</sup>, Aljosa Kandus<sup>23</sup>, Marije Baas<sup>24</sup>, Frederike Bemelman<sup>25</sup>, Jadranka Buturovic Ponikvar<sup>23</sup>, Hakim Mazouz<sup>26</sup>, Piero Stratta<sup>27</sup>, Jean-François Subra<sup>28</sup>, Florence Villemain<sup>28</sup>, Andries Hoitsma<sup>24</sup>, Laura Braun<sup>29</sup>, Maria Carmen Cantarell<sup>30</sup>, Hulya Colak<sup>31</sup>, Aisling Courtney<sup>32</sup>, Giovanni Maria Frasca<sup>33</sup>, Matthew Howse<sup>34</sup>, Maarten Naesens<sup>35</sup>, Tomas Reischig<sup>36</sup>, Daniel Serón<sup>30</sup>, Nurhan Seyahi<sup>37</sup>, Cem Tugmen<sup>38</sup>, Angel Alonso Hernandez<sup>39</sup>, Luboslav Beňa<sup>40</sup>, Luigi Biancone<sup>41</sup>, Vania Cuna<sup>42</sup>, Carmen Díaz-Corte<sup>43</sup>, Alexandre Dufay<sup>44</sup>, André Gaasbeek<sup>45</sup>, Arnaud Garnier<sup>46</sup>, Philippe Gatault<sup>47</sup>, Miguel Angel Gentil Govantes<sup>48</sup>, François Glowacki<sup>49</sup>, Oliver Gross<sup>50</sup>, Bruno Hurault de Ligny<sup>51</sup>, Uyen Huynh-Do<sup>52</sup>, Bénédicte Janbon<sup>53</sup>, Luis Antonio Jiménez del Cerro<sup>54</sup>, Frieder Keller<sup>55</sup>, Gaetano La Manna<sup>42</sup>, Ricardo Lauzurica<sup>56</sup>, Hervé Le Monies De Sagazan<sup>44</sup>, Friedrich Thaiss<sup>57</sup>, Christophe Legendre<sup>58</sup>, Séverine Martin<sup>59</sup>, Marie-Christine Moal<sup>60</sup>, Christian Noël<sup>49</sup>, Evangeline Pillebout<sup>61</sup>, Gian Benedetto Piredda<sup>62</sup>, Ana Ramírez Puga<sup>63</sup>, Wladyslaw Sulowicz<sup>64</sup>, Serhan Tuglular<sup>65</sup>, Michaela Prokopova<sup>5</sup>, Mélanie Chesneau<sup>66</sup>, Alain Le Moine<sup>1</sup>, Pierrick Guérif<sup>66</sup>, Jean-Paul Soulillou<sup>3,66,68</sup>, Marc Abramowicz<sup>67</sup>, Magali Giral<sup>3,66,68</sup>, Judith Racapé<sup>69</sup>, Umberto Maggiore<sup>19</sup>, Sophie Brouard<sup>3,66,68,\*</sup> and Daniel Abramowicz<sup>70,71,\*</sup>

<sup>1</sup>Renal Unit, CUB Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium, <sup>2</sup>Medical Genetics Department, ULB, Brussels, Belgium, <sup>3</sup>Joint Research Unit 1064, French Institute of Health and Medical Research, Nantes, France, <sup>4</sup>Nephrology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, <sup>5</sup>Department of Nephrology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, <sup>6</sup>Nephrology, Charité Campus Mitte, Berlin, Germany, <sup>7</sup>University Department of Nephrology, Skopje, Macedonia, <sup>8</sup>Nephrology and Transplantation Medicine, Wrocław, Poland, <sup>9</sup>Internal Medicine, Nephrology, Istanbul School of Medicine, Istanbul, Turkey, <sup>10</sup>Nephrology P, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark, <sup>11</sup>Nephrology and Transplantation, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland, <sup>12</sup>Department of Medicine III–Nephrology, Hypertension and Renal Transplantation, Krankenhaus Elisabethinen Linz, Linz, Austria, <sup>13</sup>Richard Bright Renal Centre, Southmead Hospital, North Bristol NHS Trust, Bristol, UK, <sup>14</sup>Department of Medicine, Division of Nephrology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, <sup>15</sup>Department of Transplantation, Rabin Medical Center, Tel Aviv University Sackler School of Medicine, Tel Aviv, Israël, <sup>16</sup>Nephrology Department, CHU Lille, Lille, France, <sup>17</sup>Section of Transplantation Immunology, Department of Surgery, Medical University of Vienna, Vienna,

Austria, <sup>18</sup>Department of Immunology, Genetics and Pathology, Section of Clinical Immunology, Uppsala University, Sweden, <sup>19</sup>UOS Trapianti Rene Pancreas, Centro Trapianti di Parma, Az. Ospedaliero-Universitaria di Parma, Parma, Italy, <sup>20</sup>Department of Nephrology, University Hospital Aachen, Aachen, Germany, <sup>21</sup>Wake Forest School of Medicine, Department of Surgery, Section of Transplantation, Winston-Salem, NC, USA, <sup>22</sup>U.O.C. Trapianti D'Organo, L'Aquila, Italy, <sup>23</sup>Department of Nephrology, Renal Transplantation Centre Ljubljana, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, <sup>24</sup>Kidney Diseases, Radboudumc Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands, <sup>25</sup>Renal Transplant Unit, Department of Nephrology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands, <sup>26</sup>Service de Néphrologie, Unité de Transplantation Rénale et Pancréatique, CHU Sud, Amiens, France, <sup>27</sup>Department of Translational Medicine, Amedeo Avogadro University, AOU Maggiore della Carità di Novara, Novara, Italy, <sup>28</sup>Service de Néphrologie-Dialyse-Transplantation, CHU Angers, Angers, France, <sup>29</sup>Hôpital de jour de Néphrologie, service de Néphrologie et Transplantation Rénale, Nouvel hôpital Civil, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>30</sup>Nephrology, Hospital Universitari Val d'Hebron, Barcelona, Spain, <sup>31</sup>Nephrology, Tepecik Training and Research Hospital, Izmir, Turkey, <sup>32</sup>Regional Nephrology Unit, Belfast City Hospital, Belfast, UK, <sup>33</sup>Nefrologia, Dialisi e Trapianto di rene, AO Torrette Umberto I, Ancona, Italy, <sup>34</sup>Nephrology/Transplantation, Royal Liverpool University Hospital, Liverpool, UK, <sup>35</sup>Department of Nephrology and Renal Transplantation, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium, <sup>36</sup>Nephrology Ward, Department of Internal Medicine, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic, <sup>37</sup>Nephrology, Istanbul University, Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul, Turkey, <sup>38</sup>General Surgery, Tepecik Training and Research Hospital, Yenisehir, Izmir, Turkey, <sup>39</sup>Servicio de Nefrología, Hospital Universitario, A Coruña, Spain, <sup>40</sup>Transplant Centre, University Hospital Louis Pasteur Kosice, Kosice, Slovakia, <sup>41</sup>Department of Medical Sciences, University of Turin, Turin, Italy, <sup>42</sup>Department of Specialized, Experimental and Diagnostic Medicine, Section of Nephrology, Nephrology Dialysis and Renal Transplant Unit, St Orsola University Hospital, University of Bologna, Bologna, Italy, <sup>43</sup>Nephrology, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain, <sup>44</sup>Service Néphrologie, Hôpital Victor Provo, Roubaix, France, <sup>45</sup>Nierziekten, LUMC, Leiden, The Netherlands, <sup>46</sup>Néphrologie – Médecine Interne – Hypertension Pédiatrique, Hôpital des Enfants, Toulouse, France, <sup>47</sup>Service Néphrologie – Immunoclinique, CHRU, Hôpital Bretonneau, Tours, France, <sup>48</sup>Unidad de Gestión Clínica de Urología y Nefrología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain, <sup>49</sup>Nephrology Department, University Hospital of Lille, Lille, France, <sup>50</sup>Department of Nephrology and Rheumatology, University Medicine Göttingen, Göttingen, Germany, <sup>51</sup>Service de Néphrologie, CHRU Avenue Georges Clémenceau, Caen, France, <sup>52</sup>Division of Nephrology, Hypertension and Clinical Pharmacology, Inselspital, University Hospital Bern, Bern, Switzerland, <sup>53</sup>Transplantation rénale, CHU Grenoble, Grenoble, France, <sup>54</sup>Servicio de Nefrología, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain, <sup>55</sup>Internal Medicine 1, Nephrology, University Hospital Ulm, Ulm, Germany, <sup>56</sup>Nephrology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona (Barcelona), Spain, <sup>57</sup>University Hospital Hamburg Eppendorf (UKE), Hamburg, Germany, <sup>58</sup>Université Paris Descartes et Hôpital Necker, Paris, France, <sup>59</sup>Service d'hémodialyse et de Néphrologie, Hôpital Robert Boulin, Libourne, France, <sup>60</sup>Service de Néphrologie, CHRU de Brest, Brest, France, <sup>61</sup>Nephrology Unit, Hôpital Saint Louis, Paris, France, <sup>62</sup>Kidney Diseases, Kidney Transplant Az. Osp. G. Brotzu, Cagliari, Italy, <sup>63</sup>Servicio de Nefrología, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, <sup>64</sup>Department of Nephrology, University Hospital Krakow, Krakow, Poland, <sup>65</sup>Nephrology, Marmara School of Medicine Hastanesi, Istanbul, Turkey, <sup>66</sup>Institute of Transplantation Urology and Nephrology, Nantes University Hospital, Nantes, France, <sup>67</sup>Medical Genetics Department and IRIBHM (Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire), ULB, Brussels, Belgium, <sup>68</sup>Faculty of Medicine, Nantes University, Nantes, France, <sup>69</sup>Research Center of Epidemiology, Biostatistics and Clinical Research, School of Public Health, ULB, Brussels, Belgium, <sup>70</sup>Nephrology-Renal Transplantation Department, Universitair Ziekenhuis Antwerp, Antwerp, Belgium and <sup>71</sup>Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium

Correspondence and offprint requests to: Annick Massart; E-mail: annick.massart@ulb.ac.be

\*Both first and both senior authors contributed equally to this work.

## ABSTRACT

**Background.** Kidney recipients maintaining a prolonged allograft survival in the absence of immunosuppressive drugs and without evidence of rejection are supposed to be exceptional. The ERA-EDTA-DESCARTES working group together with Nantes University launched a European-wide survey to identify new patients, describe them and estimate their frequency for the first time.

**Methods.** Seventeen coordinators distributed a questionnaire in 256 transplant centres and 28 countries in order to report as many 'operationally tolerant' patients (TOL; defined as having

a serum creatinine <1.7 mg/dL and proteinuria <1 g/day or g/g creatinine despite at least 1 year without any immunosuppressive drug) and 'almost tolerant' patients (minimally immunosuppressed patients (MIS) receiving low-dose steroids) as possible. We reported their number and the total number of kidney transplants performed at each centre to calculate their frequency.

**Results.** One hundred and forty-seven questionnaires were returned and we identified 66 TOL (61 with complete data) and 34 MIS patients. Of the 61 TOL patients, 26 were previously described by the Nantes group and 35 new patients are presented here. Most of them were noncompliant patients. At data

collection, 31/35 patients were alive and 22/31 still operationally tolerant. For the remaining 9/31, 2 were restarted on immunosuppressive drugs and 7 had rising creatinine of whom 3 resumed dialysis. Considering all patients, 10-year death-censored graft survival post-immunosuppression weaning reached 85% in TOL patients and 100% in MIS patients. With 218 913 kidney recipients surveyed, cumulative incidences of operational tolerance and almost tolerance were estimated at 3 and 1.5 per 10 000 kidney recipients, respectively.

**Conclusions.** In kidney transplantation, operational tolerance and almost tolerance are infrequent findings associated with excellent long-term death-censored graft survival.

**Keywords:** frequency, graft survival, kidney transplantation, minimally immunosuppressed patients, operational tolerance

## INTRODUCTION

The natural history of an untreated allograft in humans is graft rejection. Immunosuppressive drugs made organ transplantation possible but even the latest generation of these drugs carry the risk of major infectious [1], malignant [2] or metabolic [3] complications. Together with acute and chronic rejections, immunosuppression side effects heavily affect the long-term survival of both allografts and patients [4].

The induction of a tolerant state, intended as a selective acceptance of the allograft by the host immune system, was always a highly desirable goal in transplantation.

Despite outstanding successes [5, 6], induction of tolerance protocols remain risky and are not ready for clinical routine. Interestingly, a very limited number of organ recipients have been described as maintaining a prolonged allograft survival despite the accidental discontinuation of any immunosuppressive drugs [7–9]. Kidney recipients displaying operational tolerance may have withdrawn their immunosuppressive regimen of their own accord—by noncompliance—or may have been advised to do so by their nephrologist on the grounds of serious infections or malignancies [9]. This condition was termed as ‘clinical operational tolerance’ in reference to its spontaneous apparition.

The recently accepted definition of clinical operational tolerance is that of a good and stable graft function for at least 1 year after complete immunosuppression withdrawal [7, 8, 10]. This apparently unambitious definition contrasts with that of experimental tolerance. Aside from this criteria, laboratory animals must fulfil very stringent conditions to be declared tolerant including *in vitro* evidence that donor-specific responses are absent or suppressed and a normal histologic appearance of the transplanted allograft. Often, the demonstration that the donor recipient accepts a second graft from the same donor but rejects a third party graft is required [11]. In practice, physicians and patients—either compliant or not—are often reluctant to perform a biopsy of a well-functioning transplant. In practice, *in vitro* tests or validated surrogate biomarkers are not yet available and challenge transplantations would obviously be non-realistic and futile. As a consequence, the concept of operational tolerance permits a broader range of situations than the strict concept of experimental tolerance does [12].

Despite this minimalist definition, operational tolerance is distinctly rare in kidney transplantation [11, 13]. Indeed, <200 cases of tolerant kidney transplant recipients have been reported to date [7, 9, 10, 13–15] among more than half a million kidney transplants performed worldwide [16]. Several predictive biomarkers have been proposed [10, 15, 17–20] to detect or to predict operational tolerance after drug withdrawal, but none of them has been shown in prospective, controlled trials to allow safe immunosuppression withdrawal. This fact, along with the serious consequences of acute kidney rejection, refrained care providers from testing for tolerance by simply discontinuing immunosuppression, even in a stepwise manner [21]. Also, the exact frequency of operational tolerance among kidney recipients is unknown.

The ERA-EDTA-DESCARTES transplantation working group together with Nantes University (France) set up a European-wide survey to discover and describe new operationally tolerant kidney recipients and to evaluate the cumulative incidence of this phenotype. We aimed to identify new cohorts of operationally tolerant patients for further immunological and molecular studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Survey

Seventeen national or regional coordinators from 28 European countries (Supplementary data, Table S1) sent a standardized questionnaire to 256 transplantation centres or centres offering transplantation consultations between 10 September 2013 and 12 November 2014. Centre investigators were asked to report anonymized data on operationally tolerant (TOL) and almost tolerant (minimally immunosuppressed, MIS) patients. Considering rare and, sometimes, transient conditions, we encouraged the report of every patient with a history of operational tolerance either active or past, alive or dead. Patient screening was performed according to each centre’s own resources through a computerized database or physician recollections. In parallel with the inventory of TOL patients, investigators were asked to report on the total number of kidney transplants ever performed at each centre. Finally, this survey included updated data from the 27 patients previously described by the Nantes group [9]. They were used for the calculation of cumulative incidence and for survival analysis.

### Patients and controls

TOL patients were defined as allogeneic kidney recipients maintaining a good graft function—for working purposes, we chose the clear definition of a serum creatinine below <1.7 mg/dL and a proteinuria <1 g/day or g/g creatinine—for at least 1 year after complete immunosuppression withdrawal [7]. We identified 66 TOL patients of which 61 provided sufficient data to enter the complete analysis while 5 only contributed to the calculation of cumulative incidence.

MIS patients ( $n = 34$ ) fulfilled the same criteria but were still receiving prednisone (or steroid equivalent) at a dose lower than 10 mg/day. Patients with higher creatinine and/or proteinuria but who maintained a stable graft function during at least 1

year without immunosuppression were also considered for analysis ( $n = 4/61$  for TOL and  $1/34$  for MIS). Since we know from previous studies [9, 14] that tolerant states could be transient only but also that those patients were probably rare and precious, we chose to report TOL and MIS patients whether prevalent or not, i.e. inclusive of patients no longer tolerant at the time of the report because of death, resumption of immunosuppressive drugs or declining graft function. Consequently, we also asked our collaborators to report on the full number of transplantations performed at their centre. Finally, we excluded patients in whom operational tolerance resulted from an intervention (e.g. allogeneic stem cell transplantation) or from a transplantation between monozygotic twins.

For comparison purposes, the TOL cohort ( $n = 61$ ) was subdivided into 'new' ( $n = 35$ ) and 'historical' TOL ( $n = 26$ ) patients, for those previously described by the Nantes group [9].

### Data collection

Data were collected using a standardized data form or updated (for Nantes historical TOL patients). The questionnaire included enquiries about recipient's demographics (sex, date of birth, past medical and renal history), donor characteristics (age, sex, living or deceased donors), immunological data [number of human leucocyte antigen (HLA) system mismatches, anti-HLA antibodies, Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) serological status], immunosuppression and tolerance periods (durations, outcomes and graft function). In addition, whenever necessary, the physicians who sent back the questionnaires were contacted by e-mail to complete all the required information. In cases of uncertainty regarding the exact month when operational tolerance started in the context of noncompliance, we arbitrarily chose a start date of 15 June of the first year of complete immunosuppression withdrawal.

### Statistical analysis

Results from continuous variables with and without normal distribution were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and median and interquartile range (IQR), respectively, and categorical data were expressed as percentages. TOL and MIS patients were compared by using Student's *t*-test for normally distributed data, Mann-Whitney *U*-test for non-normally distributed data and Fisher's exact test or  $\chi^2$  for categorical variables. Death-censored graft survival and patient survival analysis were performed for the whole TOL and MIS cohorts according to the Kaplan-Meier method. Statistical analyses were performed using STATA software, version 12 (StataCorp LP). Statistical significance was taken below the 5% level. *P*-values were calculated with full non-normalized data.

## RESULTS

### Cumulative incidence of operational tolerance and almost tolerance among kidney recipients

One hundred and forty-seven out of 256 questionnaires were returned reporting on a total of 218 913 transplants that were performed over a cumulative period of 3635 years. Sixty-six

eligible TOL and 34 MIS patients were identified (Figure 1). Overall, tolerance and almost tolerance were reported in 3 [95% confidence interval (CI): 2.64–3.37] and 1.5 (95% CI: 1.53–1.58) patients out of 10 000 kidney recipients, respectively.

Considering the higher frequency of TOL patients in France, we compared France with the remaining European countries: TOL patients were reported in 3.9 out of 10 000 kidney recipients in France versus 1.7 out of 10 000 outside France ( $P = 0.07$ ).

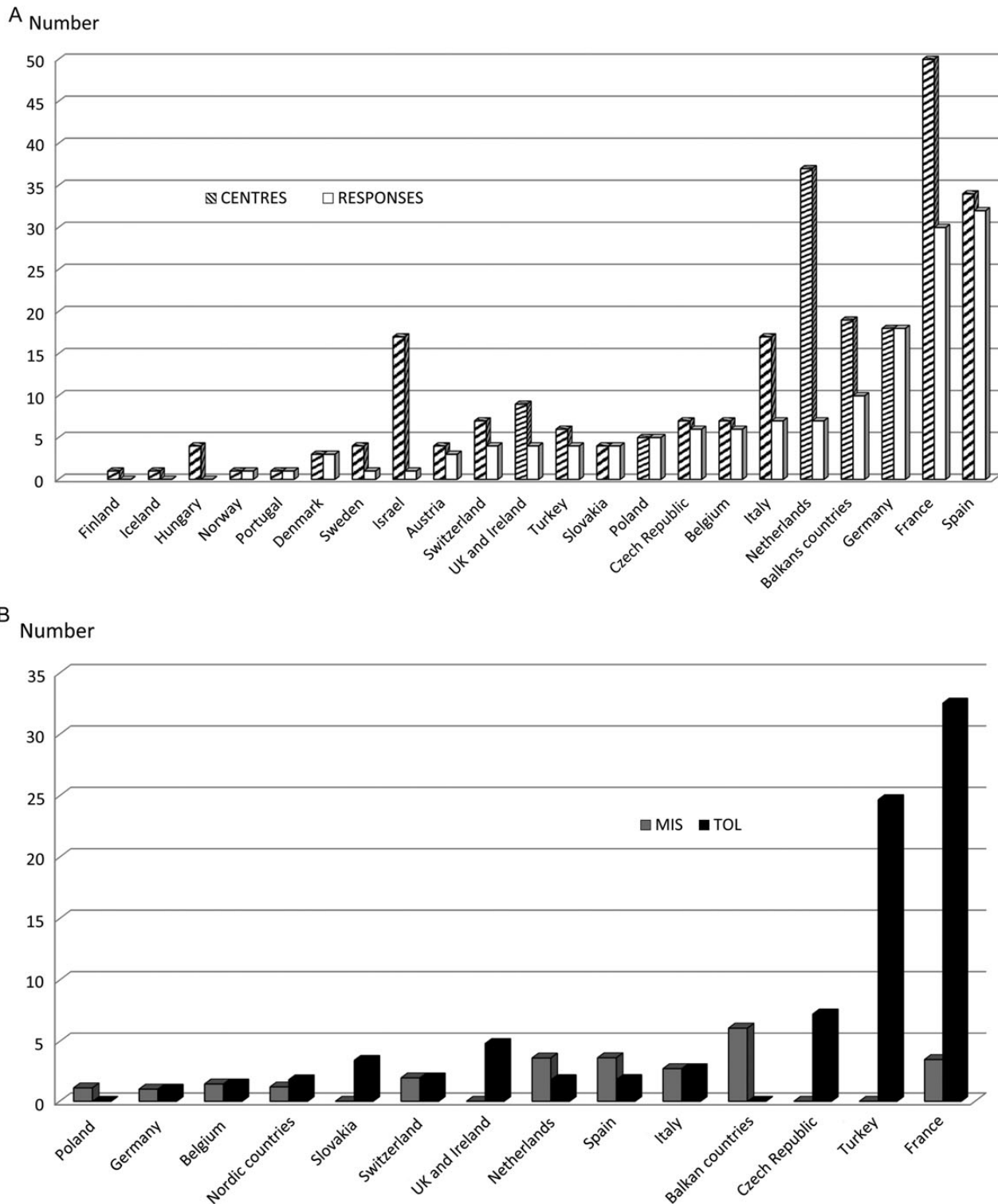
### Characteristics of the 35 new operationally tolerant patients

Important medical or administrative data were missing in 5 out of 66 patients entering the survey. Among the 61 patients with complete data, 26 have been described previously [9]. Thirty-five new TOL subjects are detailed here (see flow chart in Figure 2A and Table 1), of which 31 fulfilled the definition of good graft function as described above. The remaining four have displayed suboptimal (either serum creatinine or proteinuria above the limits) but stable function for at least 1 year without immunosuppressive therapy and also entered the study as TOL (patients referred to as 'T6, T9, T22 and T31' in Figure 3A). These 35 newly described patients were mainly males of European ancestry. Of note, glomerulonephritis/sclerosis or pyelonephritis was reported as primary renal disease in 51%, while diabetes or hypertension was reported in 6%. Patients ( $n = 35$ ) were transplanted at a mean age of  $29 \pm 13$  years. They received their first graft in 88% of cases after spending 17 (8–26) ( $n = 26$ ) months on dialysis. Four patients out of 35 were pre-emptively transplanted. Donors were deceased in 60% of cases ( $n = 21/35$ ), males in 70% ( $n = 23/33$ ) and had a mean age of  $33.5 \pm 11$  years. The cohort was composed of 25% ( $n = 8/31$ ) full HLA-matched donor-recipient pairs. The remaining 23 patients had a mean number of HLA-A, -B and -DR mismatches of  $2.8 \pm 1$ . One-quarter had a history of alloimmunization prior to transplantation, detected either by a complement-dependent cytotoxicity assay or by Luminex. Three out of 35 patients experienced an episode of biopsy-proven rejection before the period of immunosuppression discontinuation. Several patients ( $n = 4/25$ ) developed CMV ( $n = 2$ ) or EBV ( $n = 2$ ) seroconversion under immunosuppression and four were diagnosed with malignancy (lymphoproliferative disease in three and multiple skin cancers in one). The median time passed off immunosuppression was 108 (58–156) months. The majority (90%) of the patients discontinued their immunosuppressive medications because of noncompliance, mental illness or social considerations. At the latest observation of tolerance, median creatinemia was 1.35 (1.1–1.48) mg/dL. Proteinuria exceeding 300 mg/day (but below 1 g/day) was noted in 9 out of 29 patients (31%).

### Characteristics of minimally immunosuppressed patients

We identified 34 MIS patients (Table 1). Thirty-three fulfilled the definition of a good kidney function, while the remaining one presented a suboptimal (serum creatinine above the limit) but stable graft function for at least 1 year with 7.5 mg prednisone per day (patient referred to as 'M10' in Figure 3B). End-stage kidney disease resulted from either glomerulonephritis/

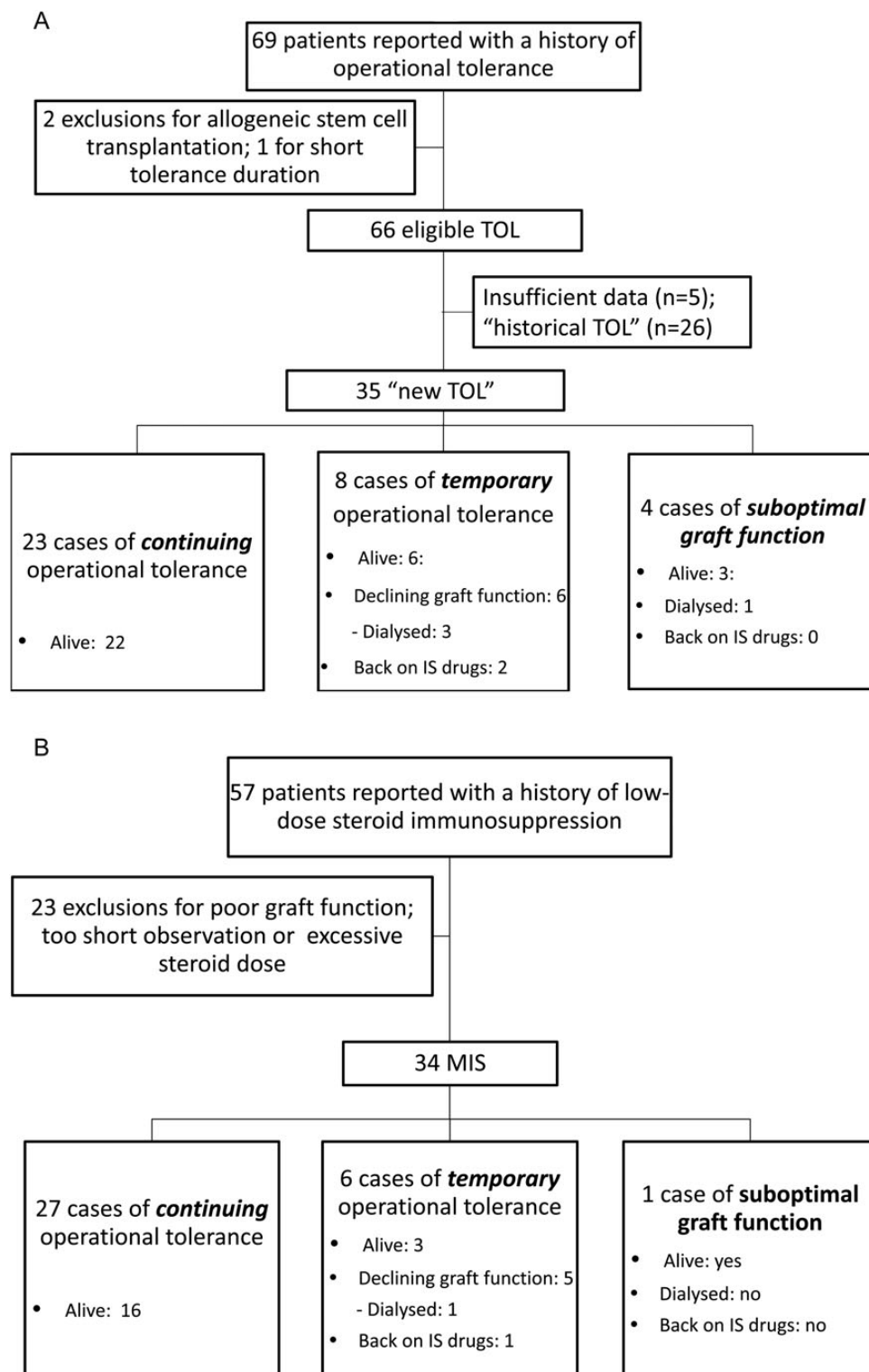




**FIGURE 1: (A)** Number of centres contacted (dashed bars) and questionnaires returned (white bars) per country, ordered by ascending number of questionnaires returned. **(B)** Cumulative incidences of TOL (black bars) and MIS (grey bars) patients reported per 10 000 kidney recipients per country. Countries were ordered by ascending number of combined TOL + MIS incidences.

sclerosis or pyelonephritis in 59% and from diabetes or hypertension in <3%. Dialysis duration was 25 (12–36) months for 27 patients while 2 were pre-emptively transplanted. One patient received a combined kidney–pancreas transplant. Mean donor age was  $32 \pm 14$  years. Sixteen per cent of the donor–

recipient pairs were HLA complete matches ( $n = 5/32$ ), while the others displayed an overall mean number of  $3.2 \pm 1$  mismatches with  $0.9 \pm 0.7$  mismatches at HLA-DR. Eleven patients out of 31 had evidence of HLA immunization prior to transplantation. Twenty-seven patients experienced 32 malignancies



**FIGURE 2:** (A) Flow chart and outcomes of TOL patients through the study. (B) Flow chart and outcomes of MIS patients through the study. IS, immunosuppressive.

under immunosuppression, mainly lymphoproliferative diseases ( $n = 20$ ). This was the major reason for the physician-driven decision of immunosuppression weaning. At the latest observation of almost tolerance, mean creatinemia was 1.23 (0.96–1.5) mg/dL and 10 patients out of 32 (31.2%) displayed proteinuria above 300 mg/day (but below 1 g/day).

#### New operationally tolerant patients follow-up

Data on newly described TOL patients ( $n = 35$ ) covered a median period of 191 (145–255) months post-transplantation. At the time of data capture (see flow chart in Figure 2A), a first group of 23 patients were still operationally tolerant after a median time of 79 (39–120) months without immunosuppression.

**Table 1. Demographic data of tolerant and minimally immunosuppressed patients**

	New TOL patients (N = 35)	Historic TOL patients (N = 26)	All TOL (N = 61)	MIS cohort (N = 34)	P-value for the comparison of all TOL versus MIS
<b>Recipient features</b>					
Age at transplantation date (years) <sup>a</sup>	29.1 ± 13	34.6 ± 16	31.5 ± 14	37.6 ± 14	0.05
Male gender	26 (74)	19 (73)	45 (74)	17 (90)	0.02
European origin	29 (83)	22 (88)	51 (85)	28 (90)	NS
Primary nephropathy					NS
According to ERA-EDTA classification					
Glomerulonephritis/sclerosis	11 (31)	13 (50)	24 (39)	14 (41)	
Pyelonephritis	7 (20)	4 (15)	11(18)	6 (18)	
Polycystic kidney disease	3 (9)	0	3 (5)	3 (9)	
Hypertension	1 (3)	0	1 (2)	0	
Renal vascular disease	0	0	0	1 (3)	
Diabetes	1 (3)	3 (11)	4 (7)	1 (3)	
Miscellaneous	7 (20)	4 (15)	7 (11)	5 (145)	
Unknown	5 (14)	2 (8)	7 (11)	4 (12)	
History of dialysis	28 (85)	20 (95)	48 (90)	32 (94)	NS
Dialysis vintage (months) (excluding zero) <sup>b</sup>	(n = 26) 17 (8–26)	(n = 19) 36 (17–63)	(n = 45) 24 (10–36)	(n = 32) 25 (12–36)	NS
History of auto-immune disease	3 (9)	5 (23)	8 (14)	4 (12)	NS
History of cancer before transplantation period	2 (6)	2 (8)	4 (7)	1 (3)	NS
<b>Transplantation features</b>					
Donor age (years) <sup>a</sup>	(n = 31) 33.5 ± 11	(n = 23) 26.9 ± 15.4	(n = 54) 30.7 ± 13	(n = 33) 32 ± 14	NS
Male gender	23 (70)	16 (70)	39 (70)	21 (64)	NS
Deceased donor	21 (60)	21 (81)	42 (70)	24 <sup>c</sup> (71)	NS
First kidney transplant	31(88)	22 (85)	53 (87)	31 (91)	NS
Cold ischaemia time (min) <sup>b</sup>	(n = 26) 907 (70–1385)	(n = 25) 1245 (720–1860)	(n = 51) 1110 (84–1440)	(n = 29) 1020 (600–1320)	NS
<b>Immunological features</b>					
Full matched transplants	8 (26)	5 (22)	13 (24)	5 (16)	NS
HLA-A, -B, -DR mismatching (excluding full matched pairs) <sup>a</sup>	(n = 23) 2.8 ± 1.1	(n = 18) 2.8 ± 1.1	(n = 41) 2.8 ± 1.1	(n = 27) 3.2 ± 1	NS
HLA-DR mismatching (excluding full matched pairs) <sup>a</sup>	(n = 23) 1.2 ± 0.7	(n = 18) 0.6 ± 0.6	(n = 41) 0.7 ± 0.6	(n = 27) 0.9 ± 0.7	NS
Anti-HLA immunization prior transplantation (either positive PRA or anti-HLA antibodies)	7 (25)	11 (42)	18 (33)	11 (35)	NS
Anti-HLA immunization after transplantation (either positive PRA or anti-HLA antibodies; donor-specific, non-specific or undetermined)	1 (5)	12 (50)	13 (30)	3 (20)	NS
De novo donor-specific antibodies after transplantation	1 (5)	6 (28.6)	7 (17.1)	3 (20)	NS
<b>Immunosuppression period</b>					
IL-2 receptor antagonists	8 (23)	2 (8)	10 (17)	3 (9)	NS
Anti-lymphocyte globulins	9 (26)	9 (36)	18 (30)	9 (27)	NS
Other induction agents	0 (0)	3 (11)	3 (5)	4 (12)	NS
Steroids	34 (100)	25 (96)	60 (100)	34 (100)	
Tacrolimus	11 (32)	1 (4)	12 (20)	5 (15)	NS
Cyclosporine	22 (63)	15 (58)	37 (61)	23 (67)	NS
Mycophenolate acid derivatives	14 (41)	5 (19)	19 (32)	13 (39)	NS
Azathioprine	17 (50)	20 (77)	37 (62)	14 (42)	0.07
mTOR inhibitors	2 (6)	0	2 (3)	(n = 33) 0	NS
Cytomegalovirus seroconversion	2 (8)	(n = 18) 0	2 (5)	3 (13)	NS
Epstein–Barr virus seroconversion	2 (9)	4 (25)	6 (15.8)	3 (15)	NS
Patient with a history of cancer occurring during immunosuppression	4 (11)	10 (40)	14 (23)	27(79)	<0.0001
Post-transplant lymphoma disease	3	6	9	20	
Kaposi sarcoma	0	0	0	3	
Adenocarcinoma	0	3	3	4	
Skin cancer	1	5	6	5	
History of anticancer chemotherapy	2 (6)	4 (15)	6 (10)	19 (56)	<0.0001
History of rituximab use	1 (3)	3 (11)	4 (7)	7 (21)	0.05
Biopsy-proven acute rejection	3 (9)	5 (19)	8 (13)	5 (15)	NS
Immunosuppression exposure (months) <sup>b</sup>	(n = 35) 108 (58–156)	(n = 26) 128 (88–163)	(n = 61) 111 (65–161)	(n = 34) 141 (80–164)	NS

Continued

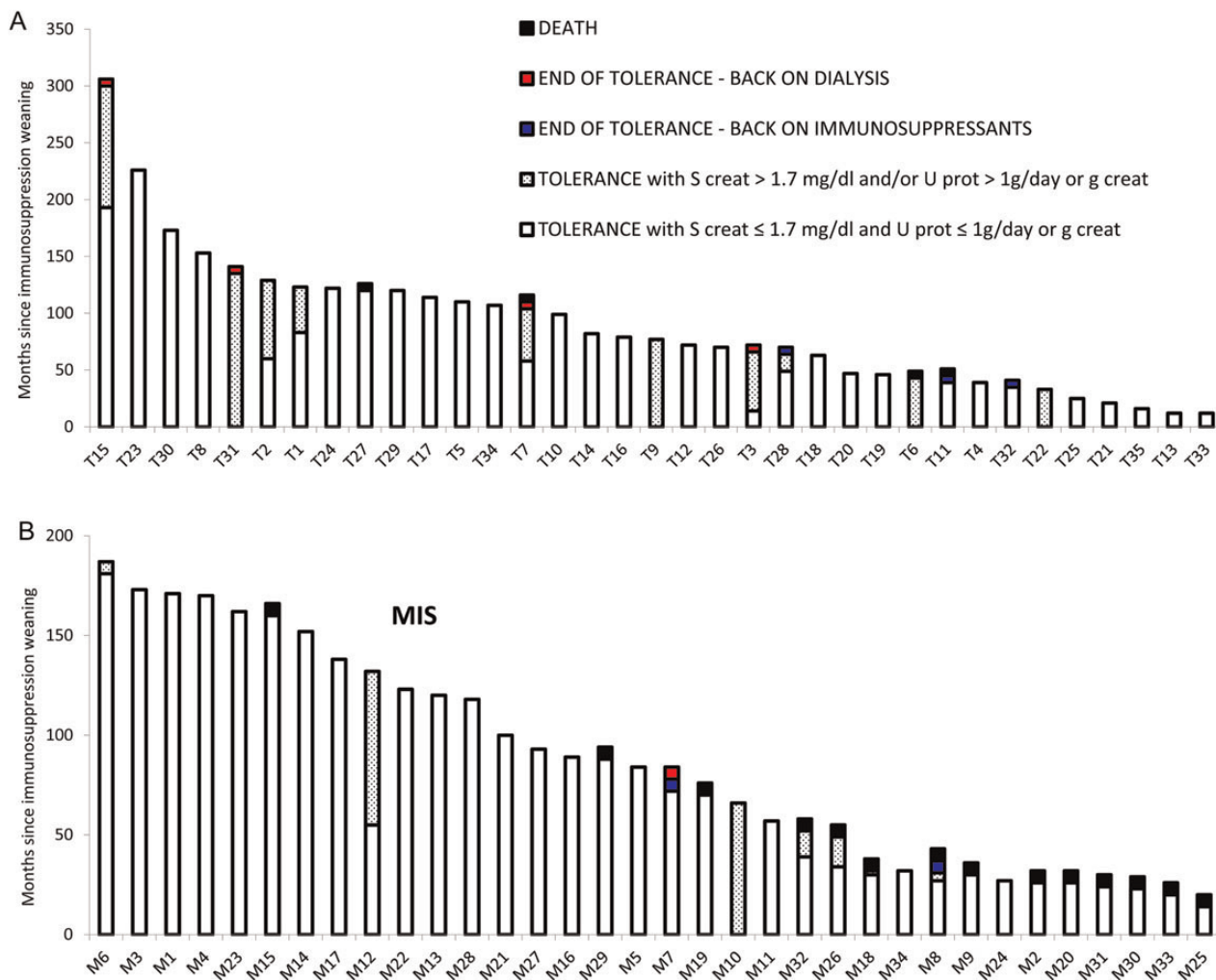
Table 1. Continued

	New TOL patients (N = 35)	Historic TOL patients (N = 26)	All TOL (N = 61)	MIS cohort (N = 34)	P-value for the comparison of all TOL versus MIS
<b>Off-immunosuppression period</b>					
Age at immunosuppression arrest (years) <sup>b</sup>	36 (29–47)	46 (31–57)	40 (31–52)	49 (35–62)	0.04
Cause of immunosuppressive withdrawal					<0.0001
Doctor driven for cancer	2 (6)	6 (23)	8 (13)	22 (81)	
Doctor driven for other reasons	1 (3)	1 (4)	2 (3)	3 (11)	
Patient driven	32 (91)	19 (73)	51 (84)	1 (4)	
Last good serum creatinine (last available before eventual degradation) (mg/dL) <sup>a</sup>	(n = 31) 1.35 (1.1–1.48)	(n = 26) 1.46 (1.12–1.63)	(57) 1.39 (1.11–1.6)	(n = 33) 1.23 (0.96–1.5)	0.08
Proteinuria > 300 mg and <1 g/day or g/g creatinine	9 (31)	15 (60)	24 (44)	10 (31)	NS
Period of optimal graft function without immunosuppressant (months) <sup>b</sup>	(n = 31) 70 (39–114)	(n = 26) 130 (69–172)	(n = 57) 92 (49–136)	(n = 33) 72 (30–123)	NS
Period of functioning transplant without immunosuppressant, irrespective of creatinine (months) <sup>b</sup>	77 (39–120)	153 (80–173)	107 (63–155)	78 (31–132)	0.09

Results from continuous variables are expressed as <sup>a</sup>mean ± SD or <sup>b</sup>median (IQR); any missing data are indicated. Categorical data are expressed as number (%); any missing data can be deduced from numbers with their percentages.

<sup>c</sup>One combined kidney–pancreas transplantation.

NS designates non-significant P-values (≥0.05); however, all P-values ≤0.1 are mentioned.



**FIGURE 3:** Individual trajectories of TOL (A) and MIS (B) patients. White bars account for the duration, in months, of the tolerance period with a good kidney function [serum creatinine (S creat) <1.7 mg/dL and proteinuria (U prot) <1 g/day or g/g creatinine]. Dotted white bars account for the duration of tolerance with a less good kidney function (not meeting the above criteria) but free of dialysis. Coloured bars represent the occurrence of either end of tolerance because of immunosuppression resumption (for TOL patients) or increased dose (for MIS patients) (blue), back on dialysis (red) or patient death (black).

One out of 23 died with good graft function. A second group of four patients displayed suboptimal graft function (either serum creatinine or proteinuria above the limits), however, were stable for at least 1-year period without immunosuppressive medications. Their grafts survived for 60 (35–120) months. One out of four died with a functioning graft and another one required dialysis. The remaining two patients are still dialysis free. Lastly, a third group of eight patients lost their tolerant state after a period of 53 (36–77) months. Two of them were restarted on immunosuppressive medications for undefined graft injury (one haematuria and one glomerulopathy of unknown significance at biopsy) and the six others had a rising creatinine leading to dialysis in three. Their grafts had functioned with no treatment for 85 (45–127) months. Individual trajectories of TOL patients are depicted in Figure 3A.

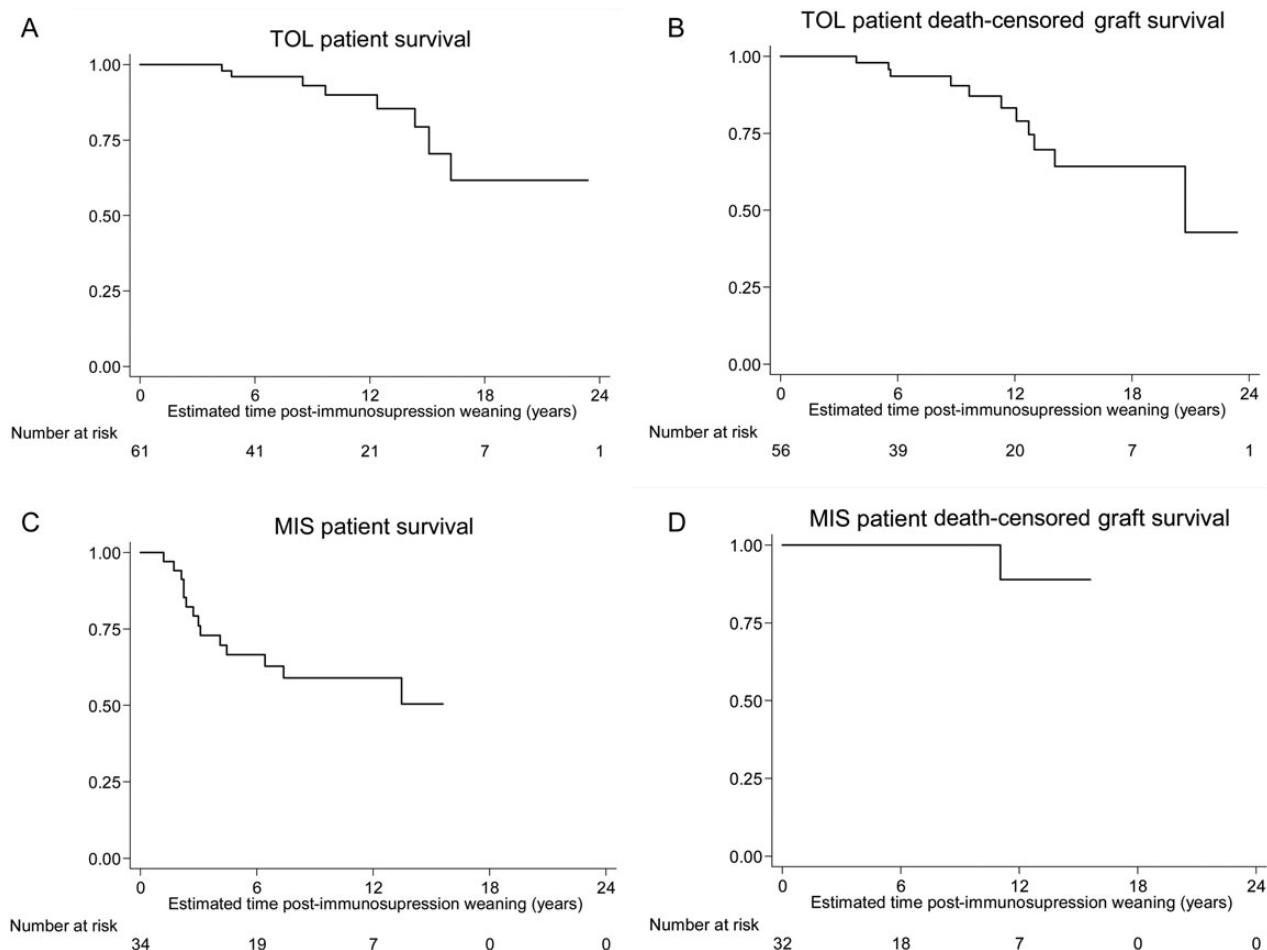
### New minimally immunosuppressed patients follow-up

Data on MIS patients covered a median period of 219 (160–287) months post-transplantation ( $n = 34$ ). Among these 34 MIS patients, 27 were persistently almost tolerant at the time of data capture (see flow chart in Figure 2B). Almost tolerance status lasted 88 (32–99) months. Six other MIS patients

displayed good graft function on low-dose steroids for only 47 (32–99) months, after which one was restarted on a second immunosuppressive drug for a creeping increase in creatinine and five others had a declining graft function exceeding the limits described in the Materials and methods section. Overall, this cohort had functioning grafts for already 62 (44–146) months, while maintained on small doses of corticosteroids only. Finally, a single patient continued to maintain a functioning graft with a suboptimal serum creatinine (1.9 mg/dL at latest observation) 66 months after drug minimization. Individual trajectories of MIS patients are depicted in Figure 3B.

### Patient and graft survival

As illustrated in Figure 4, 10-year patient survival after the establishment of operational tolerance and almost tolerance was 90% (95% CI: 75–96) and 59% (95% CI: 41–74), respectively. Death-censored graft survival at 10 years after the establishment of operational tolerance or almost tolerance was 87.1% (95% CI: 71.2–95.6) and 100% respectively. We did not directly compare TOL with MIS patients because those populations were different with regard to cancer incidence rates and other confounding factors.



**FIGURE 4:** (A) TOL patient survival. (B) TOL patient death-censored graft survival. (C) MIS patient survival. (D) MIS patient death-censored graft survival. TOL and MIS patients who returned on higher immunosuppressive drug levels before reaching death or graft loss were excluded from death-censored graft survival analysis (patients T11, 28, 32, 48 and 60; M7 and 8).

## DISCUSSION

Here, we described 61 operationally tolerant and 34 almost tolerant kidney recipients at the same time. This unique, and likely the world's largest, data collection on tolerance in kidney transplantation should help draw more stable conclusions on those traits.

First, this study highlights that viral seroconversions, anti-HLA immunization, episodes of graft rejection and young age but also, history of autoimmune diseases were all conditions that were compatible with the later installation of operational tolerance. This is accumulating evidence that operational tolerance is acquired and specific and not the consequence of a generalized immune deficiency process [7, 22] and, notably, immunosenescence. The abundance of MIS patients displaying a good graft function years after cancer diagnosis and subsequent immunosuppression weaning also argues against a global immunodeficiency state.

Second, TOL and MIS patients demonstrated a prolonged death-censored graft survival and, for TOL patients only, a surprisingly long patient survival. European-wide data from the Collaborative Transplant Study report patient and death-censored graft survival for kidney patients below 75% at 10 years [23]. Although the cohorts are not comparable, it is striking that 85 and 100% of surviving TOL and MIS patients, respectively, had a functioning graft 10 years after immunosuppression weaning. For most of them, this represented >20 years of functioning graft. In line with this finding, a previous report [13] highlighted that, in 2004, eight out of nine kidney recipients with the world's longest graft survival were actually clinically tolerant. Seven of them still had good renal function after 39–40.5 years. Importantly, it is not clear whether the excellent patient and graft survival we observed were a consequence of immunosuppression minimization or whether some conditions associated with the development of operational tolerance (such as graft quality, recipient health or HLA matches) also confer a survival benefit, leading to a selection bias. In this regard, in the previous report on the 27 historical cases of operational tolerance [9], no clinical differences were found between TOL patients and the two matched groups of patients with stable graft function and those who rejected their graft after arrest of immunosuppression.

Third, the duration of operational tolerance and almost tolerance was, however, extremely variable. They are unstable phenotypes, which may be interrupted at any time, even after several years. Regarding historical cases of operational tolerance, we have previously stressed the wide disparities among operationally tolerant patients. Whereas some will virtually never develop any measurable immunological response towards the graft, others will mount immunological responses such as donor-specific antibodies, yet compatible with a prolonged allograft survival; finally, a third non-stable group will surreptitiously develop a damaging process that will end in graft loss in just a few years [12]. All these patients share the same designation of operational tolerance. There is thus a pressing need for reliable and clinically available biomarkers that go beyond binary criteria based on creatinine and/or proteinuria

levels. Several biomarkers have been proposed [10, 15, 17–19], but we still lack knowledge on their predictive and discriminative values based on prospective studies [20, 24].

We believe that the data presented here will be useful to confront phenotypic assumptions about those patients but also to support the development or the continuation of large networks dedicated to operational tolerance mechanistic studies (indices of tolerance, RISE, ITN: see summary at <http://www.kcl.ac.uk/lsm/research/divisions/timb/research/tolerance/index.aspx>). This study should also constitute an appeal to new clinicians to join our research efforts.

Patient dispersion is indeed a major obstacle for knowledge and research into operational tolerance [25]. Our strategy directly tackled this issue. The existence of a working group within the ERA-EDTA dedicated to transplantation (DESCARTES) and the interest of the Nantes hospital group for such patients for more than a decade provided a very helpful platform to access a high number of nephrologists across Europe. In particular, the personal contacts between the national coordinators and the local investigators were critical to this success.

Unfortunately, rare conditions also challenge the realization of prospective controlled studies. Most of the time, retrospective uncontrolled case analyses—typically registries—remain the most valuable research options [26]. As a consequence, systematic numbering of patients or prevalence could be difficult to assess, recruitment strategies could be biased and patient-related information could suffer lack of uniformity.

We reported 3 and 1.5 TOL and MIS patients per 10 000 kidney recipients, respectively. Of note, the cumulative incidence of operational tolerance described in this study is an approximation as it is difficult to accurately determine medication compliance/adherence. Detection of noncompliance relies on the patient's acknowledgement and, when available, on undetectable drug blood levels, prescription assistant software, and pharmacy repertoires or national security system records. Completing the required data for TOL or MIS patients is time-consuming, and some of our closest colleagues confessed to us not having found the time to report them. Finally, a lot of the centres were not able to reliably capture patients who may have temporarily fulfilled the criteria. It is likely, therefore, that the cumulative incidence of tolerant patients reported here is a minimum evaluation.

We acknowledge that unsystematic patient screening, absence of method uniformity in the biological tests reported and the lack of prospective biological and histological follow-up are limitations in this work. However, in the setting of a rare trait usually associated with noncompliance and patient concealment, this survey represents a valuable effort of not less than 145 kidney transplant practitioners across Europe. This survey brings further evidence that some transplant patients may spend prolonged periods without immunosuppressive drugs. We showed that operational tolerance was associated with excellent patient and graft outcomes, but not necessarily unlimited over time. As already stressed in the setting of experimental tolerance a long time ago [27], operational tolerance is also metastable in nature, not black or white, and 'every degree is represented'. This study, descriptive in nature, should help to set up or continue networks to support further clinical, immunological and molecular studies.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <http://ndt.oxfordjournals.org>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This survey was funded by the ERA-EDTA-DESCARTES working group, the Fonds Erasme (research grant), the Fonds Carine Vyghen, the Fonds Horlait-Dapsens, the RTRS Fondation de Coopération Scientifique CENTAURE and the IHU-Cesti project, which received French government financial support managed by the National Research Agency via the 'Investment Into The Future' program ANR-10-IBHU-005. J.Pascual is supported by FIS-FEDER PI13/00598 and REDINREN RD12/0021/0024. We are also very indebted to the colleagues who replied to the survey: Albania: M. Barbullushi, A. Idrizi, University Hospital Center Mother Teresa, Tirana. Austria: G. Mayer, Medical University, Innsbruck; A. Rosenkranz, Medical University, Graz. Belgium: J. Sennesael, BBJTP, Brussels; J.-L. Bosmans, University Hospital, Antwerpen; M. De Meyer, Cliniques universitaires Saint Luc UCL, Brussels; S. Van Laecke, University Hospital, Ghent. Bosnia and Herzegovina: E. Mesic, University Hospital, Tuzla; H. Resic, University Hospital, Sarajevo. Croatia: N. Basic Jukic, University Hospital, Zagreb; M. Knotek, University Hospital Merkur, Zagreb. Czech Republic: T. Seeman, Department of Pediatrics, University Hospital Motol, Prague; P. Navratil, University Hospital, Hradec Kralove; J. Dedochova, University Hospital, Ostrava; K. Krejci, University Hospital, Olomouc. Denmark: K. Skov, University Hospital, Aarhus; C. Bistrup, University Hospital, Odense. France: C. Presne, Hopital Sud CHU Amiens, Amiens; R. Joannides, Hopital de Bois Guillaume CHU Rouen, Bois Guillaume; P. Grise, D. Guerrot, I. Etienne, M. Hanoy, M. Godin, and B. Legallier, Hopital de Bois Guillaume CHU Rouen, Bois Guillaume; P. Merville, CHU Pellegrin, Bordeaux; G. Robert, CHU de Bordeaux, Bordeaux; J.-P. Boiteux and P. Deteix, CHU Hopital G. Montpied, Clermont Ferrand; V. Audard, S. Homs, T. Kofman and P. Lang, Hopital Henri Mondor (Ap Hp), Creteil; B. Charpentier, Hopital de Bicetre (Ap Hp), Le Kremlin Bicetre; M. Dehennault, R. Novo and Ch. Samaille, Hop Jeanne de Flandre Chr Lille, Lille; J.-P. Rerolle, CHU Dupuytren Limoges, Limoges; Y. Berland, P. Brunet, N. Jourde Chiche, E. Lechevallier, Ch. Maurin, V. Moal, R. Purgus and H. Vacher Coponat, Hopital de la Conception, Marseille 5eme; L. Cabaniols, T. Murez and G. Poinas, Hopital Lapeyronie CHU Montpellier, Montpellier; G. Favre, A. Jeribi and O. Moranne, Hopital Pasteur, Nice; I. Jollet, Efs Centre Atlantique, Poitiers; E. Verdier, CHU la Miletrie, Poitiers; T. Frouget, P. Le Pogamp, J. Rivalan and C. Vigneau, C. H. R. Pontchaillou Rennes, Rennes; Y. Georg and P. Wolf, CHU de Strasbourg/Nouvel Hopital Civil, Strasbourg. Germany: M. Wiesener, University Hospital, Erlangen; W. Arns, Merheim Medical Center, Cologne; T. Rath, Westfalz-Klinikum, Kaiserlautern; M. Nitschke, University Hospital Schleswig-Holstein, Lübeck; U. Kunzendorf, University Hospital Schleswig-Holstein,

Kiel; B. Banas, University Hospital, Regensburg; M. van der Giet, Charité-Campus Benjamin Franklin, Berlin; C. Schinköthe, University Hospital, Jena; O. Hakenberg, Universitätsmedizin, Rostock; B. Krämer, Transplant Centre, Mannheim; R. Weimer, Internal Medicine/Nephrology, Gießen; M. Haubitz, Nephrologie, Klinikum Fulda; W. Gwinner, Medical School, Hannover. Greece: J. Boletis, Laiko University Hospital, Athens; K. Siamopoulos, University Hospital, Ioannin. Ireland: P. J. Conlon, Beaumont Hospital, Dublin. Israel: Y. Frishberg, Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem. Norway: A. Varberg Reisæter, Oslo University Hospital – Rikshospitalet. Poland: M. Krajewska, Medical University, Wroclaw; M. Nowicki, Medical University, Lodz; A. Dębska-Ślizień, Transplant Centre, Gdańsk; M. Durlík, Transplant Centre, Warsaw. Portugal: D. Machado, Hosp Santa Cruz, Carnaxide. Serbia: R. Naumovic, Clinic of Nephrology, Clinical Center of Serbia, Belgrade. Slovakia: Z. Zilinska, University Hospital, Bratislava; E. Lackova, University Hospital, Banska Bystrica; I. Dedinska, University Hospital, Martin. Spain: C. Jiménez, Hospital Universitario La Paz, Madrid; D. Marrero, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife; J. Portoles, Hospital Puerta de Hierro, Madrid; E. Gavela, Hospital Doctor Peset, Valencia; E. Rodrigo, Hospital U.M.V., Santander; L. Guirado, Fundacio Puigvert, Barcelona; J. J. Cubero Gómez, Hospital Infanta Cristina, Badajoz; R. G. Agudo, La Mancha-Centro Hospital Complex, Alcázar de San Juan; M. L. Rodríguez Ferrero, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid; G. Tabernero Fernández, Hospital Universitario de Salamanca; A. Osuna, Virgen Nieves Hospital, Granada; A. Mazuecos, Hospital Puerta del Mar, Cádiz; R. Sanchez Hernandez, Hospital General de Segovia, Segovia; M. Velo, Alcalá de Henares, Madrid; O. Gracia, Hospital de Alcañiz, Teruel; M<sup>a</sup> D. del Pino, Complejo Hospitalario Torrecardenas, Almería; A. Vila Santandreu, Hospital Sant Joan de Deu, Esplugues de Llobregat; S. Cigarrán Hospital Da Costa, Burela; J. Martins Muñoz, Hospital Universitario de Getafe, Madrid; G. de Arriba, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara; K. Toledo, José Molina Orosa, Arrecife, Lanzarote; M. Martin, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida; J. Ocaña, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid. Switzerland: J. Steiger, University Hospital, Basel; I. Binet, Cantonal Hospital, St Gallen. The Netherlands: S.A. Nurmohamed, VU University medical center, Amsterdam; R.C. Bakker, Amphia Hospital, Breda; M. H. L. Christiaans, University Medical Centre, Maastricht; E. Scholten, MC Haaglanden, Den Haag.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

## REFERENCES

1. Snyder JJ, Israni AK, Peng Y *et al*. Rates of first infection following kidney transplant in the United States. *Kidney Int* 2009; 75: 317–326
2. Farrugia D, Mahboob S, Cheshire J *et al*. Malignancy-related mortality following kidney transplantation is common. *Kidney Int* 2014; 85: 1395–1403
3. Ghisdal L, Van Laecke S, Abramowicz MJ *et al*. New-onset diabetes after renal transplantation: risk assessment and management. *Diabetes Care* 2012; 35: 181–188

4. Pascual M, Theruvath T, Kawai T *et al.* Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346: 580–590
5. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S *et al.* Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2008; 358: 362–368
6. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR *et al.* HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008; 358: 353–361
7. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 736–746
8. Lerut J, Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 1774–1780
9. Brouard S, Pallier A, Renaudin K *et al.* The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant* 2012; 12: 3296–3307
10. Newell KA, Asare A, Kirk AD *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1836–1847
11. Newell KA. Clinical transplantation tolerance. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 91–104
12. Souillou JP, Giral M, Brouard S. Operational tolerance in kidney transplantation—improved terminology may enable more precise investigation. *Transplantation* 2013; 96: e36–e38
13. Starzl TE, Murase N, Demetris AJ *et al.* Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* 2004; 77: 926–929
14. Zoller KM, Cho SI, Cohen JJ *et al.* Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey. *Kidney Int* 1980; 18: 110–114
15. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B *et al.* Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1848–1861
16. Berlanda M, Di Cocco P, Mazzotta C *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation: a short literature review. *Transplant Proc* 2008; 40: 1847–1851
17. Brouard S, Mansfield E, Braud C *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 15448–15453
18. Roedder S, Li L, Alonso MN *et al.* A three-gene assay for monitoring immune quiescence in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 2042–2053
19. Baron D, Ramstein G, Chesneau M *et al.* A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney Int* 2015; 87: 984–995
20. Girmanova E, Hruba P, Viklicky O. Circulating biomarkers of tolerance. *Transplant Rev (Orlando)* 2015; 29: 68–72
21. Snanoudj R, Tinel C, Legendre C. Immunological risks of minimization strategies. *Transpl Int* 2015; 28: 901–910
22. Ballet C, Roussey-Kesler G, Aubin JT *et al.* Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am J Transplant* 2006; 6: 2796–2801
23. <http://www.ctstransplant.org/public/policy.shtml>, *K-15102 and K-15107*, 17 April 2015, date last accessed
24. Baron D, Giral M, Brouard S. Reconsidering the detection of tolerance to individualize immunosuppression minimization and to improve long-term kidney graft outcomes. *Transpl Int* 2015; 28: 938–959
25. Devuyt O, Knoers NV, Remuzzi G *et al.* Rare inherited kidney diseases: challenges, opportunities, and perspectives. *Lancet* 2014; 383: 1844–1859
26. Kelly RJ, Hochsmann B, Szer J *et al.* Eculizumab in pregnant patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2015; 373: 1032–1039
27. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172: 603–606

Received for publication: 23.9.2015; Accepted in revised form: 29.11.2015

*Nephrol Dial Transplant* (2016) 31: 1013–1021  
doi: 10.1093/ndt/gfw017  
Advance Access publication 24 March 2016



# 3 ETUDE DU DETERMINISME GENETIQUE DES PATIENTS TOLERANTS OPERATIONNELS

## RESUME

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de notre recherche de variants génétiques associés à la tolérance aux greffons rénaux. En guise de préliminaire, nous montrons comment la première étude pangénomique d'association validée sur le rejet aigu d'allogreffe rénale, réalisée par notre équipe, a mis en exergue deux polymorphismes proches de gènes pertinents et non reconnus jusqu'alors (3.1). Suite à cela, nous avons voulu savoir si des variants génétiques plus rares et de haut impact, typiquement exoniques et non couverts par les *microarrays* utilisés dans les *GWAS*, pouvaient eux aussi avoir un impact sur l'alloréactivité, nous avons ainsi développé une étude originale visant à trouver une association génotype-phénotype dans la tolérance aux greffons en couvrant tous les exons dont nous présentons les résultats en section (3.2).

## SOMMAIRE

<b>3 ETUDE DU DETERMINISME GENETIQUE DES PATIENTS TOLERANTS OPERATIONNELS .....</b>	<b>73</b>
<b>3.1 Préliminaire: contribution à la première étude d'association pangénomique     validée sur le rejet de greffe en transplantation rénale .....</b>	<b>75</b>
<b><i>ANNEXE III - article original dans l'American Journal of Transplantation .....</i></b>	<b>77</b>
<b><i>ANNEXE IV - lettre à l'éditeur dans l'American Journal of Transplantation .....</i></b>	<b>79</b>

<b>3.2 Etude cas-témoin des déterminants génétiques de la tolérance opérationnelle en transplantation rénale par séquençage d'exomes .....</b>	<b>81</b>
3.2.1 <i>A propos de cette section .....</i>	<i>81</i>
3.2.2 <i>Filtration des variants .....</i>	<i>81</i>
3.2.3 <i>Analyse en composantes principales de l'ensemble des variants.....</i>	<i>81</i>
3.2.4 <i>Analyse par SKAT à l'échelle des gènes et des variants.....</i>	<i>83</i>
3.2.5 <i>Eléments de discussion quant à nos analyses par SKAT-O.....</i>	<i>93</i>
3.2.6 <i>Améliorations possibles.....</i>	<i>96</i>

### **3.1 Préliminaire: contribution à la première étude d'association pangénomique validée sur le rejet de greffe en transplantation rénale**

Nous introduisons ici un travail dirigé par les Dr et Prof. L. Ghisdal et M. Abramowicz (*L. Ghisdal et al. American Journal of Transplantation 2017*, disponible en Annexe III, page 77) et ceci pour deux raisons. La première est que ce travail a servi de tremplin à l'étude exomique des patients tolérants, l'auteure de ces lignes y a été impliquée, a contribué à la production d'une partie des résultats et a ensuite été amenée à les mettre en exergue à l'occasion de la publication d'une nouvelle *GWAS* par une autre équipe (*A. Massart et al. American Journal of Transplantation 2018*, disponible en Annexe IV, page 79). En second parce que ce travail met en perspective l'étude panexomique des patients tolérants. La *GWAS* dont nous parlons fournit la preuve du concept que des variants génétiques du receveur peuvent influencer sur le risque de rejet de greffe. En filigrane, cette *GWAS* montre aussi que les variants communs - ceux qui sont ciblés par les *GWAS* - échouent cependant à rendre compte d'une part significative de la variabilité interindividuelle du rejet telle qu'observée au quotidien par les cliniciens.

Un travail sur les variants rares et très délétères, tels que ceux affectant les régions codantes du génome s'imposait.



## **ANNEXE III - article original dans l'*American Journal of Transplantation***

Article: Genome-Wide Association Study of Acute Renal Graft Rejection.

Type: article original

Auteur.e.s: Ghisdal L, Baron C, Lebranchu Y, Viklický O, Konarikova A, Naesens M, Kuypers D, Dinic M, Alamartine E, Touchard G, Antoine T, Essig M, Rerolle JP, Merville P, Taupin JL, Le Meur Y, Grall-Jezequel A, Glowacki F, Noël C, Legendre C, Anglicheau D, Coppieters W, Docampo E, Georges M, Ajarchouh Z, **Massart A**, Racapé J, Abramowicz D, Abramowicz MJ.

Référence: Am J Transplant. 2016; 17(1): 201-209



# Genome-Wide Association Study of Acute Renal Graft Rejection

L. Ghisdal<sup>1,\*†</sup>, C. Baron<sup>2</sup>, Y. Lebranchu<sup>2</sup>,  
O. Viklický<sup>3</sup>, A. Konarikova<sup>3</sup>, M. Naesens<sup>4,5</sup>,  
D. Kuypers<sup>4,5</sup>, M. Dinic<sup>6</sup>, E. Alamartine<sup>6</sup>,  
G. Touchard<sup>7</sup>, T. Antoine<sup>7</sup>, M. Essig<sup>8</sup>,  
J. P. Rerolle<sup>8</sup>, P. Merville<sup>9</sup>, J. L. Taupin<sup>10</sup>,  
Y. Le Meur<sup>11</sup>, A. Grall-Jezequel<sup>11</sup>, F. Glowacki<sup>12</sup>,  
C. Noël<sup>12</sup>, C. Legendre<sup>13</sup>, D. Anglicheau<sup>13</sup>,  
N. Broeders<sup>1</sup>, W. Coppieters<sup>14</sup>, E. Docampo<sup>14</sup>,  
M. Georges<sup>14</sup>, Z. Ajarchouh<sup>15</sup>, A. Massart<sup>1,15</sup>,  
J. Racapé<sup>16</sup>, D. Abramowicz<sup>1,17</sup> and  
M. Abramowicz<sup>15,18</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Dialysis, and Transplantation, Hôpital Erasme (Université Libre de Bruxelles), Brussels, Belgium

<sup>2</sup>Department of Nephrology, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Tours, France

<sup>3</sup>Department of Nephrology, Transplant Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Microbiology and Immunology, KU Leuven, University of Leuven, Leuven, Belgium

<sup>5</sup>Department of Nephrology, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

<sup>6</sup>Department of Nephrology, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

<sup>7</sup>Department of Nephrology, Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Poitiers, France

<sup>8</sup>Department of Nephrology, Dialysis, Transplantation, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges and INSERM UMR 850 (Université de Limoges), Limoges, France

<sup>9</sup>Department of Nephrology, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>10</sup>Department of Immunology and Histocompatibility, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

<sup>11</sup>Department of Nephrology, Centre Hospitalier Universitaire la Cavale blanche, Brest, France

<sup>12</sup>Department of Nephrology, Centre Régional Hospitalier Universitaire de Lille, Lille, France

<sup>13</sup>Department of Renal Transplantation, Université Paris Descartes and Hôpital Necker, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>14</sup>Unit of Animal Genomics, Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée-Research (GIGA-R), University of Liège, Liège, Belgium

<sup>15</sup>Institute of Interdisciplinary Research in Molecular and Human biology (IRIBHM), Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

<sup>16</sup>Centre of Epidemiology, Biostatistic and Clinical Research, School of Public Health (Université Libre de Bruxelles), Brussels, Belgium

<sup>17</sup>Department of Nephrology, Antwerp University Hospital, Antwerpen, Belgium

<sup>18</sup>Medical Genetics Department, Hôpital Erasme (Université Libre de Bruxelles), Brussels, Belgium

\*Corresponding author: Lidia Ghisdal, lidia.ghisdal@epicura.be

†Present address: Department of Nephrology, Centre Hospitalier EpicURA, Baudour, Belgium

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

**Acute renal rejection is a major risk factor for chronic allograft dysfunction and long-term graft loss. We performed a genome-wide association study to detect loci associated with biopsy-proven acute T cell-mediated rejection occurring in the first year after renal transplantation. In a discovery cohort of 4127 European renal allograft recipients transplanted in eight European centers, we used a DNA pooling approach to compare 275 cases and 503 controls. In an independent replication cohort of 2765 patients transplanted in two European countries, we identified 313 cases and 531 controls, in whom we genotyped individually the most significant single nucleotide polymorphisms (SNPs) from the discovery cohort. In the discovery cohort, we found five candidate loci tagged by a number of contiguous SNPs (more than five) that was never reached in iterative *in silico* permutations of our experimental data. In the replication cohort, two loci remained significantly associated with acute rejection in both univariate and multivariate analysis. One locus encompasses *PTPRO*, coding for a receptor-type tyrosine kinase essential for B cell receptor signaling. The other locus involves ciliary gene *CCDC67*, in line with the emerging concept of a shared building design between the immune synapse and the primary cilium.**

**Abbreviations:** BCR, B cell receptor; CNI, calcineurin inhibitor; GWAS, genome-wide association study; IRB, institutional review board; LD, linkage disequilibrium MAF, minor allelic frequency; MM, mismatch; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism; TCMR, T cell-mediated rejection

Received 18 February 2016, revised 29 April 2016 and accepted for publication 23 May 2016

## Introduction

Acute rejection of renal allograft remains a major risk factor for the later development of chronic allograft dysfunction and long-term graft loss (1). Nonadherence to therapy, HLA mismatches (MM), anti-HLA immunization, longer period of dialysis before transplantation, younger age, and prolonged cold ischemia time are recognized risk factors of acute renal rejection (2). Besides these classical immunological risk factors, genetic recipient background is likely to modulate the risk of acute rejection. Immune responses involved in the acute rejection process, mediated by T and B lymphocytes, are regulated through a complex, highly regulated network of molecular signals controlled by a large number of encoding genes, among which some could represent a potential candidate that could be associated with an increased alloreactivity.

Numerous association studies of candidate genes have been reported in renal transplantation since the year 2000, and dealt mainly with single nucleotide polymorphism (SNPs) in genes encoding cytokines, chemokines, complement, Toll-like receptors, and VEGF (3). These studies produced conflicting results, and were prone to false positive, spurious association findings because of inadequate sample size, population stratification, and lack of replication in independent cohorts. To date, no genetic locus has clearly emerged as a risk or as a protection factor for acute rejection of solid organ allograft.

In spite of the coming of age of whole genome sequencing, genome-wide association studies (GWAS) using arrays of SNPs remain a powerful approach to identify novel genes or loci by analyzing millions of genetic variants, with no *a priori* hypothesis on gene function, allowing for the discovery of previously unthought-of pathways. Studying genetic susceptibility of acute rejection is particularly complex. First, acute rejection is not a disease but a complication resulting from alloreactivity that is modulated by factors from the recipient, the donor, and by immunosuppressive therapies. Second, apart from a case-control retrospective study suggesting a trend for familial aggregation in recipients with acute rejection, there is no report from families where multiple members with renal failure received a kidney transplant (4). As transplantation is rarely familial, the existence of some major, Mendelian or near-Mendelian, genetic factor predisposing to graft rejection would remain practically unnoticed as a hereditary phenotype. In the absence of evidence against such a major gene effect(s), we hypothesized that one or several genetic variants could confer a high relative risk of graft rejection, but no significant risk for disease outside the frame of transplantation, with a relative risk high enough for this gene(s) variant(s) to be amenable to a GWAS with suitable cohorts of

transplanted patients. If this hypothesis is true, finding this gene(s) variant(s) would be an important milestone.

Here, we gathered two large European cohorts of kidney transplant recipients, and report the first GWAS of biopsy-proven acute rejection occurring within the first year after transplant in low-immunological risk white patients receiving a first renal allograft.

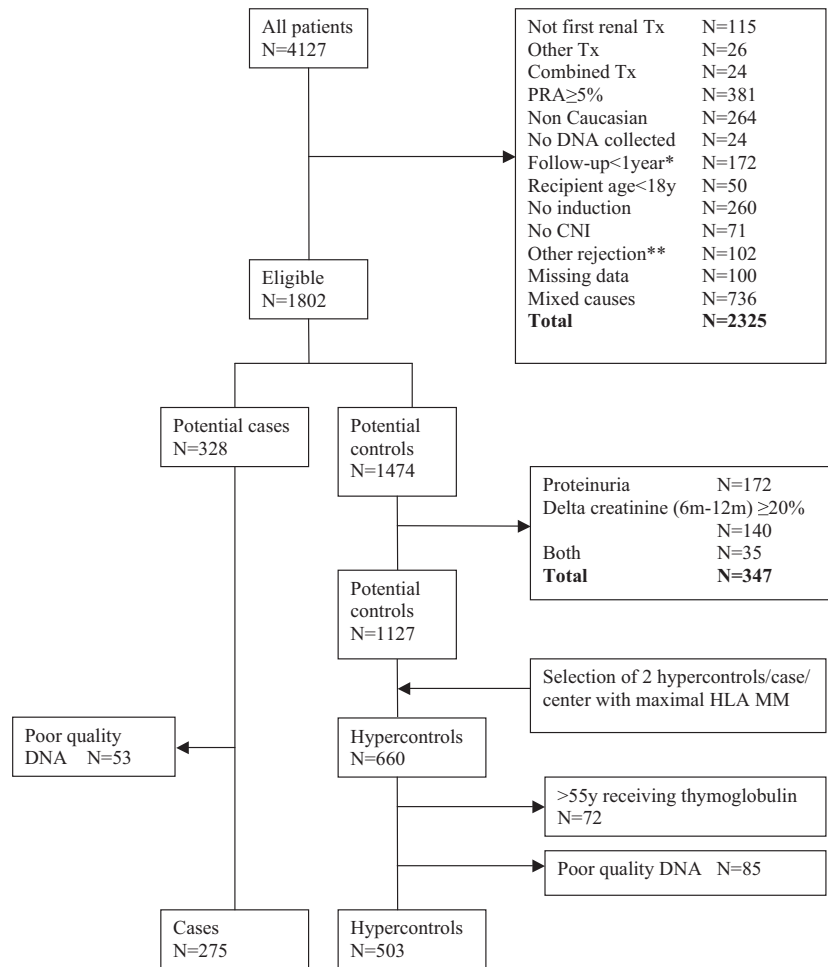
## Materials and Methods

### Patients

**Discovery cohort:** We have collected DNA samples and clinical data from a total of 4127 patients transplanted in eight European renal transplant centers (Belgium: ULB-Hôpital Erasme-Brussels; France: CHU Tours, CHU Limoges, CHU Brest, CHU St-Etienne, CHRU Lille, CHU Poitiers, and CHU Bordeaux) with written informed consent and institutional review board (IRB) approval (protocol number: P2007/106), and centralized them at the ULB-Hôpital Erasme. Among these, we selected white adults ( $\geq 18$  years) having received a first renal transplantation with induction (anti-lymphocyte serum or monoclonal IL-2 receptor antagonist antibody), and calcineurin inhibitor (CNI) therapy at baseline. Exclusion criteria were as follows: the presence of another solid organ transplant, the presence of anti-HLA antibodies (Luminex<sup>®</sup>, Austin, TX) or a maximal panel reactive antibody  $\geq 5\%$ , a follow-up period shorter than 1 year (if the cause was not related to graft loss due to rejection), and lack of DNA or clinical data available. Cases were defined as patients who developed at least one biopsy-proven acute T cell-mediated rejection (TCMR), defined by BANFF criteria, during the first year after transplantation (5). Patients with episodes of pure antibody-mediated rejection, untreated borderline or unexpected rejection (discovered in a protocol biopsy) were not eligible. Controls were defined as patients with neither acute nor chronic rejection—defined on the basis of a stable graft function (rise in serum creatinine between 6 and 12 months  $< 20\%$ ) and absence of significant proteinuria ( $< 0.5$  g/day or negative urinary dipstick at 12 months)—during the same period. Most participating centers did not perform systematic protocol biopsies; hence most controls were not biopsied. Among those, we selected for each case two center-matched hypercontrols (graft recipients who did not present acute rejection in spite of an initially less favorable HLA match) with the highest possible number of HLA mismatches in the order:  $2 \times DR > 1 \times DR$ ,  $2 \times B > 1 \times B$ ,  $2 \times A > 1 \times B$ ,  $1 \times A$  mismatches. Patients older than 55 years receiving antilymphocyte serum at baseline ( $n = 72$ ) were not considered as hypercontrols, as they were felt to be at lower risk of developing acute rejection. A total of 328 cases and 588 hypercontrols were eligible in the database. After exclusion of patients with DNA of poor quality, 275 cases and 503 hypercontrols transplanted between 1986 and 2010 were genotyped (Figure 1).

**Replication cohort:** DNA samples and clinical data were collected with written informed consent and IRB approval (protocol number: P2007/106), from 2765 patients transplanted in two renal transplantation centers (Belgium: KUL Leuven,  $n = 1068$ ; Czech Republic: IKEM Prague,  $n = 1697$ ). Inclusion criteria for cases and controls were the same as for the discovery cohort, except for the requirement of induction therapy. We did not select hypercontrols for replication. This resulted in the selection of 333 cases and 593 controls in the database. A total of 313 cases and 531 controls transplanted between 1984 and 2011, with a genotyping rate  $> 90\%$  were included in the association analyses (Figure 2).





**Figure 1: Discovery cohort: flowchart of patients included.** \*Death, lost to follow-up, graft loss for another reason than rejection. \*\*Not biopsy-proven, protocol biopsy, borderline not treated, or pure humoral rejection. CNI, calcineurin inhibitor; MM, mismatch; PRA, panel reactive antibody; Tx, transplantation.

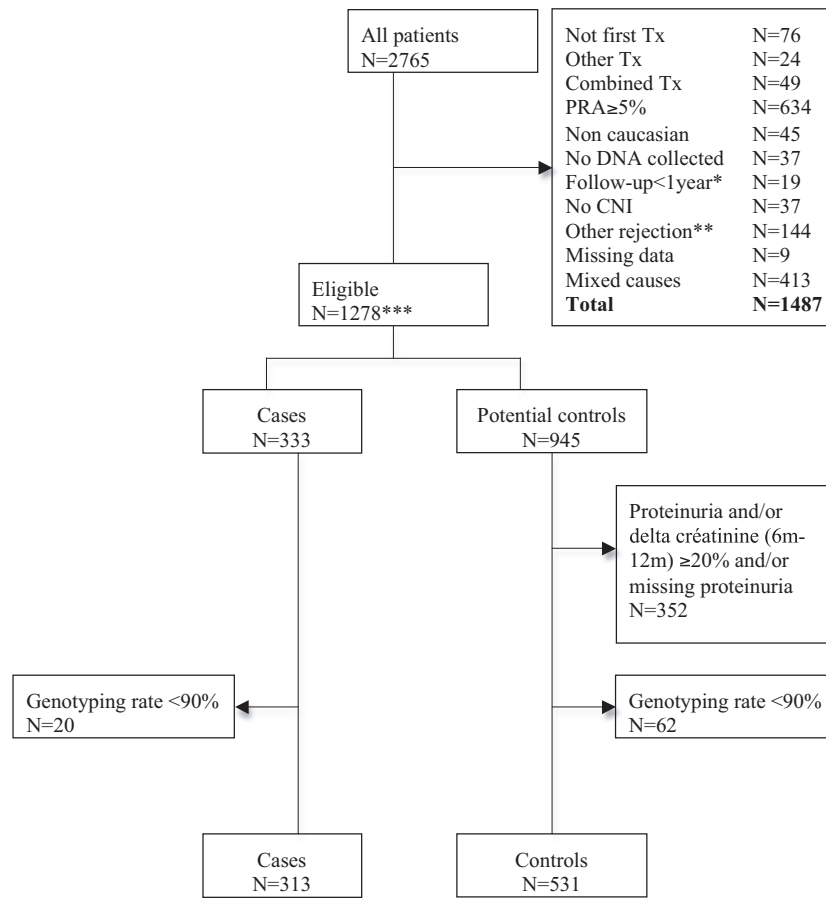
### Genotyping

**Discovery cohort:** Genomic DNA was extracted using standard procedures. DNA quality was assessed for all samples by agarose gel electrophoresis, and samples with degraded DNA were excluded. DNA concentrations were estimated by fluorometry using Picogreen® (Invitrogen, Carlsbad, CA), as the average of three independent measurements with a coefficient of variation <0.10. Equimolar case and hypercontrol pools were generated by mixing 60 ng of DNA from each of the 275 cases and 503 hypercontrols, respectively. Pools were generated in triplicate, yielding three case (CA, CB, CC) and three hypercontrol (HA, HB, HC) pools. DNA (250 ng) from each pool was hybridized on Human Omni 2.5-4 v1 DNA analysis BeadChip arrays® (Illumina, San Diego, CA). A (CA and HA) and B (CB and HB) pools were hybridized in duplicate, yielding five measurements for both cases and hypercontrols. Allelic frequencies in the pools were estimated from the B-allele frequencies computed with Genome Studio® (Illumina). We genotyped the 778 DNA samples individually for nine unlinked SNPs (rs11543947, rs2279804, rs17421009, rs2476601, rs3087243, rs3087456, rs7528684, rs4839469, and rs10804682) using Taqman SNP assays® as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, Foster City, CA) to evaluate the accuracy of the B-allele frequency estimates over a range of allelic frequencies.

**Replication cohort:** Genomic DNA was extracted and quantified using standard procedures. A total of 313 cases and 531 controls were genotyped (genotyping rate > 90%) individually for 18 SNPs selected for highest difference of B allelic frequency between cases and hypercontrols at loci identified as significant in the discovery cohort, using a Sequenom Mass Array iPLEX assay® (San Diego, CA). We genotyped at least three SNPs per locus. In addition, we genotyped SNP rs10846175 because the difference in B allele frequency was very high (0.21) in the discovery cohort, despite the fact that the variance of the allele frequency estimates was >0.001 for cases and hypercontrols. Three SNPs with a call rate <90% were excluded from the analysis, leaving the other 15 SNPs eligible for the analyses.

### Association analyses

**Power calculation:** Considering a rejection prevalence of 15% during the first year, the sample size of this two-stage GWAS (cases,  $n = 588$  and controls,  $n = 1034$ ) has a theoretical power of  $\geq 80\%$  to identify TCMR alleles with relative risks of 2.4, 1.63, 1.59, and 1.62 for minor allele frequencies (MAFs) of 0.05, 0.2, 0.3, and 0.5, respectively, under an additive genetic model (CATS calculator) (6,7).



**Figure 2: Replication cohort: flowchart of patients included.** \*Death, lost to follow-up, graft loss for another reason than rejection. \*\*Not biopsy-proven, protocol biopsy, borderline not treated, or pure humoral rejection. \*\*\*Including 951 patients without induction. CNI, calcineurin inhibitor; PRA, panel reactive antibody; Tx, transplantation.

**Significance of associated SNP clustering:** Categorical data were analyzed using Pearson's  $\chi^2$  or Fisher's exact tests as appropriate. t-test or Mann-Whitney test were used to compare normally or non-normally continuous data. A bilateral p-value smaller than 0.05 was used to reject the null hypothesis except for SNPs variables. First, we performed a univariate analysis, evaluating the association between the selected SNPs and acute rejection in the replication cohort using PLINK v1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/> [8]). We estimated the statistical significance of the association from permutations performed within cohorts (respectively Leuven and Prague) to account for potential stratification. We applied a one-sided test by imposing that the difference in allelic frequency between cases and controls in the replication cohort would have the same sign as in the discovery control. Second, the association of SNPs with acute rejection after adjustment for other risk factors was assessed by multivariate logistic regression modeling. The model was constructed by progressively adding independent variables starting with those that had the strongest univariate association with the outcome of interest. In case of strong linkage disequilibrium (LD) between significant SNPs, only one SNP was included in the logistic regression to avoid co-linearity problems. The Wald test was used to test the null hypothesis of a log odds ratio (OR) (coefficient) equal to zero. The Hosmer and Lemeshow test was used to check the goodness-of-fit of the model. A likelihood ratio test was used to assess whether adding a new variable to the model increased the overall log-likelihood. To test

for a potential interaction between two risk factors, we calculated stratum-specific ORs and tested the null hypothesis of no difference between stratum-specific ORs by a  $\chi^2$  test of homogeneity.

## Results

### **A pool-based GWAS reveals five candidate risk loci for acute renal graft rejection**

From an initial cohort of 4127 patients having undergone a first renal transplantation, we selected 275 cases with acute TCMR within 1 year, and 503 hypercontrols without TCMR, despite being at higher risk of rejection using the specific criteria outlined above (Figure 1). Baseline characteristics of the ensuing case-control cohort are reported in Table 1. As expected from our study design, hypercontrols had a significantly higher number of HLA mismatches than cases, in particular HLA-DR mismatches ( $p < 0.0001$ ). The proportion of patients under steroids at 6 months was higher in cases, as a consequence of acute rejection occurrence ( $p < 0.0001$ ). Donors were significantly older in cases ( $p = 0.035$ ). The other characteristics were well balanced between the two groups.

**Table 1:** Discovery cohort: baseline characteristics of patients (n = 778)

Characteristics	Cases (N = 275)	Hypercontrols (N = 503)	p
Recipient age: mean $\pm$ SD (years)	48.3 $\pm$ 14.1	48.6 $\pm$ 13.4	0.77
Recipient sex (male): n (%)	179 (65.1)	331 (65.8)	0.84
Type of donor (deceased): n (%)	263 (95.6)	481 (95.8)	0.91
Donor age: mean $\pm$ SD (years)	47.2 $\pm$ 15.9	44.7 $\pm$ 15.9	0.035
Donor sex (male): n (%)	148 (54)	294 (60)	0.11
Cold ischemia time: mean $\pm$ SD (h)	19.4 $\pm$ 7.7	18.3 $\pm$ 7.9	0.07
Dialysis duration: median (P25–P75) (m)	18 (8.9–36)	18 (9.5–30.8)	0.97
Primary nephropathy: n			
Glomerulopathy	80	143	0.45
Nephroangiosclerosis/hypertension	25	24	
Polycystic kidney disease	52	107	
Diabetic	13	22	
Chronic interstitial nephropathy	30	54	
Uncertain	33	73	
Other	18	35	
Congenital/hereditary	22	44	
Steroids at 6 months (yes): n (%)	249 (93.3)	328 (65.7)	<0.0001
Tacrolimus/cyclosporin: n	92/183	204/299	0.05
Induction (thymoglobulin/IL2R antagonist): n	75/200	154/349	0.33
HLA-A MM (0/1/2): n	38/149/86	47/270/186	0.09
HLA-B MM (0/1/2): n	25/129/119	21/215/267	0.003
HLA-DR MM (0/1/2): n	30/154/88	10/272/221	0.0003
HLA B+DR MM: mean $\pm$ SD	2.56 $\pm$ 0.93	2.91 $\pm$ 0.71	<0.0001
HLA A+B+DR MM: mean $\pm$ SD	3.73 $\pm$ 1.24	4.20 $\pm$ 0.95	<0.0001

MM, mismatch; SD, standard deviation.

After very stringent evaluation of DNA quantity and quality, we generated equimolar DNA pools of the 275 cases and 503 hypercontrols in triplicates. The DNA pools were hybridized to arrays interrogating 2.5 million SNPs covering the entire genome, and allele frequencies were computed using Genome Studio<sup>®</sup> (Illumina). We genotyped the 778 DNA samples individually for nine unlinked SNPs showing a large range of allelic frequency using Taqman SNP assay, to evaluate the accuracy of the B-allele frequency estimates by Genome Studio software. The global coefficient of correlation ( $r^2$ ) exceeded 0.98, demonstrating the accuracy of our pooling method (Table S1).

We first excluded 42 526 SNPs for which the variance of the allele frequency estimates exceeded 0.001 (i.e. cases or hypercontrols). We then selected 1109 SNPs for which the average allele frequency between cases and hypercontrols differed by  $\geq 0.10$ . We reasoned that true positive association would tend to involve multiple contiguous SNPs as a result of LD, and used a 50-kb sliding window to scan the genome for clusters of positive SNPs. We identified five loci encompassing at least six such SNPs in a 50-kb window. Iterative *in silico* permutations of our experimental data showed that more than 5 contiguous SNPs were never observed by chance alone in a 50-kb window (after 100 *in silico* permutations, Table S2). The corresponding loci were assumed to be highly enriched in true risk loci for acute renal graft rejection.

### **Two risk loci are replicated by individual SNP genotyping in an independent cohort**

From two independent cohorts totaling 2765 patients transplanted in Leuven or Prague, we selected 333 cases with biopsy-proven acute TCMR and 593 matched controls. A total of 313 cases (Belgian cohort, n = 116; Czech cohort, n = 197) and 531 controls (Belgian cohort, n = 212; Czech cohort, n = 319) with a genotyping rate >90% were eligible for association analyses (Figure 2).

Baseline characteristics of patients are reported in Table 2. As observed in the discovery cohort, donors were older in patients with acute rejection (p = 0.0006). Cases had significantly higher numbers of HLA mismatches, in particular HLA-DR mismatches (p < 0.0001). The proportion of patients under tacrolimus was higher in cases (p = 0.03). Other characteristics were well balanced between groups.

We individually genotyped all samples from the replication cohort using a Sequenom Mass ARRAY iPLEX assay interrogating 18 SNPs including at least 3 SNPs for each of the 5 selected loci. SNPs with a call rate <90% (n = 3) and individuals with a genotyping rate <90% were excluded (n = 63). From 15 SNPs with a genotype rate  $\geq 90\%$ , 14 did not deviate significantly from Hardy–Weinberg equilibrium (p  $\geq 0.05$ ), and were retained for further analysis. We first performed an association analysis under an additive model using Plink. We estimated the statistical significance of the observed association by

**Table 2:** Replication cohort: baseline characteristics of patients (n = 844)

Characteristics	Cases (N = 313)	Controls (N = 531)	p
Recipient age: mean ± SD (years)	51.3 ± 13.2	52 ± 12.9	0.44
Recipient sex (male): n (%)	205 (65.5)	350 (65.9)	0.90
Type of donor (deceased): n (%)	268 (85.6)	457 (86.1)	0.86
Donor age: mean ± SD (years)	50 ± 14.3	46.4 ± 14.8	0.0006
Donor sex (male): n (%)	166 (53.2)	299 (56.5)	0.35
Cold ischemia time: mean ± SD (h)	14.3 ± 6.8	14.4 ± 6.8	0.90
Dialysis duration: median (P25–P75) (m)	24 (12–41.8)	23 (11.5–38)	0.24
Primary nephropathy: n			
Glomerulopathy	95	177	0.34
Nephroangiosclerosis/hypertension	25	29	
Polycystic kidney disease	49	107	
Diabetic	28	34	
Chronic interstitial nephropathy	30	50	
Congenital/hereditary	48	84	
Uncertain	22	27	
Other	16	23	
Steroids at 6 m (yes): n (%)	276 (92.3)	488 (92.1)	0.91
Tacrolimus/cyclosporin: n	251/62	390/141	0.03
Induction therapy: n (%)	95 (30.4)	130 (24.5)	0.06
HLA-A MM (0/1/2): n	37/175/98	94/285/146	0.06
HLA-B MM (0/1/2): n	38/162/110	67/286/172	0.72
HLA-DR MM (0/1/2): n	83/166/61	203/273/48	<0.0001
HLA B+DR MM: mean ± SD	2.2 ± 1.0	1.9 ± 0.9	0.0002
HLA A+B+DR MM: mean ± SD	3.4 ± 1.3	3.00 ± 1.3	0.0001

MM, mismatch; SD, standard deviation.

permutations. Permutations were performed within cohorts to account for possible stratification that might differentiate the Belgian and Czech cohorts. Two SNPs replicating with a nominal p-value <0.05 were excluded because the difference in allelic frequency (between cases and controls) in the replication cohort did not have the same sign as in the discovery cohort (chr5:

rs2416500 and chr5: rs6859254). Three SNPs in two from the five loci replicated with nominal p-value ≤0.05: rs10765602 (p = 0.007) on chr11:93048165, rs10846175 (p = 0.007) and rs7976329 (p = 0.004) on chr12:15584624, and chr12:15602639, respectively. They remained significantly associated with TCMR after Sidak correction (Table 3). Genotype distribution of rs10765602

**Table 3:** Replicated SNPs: corresponding MAF in the discovery cohort and univariate analysis in the replication cohort

Chr	SNP	SNP Position	Minor allele	Discovery cohort			Replication cohort						
				MAF in cases	MAF in CTRLS	Delta MAF	MAF in cases	MAF in CTRLS	Delta MAF	OR	95% CI	p*	p**
5	rs182190	70840233	A	0.41	0.56	-0.15	0.43	0.44	-0.02	0.94	0.77–1.14	0.333	0.868
5	rs277978	70926559	G	0.45	0.54	-0.09	0.42	0.44	-0.02	0.92	0.76–1.13	0.153	0.564
5	rs2416500	117376303	G	0.36	0.2	0.16	0.19	0.25	-0.05	0.73	0.57–0.93	0.007	0.033
5	rs10079827	117424611	C	0.41	0.27	0.14	0.23	0.26	-0.02	0.88	0.69–1.11	0.163	0.589
5	rs6859254	117438003	G	0.34	0.22	0.12	0.19	0.24	-0.04	0.77	0.60–0.98	0.017	0.081
11	rs10765602	93048165	G	0.36	0.26	0.1	0.35	0.29	0.06	1.32	1.07–1.63	0.007	0.036
11	rs200848508	93082760	G	0.49	0.6	-0.11	0.47	0.49	-0.03	0.90	0.74–1.10	0.144	0.541
11	rs3020071	93105965	G	0.42	0.52	-0.1	0.45	0.47	-0.02	0.91	0.75–1.12	0.262	0.781
12	rs1461039	15577935	C	0.44	0.55	-0.11	0.43	0.47	-0.04	0.90	0.74–1.10	0.073	0.316
12	rs10846175	15584624	G	0.51	0.3	0.21	0.36	0.30	0.06	0.85	0.69–1.03	0.007	0.037
12	rs7976329	15602639	C	0.49	0.31	0.18	0.37	0.30	0.06	1.30	1.06–1.61	0.004	0.020
14	rs1952836	28576698	A	0.28	0.16	0.12	0.27	0.28	0.00	1.33	1.08–1.63	0.500	0.969
14	rs1191395	28693834	G	0.63	0.47	0.16	0.46	0.47	-0.02	0.99	0.80–1.25	0.184	0.639
14	rs942630	28702660	A	0.56	0.43	0.13	0.46	0.47	-0.02	0.93	0.77–1.15	0.333	0.868

Chr, chromosome; CI, confidence interval; CTRLS, controls; MAF, minor allelic frequency; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism.

\*p-value after permutation (to control for potential stratification for the two subcohorts Leuven and Prague).

\*\*p-value after Sidak correction (for five loci).

and rs7976329 in cases and controls is reported in Table S3.

We then performed a genotype-based association test of the two corresponding regions jointly using a multivariate logistic regression analysis including donor age, type of CNI, administration of induction therapy or not, and number of HLA-DR mismatches as covariates. We only included one SNP per locus in these analyses because of the high LD between the SNP pair mapping to the same locus. Both rs10765602 ( $p = 0.02$ ) and rs7976329 ( $p = 0.01$ ) remained significant independent risk factors of TCMR. Genotype-specific OR suggested a recessive effect of the risk allele for the chr11 locus, and a dominant effect of the risk allele for the chr12 locus (Table 4).

SNP rs10765602 is located upstream *CCDC67* (coiled-coil domain containing 67) *alias* *DEUP1*, a gene involved in centriole biogenesis in multiciliated cells (9).

Variants rs10846175 and rs7976329 are in strong LD ( $r^2 = 0.93$ ) and lie in the first intron of the *PTPRO* gene-encoding protein tyrosine phosphatase receptor type O. *PTPRO* *alias* Glomerular Epithelial Protein-1 (*GLEPP1*) has two major isoforms. The PTPRO-FL (full-length form) is a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed at the apical membrane of the podocyte foot processes. Rare, highly penetrant mutations cause a Mendelian glomerulopathy characterized by a steroid-resistant childhood-onset nephrotic syndrome (10). PTPRO-T (truncated isoform) is encoded by an alternatively spliced form of *PTPRO* initially found to be expressed in naïve quiescent B cells and memory B cells (11). PTPRO regulates both

the amplitude and timing of tyrosine phosphorylation-based B cell receptor (BCR) signaling events and modulates protein tyrosine kinase-mediated cellular response. Both Lyn kinase and ZAP-70 tyrosine kinases are substrates of PTPRO-T (12,13).

## Discussion

We here report what is to our knowledge the first GWAS of acute rejection in vast numbers of kidney transplant recipients.

In a discovery cohort comparing TCMR and non-TCMR graft recipients, we identified five candidate loci tagged by a number (more than five) of contiguous SNPs that was never observed by iterative *in silico* permutations of our experimental data, indicating strong enrichment for true positive signals. In an independent replication cohort, we confirmed the association with two loci. These loci remained independent risk factors in a multivariate analysis integrating significant clinical risk factors. The OR associated with these SNPs was modest, except for rs10765602 where the GG genotype increased the risk of acute rejection by nearly twofold.

The number of renal graft recipient patients is limited and recruiting large cohorts is notoriously difficult. We were hence impelled to include in our replication cohort patients who did not receive induction therapy. This choice may have caused loss of association power in our replication study.

Variants rs10846175 and rs7976329 lie in the first intron of the *PTPRO* gene. *PTPRO* would have been an excellent *a priori* candidate gene for acute renal graft rejection as this gene might modulate alloreactivity through regulation of TCR and BCR signaling and regulation of cytokine production. PTPRO plays several roles at the immune synapse. PTPRO substrate ZAP-70 is directly involved in TCR signaling and promotes TCR degradation by inducing receptor ubiquitination and targeting to lysosomes (13,14). *PTPRO* or *ZAP-70* defects cause immune deficiency. *ZAP-70*-deficient patients have no functional T cells in their peripheral blood and suffer a severe combined immunodeficiency (15). Induced fulminant hepatitis in *PTPRO*-knockout (KO) mice showed that PTPRO deficiency led to inflammation attenuation and to a significant decrease in cytokine secretion by both T and natural killer cells leading to a marked impairment of NF- $\kappa$ B activation (16). The association between *PTPRO* SNPs and acute rejection was not tighter in the subgroup of patients with a glomerulopathy, excluding the potential association with acute rejection due to stratification only.

Unexpectedly, we found an association of acute TCMR with ciliary gene *CCDC67* *alias* *DEUP1* (9). Although the GWAS methodology does not demonstrate that the

**Table 4:** Multivariate logistic regression analysis (n = 829/ cases = 309)

Variable	OR	95% CI	p
Donor age (increase per year)	1.02	1.01–1.03	0.002
Calcineurin inhibitor			
Tacrolimus	1		
Cyclosporin	0.70	0.5–1.00	0.05
Induction			
No induction	1		
Induction	1.37	0.99–1.91	0.06
HLA-DR MM (n)			
0	1		
1	1.38	0.99–1.92	
2	2.88	1.80–4.60	0.0001
rs10765602 (genotype)			
TT	1		
GT	1.07	0.79–1.47	
GG	1.98	1.21–3.25	0.02
rs7976329 (genotype)			
TT	1		
CT	1.59	1.16–2.17	
CC	1.61	0.96–2.70	0.01

CI, confidence interval; MM, mismatch; OR, odds ratio.

genes at, or near, the associated SNPs are the cause of the association, it allows for a reasonable hypothesis. Lines of evidence indicate tight similarities between the primary cilium and the immune synapse. Indeed, there are important architectural similarities, shared signaling platforms, and common pathways for the two structures, supporting the idea that the immune synapse is derived from the primary cilium (14,17). The *CCDC67* locus association is unlikely to result from stratification of our cohorts for patients whose primary nephropathy was a known or even an unrecognized ciliopathy as there were no imbalances between groups regarding the proportion of glomerulopathies, tubulopathies, or naturally, recognized primary cilium-related nephropathies (polycystic kidney disease, nephronophthisis, and Bardet-Biedl syndrome) (18).

We have to acknowledge several limitations of our study. The DNA pooling approach is not as accurate as individual genotyping. However, genotyping using pooled DNA samples allows measurement of allele frequencies at affordable costs and we applied a stringent methodology that minimizes errors (19–21). First, we pooled high-quality DNAs with strict quantification in order to ensure that each individual DNA was represented in the same equimolar amount. Second, we obtained a good correlation between B allele frequency estimates by arrays and true B allele frequency calculated by Taqman individual genotyping ( $r^2 > 0.98$ ), similar to previous reports. Third, we minimized pipetting variability by constructing triplicates and batch (array) variability by constructing duplicates. Fourth, in order to reduce the chance of false positive results, we ranked SNPs based on B allele frequency differences and we excluded SNPs with a variance above 0.001. Finally, we considered for replication only loci with 6 or 7 contiguous SNPs, a significant number that was never observed by chance alone after 100 *in silico* permutations of our experimental data, minimizing the risks of false positive results.

We studied TCMR instead of a more fixed phenotype such as long-term graft failure. Indeed, TCMR, which is associated with poorer long-term graft outcome, is closely related to immune causes, whereas graft failure is related to immune as well as nonimmune processes. Likewise, we did not include pure antibody-mediated acute rejection, which is associated with heterogeneous immunological risk factors and involves different pathways, likely to be associated with different genetic risk factors (22). The timing (TCMR within the first year) is well justified by the fact that most TCMRs occur during the first 3 months, while late acute rejection episodes (after 1 year) are often the consequences of nonadherence.

Some heterogeneity in immunosuppression must be acknowledged, due to the differences in immunosuppression protocols in the centers. First, regarding tacrolimus, the proportion of patients is higher in the replication cohort. This difference might be related to a

lower use of induction therapy (100% in the discovery cohort vs. 27% in the replication cohort). The use of tacrolimus (instead of cyclosporine) is likely due to an effort to balance the absence of induction, in order to minimize the risk of acute rejection. Second, regarding steroids, part of the difference is also likely to be due to centers' practices, with more centers in the discovery cohorts discontinuing steroids at 6 months if no rejection had occurred since transplantation. Along the same line, we must also acknowledge the slight differences with regard to cold ischemia time and dialysis duration. The higher number of HLA MM in controls (discovery cohort) is intentional and related to the selection of hypercontrols. Hypercontrols are control individuals from the lower extremity of the relevant trait distribution and a study design using hypercontrols is a powerful approach in GWAS focusing on one disease (23). Among controls, we have selected recipients with highest number of HLA MM, at theoretically higher risk of acute rejection, in order to maximize the chance to find at-risk variants. Conversely, in the replication cohort, there was a higher number of HLA MM in cases, because we did not select for hypercontrols.

These differences are unlikely to bias our results. The fact that rs10765602 and rs7976329 were significant in both cohorts and remained independent risk factors in the multivariate analysis (Table 4) strongly supports a causal risk independently of other factors.

Studies in renal transplantation are notoriously limited in the number of available patients with sufficient homogeneity, as opposed to frequent complex traits such as diabetes or hypertension. The present GWAS was therefore not powered to detect frequent alleles conferring a low risk of acute rejection, or low frequency or rare alleles (MAF < 0.005). In addition, true associations might have been missed by the exclusion of SNPs, using the stringent quality filters set in our discovery cohort.

In conclusion, the present GWAS addressed the important scientific issue of the genomic basis for immune rejection of the allograft and provides strong evidence for *PTPRO*, a lymphocyte receptor-type tyrosine kinase gene and *CCDC67*, a ciliary gene, being involved in the acute rejection of renal transplants. These novel genes may help in understanding the molecular pathways involved in acute rejection, which may in turn lead to the development of novel antirejection approaches. Furthermore, novel genetic biomarkers that reflect individual susceptibilities to graft rejection could provide the rationale for customized immunosuppression by allowing the pre-graft identification of low- and high-risk patients.

## Acknowledgments

Ondřej Viklický received Grants from Czech Ministry of Health and Frame Programs of the European Union: 15-26865A, NT14102-3/2013,

NT11227-5/2010, and Bio-DrIM (EU FP7 program). Lidia Ghisdal received the Astellas European Foundation Transplantation Grant in 2009 and research Grants from Erasme Fund (Université Libre de Bruxelles) for years 2009–2010 and 2010–2011, for this work. Marc Abramowicz was supported by the Transdisciplinary grant of the Erasme Fund and by the Fund for Scientific Medical Research, Belgium (Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, FRSM) of the National Fund for Scientific Research FRS-FNRS, grant T.0174.15, and by the Fund for Scientific Medical Research, Belgium (Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, FRSM). Elisa Docampo is supported by a Marie Curie Intraeuropean Fellowship (IEF). We thank Brigitte Borre and Nicole Lietard for data collection. We thank Michaela Prokopova for her invaluable secretarial assistance.

## Disclosure

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

## References

1. Wissing KM, Fomegne G, Broeders N, et al. HLA mismatches remain risk factors for acute kidney allograft rejection in patients receiving quadruple immunosuppression with anti-interleukin-2 receptor antibodies. *Transplantation* 2008; 85: 411–416.
2. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357: 2562–2575.
3. Goldfarb-Rumyantzev AS, Naiman N. Genetic predictors of acute renal transplant rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 1039–1047.
4. Goldfarb-Rumyantzev AS, Shihab F, Emerson L, et al. A population-based assessment of the familial component of acute kidney allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2575–2583.
5. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: Updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753–760.
6. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; 38: 209–213.
7. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273: 1516–1517.
8. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559–575.
9. Zhao H, Zhu L, Zhu Y, et al. The Cep63 paralogue *Deup1* enables massive *de novo* centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 1434–1444.
10. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, et al. Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 139–147.
11. Aguiar RC, Yakushijin Y, Kharbanda S, Tiwari S, Freeman GJ, Shipp MA. PTPRO: An alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest. *Blood* 1999; 94: 2403–2413.
12. Chen L, Juszczyński P, Takeyama K, Aguiar RC, Shipp MA. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O truncated (PTPROt) regulates SYK phosphorylation, proximal B-cell-receptor signaling, and cellular proliferation. *Blood* 2006; 108: 3428–3433.
13. Motiwala T, Datta J, Kutay H, Roy S, Jacob ST. Lyn kinase and ZAP70 are substrates of PTPROt in B-cells: Lyn inactivation by PTPROt sensitizes leukemia cells to VEGF-R inhibitor pazopanib. *J Cell Biochem* 2010; 110: 846–856.
14. Finetti F, Paccani SR, Rosenbaum J, Baldari CT. Intraflagellar transport: A new player at the immune synapse. *Trends Immunol* 2011; 32: 139–145.
15. Chan AC, Kadlec TA, Elder ME, et al. ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994; 264: 1599–1601.
16. Jiang R, Chen D, Hou J, et al. Survival and inflammation promotion effect of PTPRO in fulminant hepatitis is associated with NF-kappaB activation. *J Immunol* 2014; 193: 5161–5170.
17. de la Roche M, Ritter AT, Angus KL, et al. Hedgehog signaling controls T cell killing at the immunological synapse. *Science* 2013; 342: 1247–1250.
18. Tran PV. Dysfunction of intraflagellar transport proteins beyond the primary cilium. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 2385–2386.
19. Macgregor S, Zhao ZZ, Henders A, Nicholas MG, Montgomery GW, Visscher PM. Highly cost-efficient genome-wide association studies using DNA pools and dense SNP arrays. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: e35.
20. Pearson JV, Huentelman MJ, Halperin RF, et al. Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide-polymorphism association studies. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 126–139.
21. Bosse Y, Bacot F, Montpetit A, et al. Identification of susceptibility genes for complex diseases using pooling-based genome-wide association scans. *Hum Genet* 2009; 125: 305–318.
22. Noel C, Abramowicz D, Durand D, et al. Daclizumab versus antithymocyte globulin in high-immunological-risk renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1385–1392.
23. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14 000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. *Nature* 2007; 447: 661–678.

## Supporting Information

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

**Table S1:** MAF correlation between individual genotyping and pools (array).

**Table S2:** Clusters of SNPs: real array data and *in silico* permutation (100X) data in three sliding windows.

**Table S3:** Genotype distribution of rs10765602 and rs7976329.





## **ANNEXE IV - lettre à l'éditeur dans *l'American Journal of Transplantation***

Article: Reply to Hernandez et al. - GWAS of acute renal graft rejection.

Type: article original

Auteur.e.s: **Massart A**, Ghisdal L, Viklicky O, Naesens M, Abramowicz M, Abramowicz D.

Référence: Am J Transplant. 2018 Aug;18(8):2098-2099.



## LETTER TO THE EDITOR

## Reply to Hernandez et al. - GWAS of acute renal graft rejection

To the Editor:

Hernandez et al recently reported on several large genome-wide association studies (GWAS) in kidney transplantation.<sup>1</sup> In particular, they investigated the effect of either donor single nucleotide polymorphisms (SNPs), recipient SNPs, or combined donor-recipient SNPs on graft survival and acute rejection. Despite impressive patient numbers, no SNP signal emerged. The authors concluded that "both phenotype heterogeneity and sample size may have contributed." We sought to understand the lack of genetic association with graft rejection, considering our recent findings.<sup>2</sup>

In a recipient-GWAS published in 2016, we were able to identify and validate the association of 2 genetic loci (CCDC67 and PTPRO) with biopsy-proven T cell-mediated rejection (TCMR)<sup>2</sup> in 2 independent European cohorts. However, Hernandez and colleagues did not retrieve our SNPs, nor did they discover other SNPs in larger cohorts of the same origin. We looked at study design elements that may have been decisive in obtaining our positive results (see Table 1).

First, we concentrated our efforts on building a discovery cohort of cases with very low immunological risk. Kidney graft-rejecting cases were all European adults (>18 years of age), not or minimally sensitized, transplanted with a first kidney allograft under

**TABLE 1** Comparison of the eligibility criteria of the 2 largest recipient-GWAS studies relative to acute rejection published to date

Ghisdal et al	Hernandez et al
Discovery: n = 275 cases vs 503 hypercontrols (from 4127 single recipients from France and Belgium); Replication: n = 313 cases vs 531 controls (from 2765 single recipients from Belgium and Czech Republic)	Discovery: n = 441 cases vs 941 controls (from 2689 single recipients from United Kingdom and Ireland); Replication: n = 575 cases vs 2573 controls (from 5866 single recipients from Germany)
European adults > 18 y	European patients >16 y
First renal transplantation	Any rank renal transplantation
Isolated kidney transplantation only	Double and combined transplantations allowed
All donors	Deceased donors only
Follow-up >1 y (or earlier loss from rejection)	Graft survival time >3 mo
Treatment	
1. Induction (antilymphocyte serum or anti-IL2 receptor antagonist) <sup>c</sup>	No specific requirement
2. CNI therapy at baseline	
Immunization	
Absence of anti-HLA antibodies by Luminex or PRA of maximum 5%	No specific requirement
Cases	
≥1 first-year biopsy proven T cell-mediated rejection (Banff criteria) <sup>a</sup>	≥1 first-year rejection (clinician reported treated rejection)
Controls	
Recorded as not having acute or a chronic rejection (first year)	Recorded as not having an acute rejection (first year)
1. Stable function <sup>b</sup>	No further specific requirement
2. Center-matching (2 center controls/case)	
3. Exclusion of patients older than 55 y receiving antilymphocyte serum	
4. Hypercontrols who did not reject despite a less favorable HLA match <sup>b c</sup>	

CNI, calcineurin inhibitor; PRA, panel reactive antibody.

<sup>a</sup>Exclusion of untreated borderline rejections, unexpected histological findings, pure antibody-mediated rejections.

<sup>b</sup>Defined with formal criteria, as detailed in the original publication.

<sup>c</sup>Not required for the replication cohort.

a calcineurin inhibitors-based immunosuppressive regimen including induction. In parallel, we carefully selected nonrejecting controls based on a high risk of rejection (*hypercontrols*): poorly HLA-matched recipients were preferentially included, whereas low-risk older patients treated with anti-lymphocyte serum were excluded. Doing this, we assumed that the genetic contrast between groups was enhanced.

Second, we ensured that phenotypes were correct and precise. Rejection was of TCMR type and histologically proven. We agree with Hernandez et al that the phenotypic heterogeneity they allowed in their study (cellular and humoral rejections were not distinguished, biopsy was not required, and combined transplantations were accepted) may have diluted a true genetic association with TCMR in kidney recipients.

In the absence of significant results in their discovery cohort, Hernandez et al specifically tested 139 SNPs selected from their top candidates or from the literature. Strangely, although they did investigate various non-genome-wide and/or non-replicated associations, they omitted to investigate the sole associations ever validated in the context of recipient-GWAS pertaining to acute rejection (our study).<sup>2</sup> Although a negative result might have been related to disparate study designs, a further confirmation of our findings would have been of the highest interest for the transplant community and patients.

Finally, the absence of donor-recipient SNP genotype interaction influencing acute rejection in this study echoes with a recent observation by Mesnard et al.<sup>3</sup> By the calculation of a genetic score based on the sum of non-HLA donor-recipient mismatches among transmembrane proteins, these authors noticed that many genetic variants composing the score were actually rare alleles, which are not captured in SNP-array-based GWAS. Together, the works of Hernandez and Mesnard call for sequencing-based studies that can detect both common and rare variants for deciphering non-HLA donor-recipient interactions.

These negative results should not discourage further investigations in transplant genetics; novel findings may come from deep phenotyping of patients coupled with whole-genome sequencing.

## DISCLOSURE


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

## ORCID

Annick Massart  <http://orcid.org/0000-0002-6196-8555>

## Keywords

genetics, genomics, kidney disease: immune/inflammatory, kidney transplantation/nephrology, rejection: acute, rejection: T cell mediated (TCMR), translational research/science

Annick Massart<sup>1,2,3</sup> 

Lidia Ghisdal<sup>1,4</sup>

Ondrej Viklicky<sup>5</sup>

Maarten Naesens<sup>6</sup>

Daniel Abramowicz<sup>7</sup>

Marc Abramowicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology, CUB Hôpital Erasme, Brussels, Belgium

<sup>2</sup>Laboratory of Human Genetics, Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire (IRIBHM), Brussels, Belgium

<sup>3</sup>Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics (LEMP), Faculty of Medicine & Health Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

<sup>4</sup>Centre Hospitalier EpiCURA, Baudour, Belgium

<sup>5</sup>Department of Nephrology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

<sup>6</sup>Universitaire Ziekenhuizen Leuven, Leuven, Belgium

<sup>7</sup>Antwerp University Hospital, Antwerp, Belgium

## Correspondence

Annick Massart

Email: [anmassar@ulb.ac.be](mailto:anmassar@ulb.ac.be)

## REFERENCES

1. Hernandez-Fuentes MP. Long- and short-term outcomes in renal allografts with deceased donors: a large recipient and donor genome-wide association study. *Am J Transplant*. 2018. <https://doi.org/10.1111/ajt.14594>
2. Ghisdal L, Baron C, Lebranchu Y, et al. Genome-wide association study of acute renal graft rejection. *Am J Transplant*. 2017;17(1):201-209.
3. Mesnard L, Muthukumar T, Burbach M, et al. Exome sequencing and prediction of long-term kidney allograft function. *PLoS Comput Biol*. 2016;12(9):e1005088.

## 3.2 Etude cas-témoin des déterminants génétiques de la tolérance opérationnelle en transplantation rénale par séquençage d'exomes

### 3.2.1 *A propos de cette section*

Nous présentons ici les résultats de l'analyse cas-témoin ayant comparé les séquences exoniques de 40 patients tolérants à celles de plus de 200 contrôles à l'aide du *Sequence Kernel Association Test* ou *SKAT* (présenté dans la section 2.4.2 page 67), soit, successivement: la filtration des variants issus du séquençage selon notre hypothèse de travail (3.2.2); l'analyse en composantes principales de plus de 80.000 variants retrouvés chez au moins un cas ou un contrôle (3.2.3); Le test d'association par l'analyse *SKAT optimisée* d'abord appliqué aux gènes et ensuite à chaque variant (3.2.4); ensuite les limites de ces analyses (3.2.5). Pour terminer, nous suggérons quelques améliorations possibles (3.2.6).

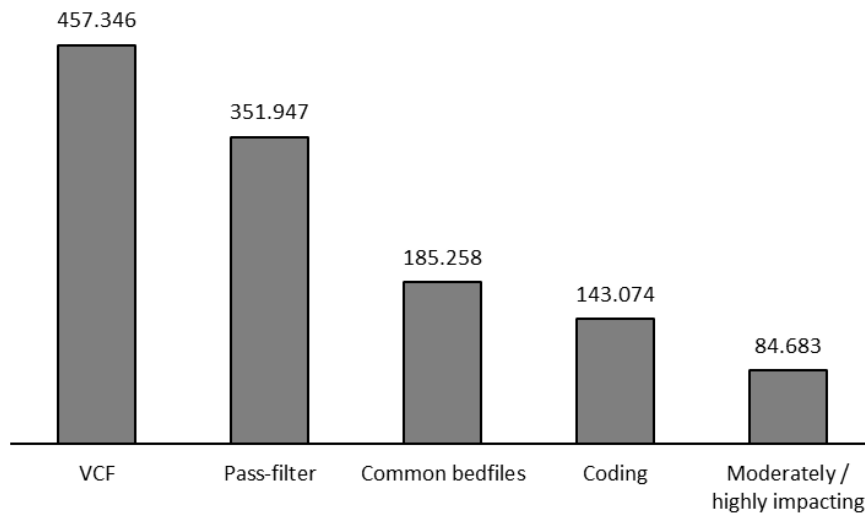
### 3.2.2 *Filtration des variants*

La filtration des variants s'est déroulée selon les principes exposés plus haut (voir méthodologie, section 2.3.4 page 66) et a abouti à circonscrire un set de données comprenant 84.643 variants, eux-mêmes répartis dans 16.343 gènes, pour analyse ultérieure (illustration en **Figure 7**).

### 3.2.3 *Analyse en composantes principales de l'ensemble des variants*

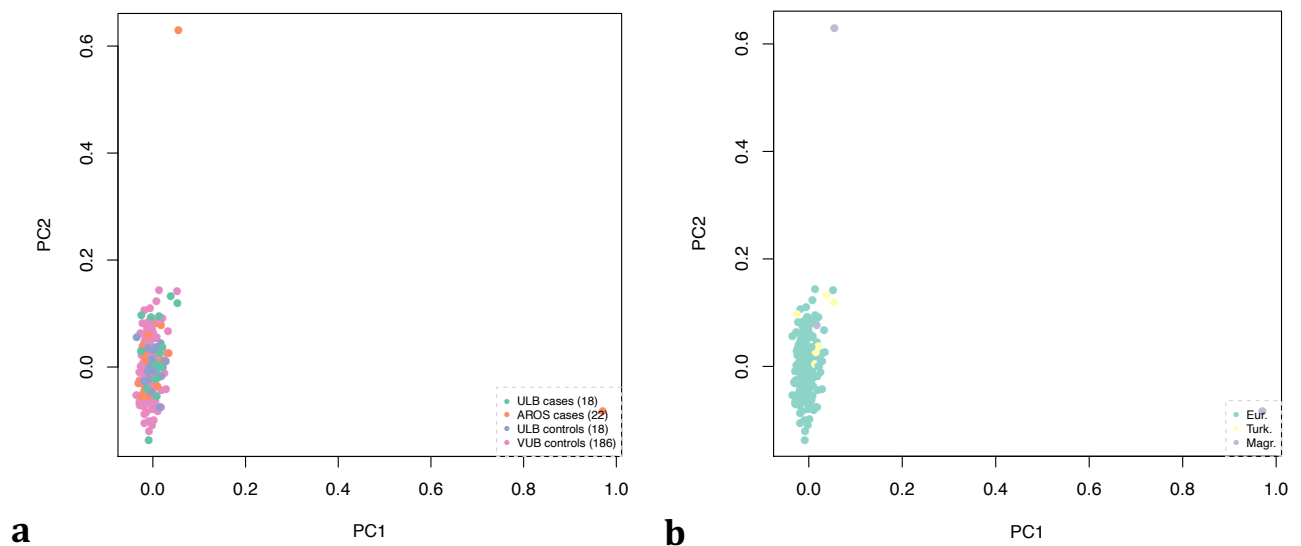
Afin d'exclure les patients dont les variants seraient trop souvent étrangers à ceux du reste de la cohorte (en raison d'une ethnicité trop éloignée) et qui dès lors pourraient entraîner des biais par stratification, nous avons procédé à une analyse en composantes principales. Cinq contrôles furent ainsi exclus. La **Figure 8** montre l'analyse en composantes principales des variants des 204 contrôles restants et des 40 contrôles. Deux patients tolérants s'écartent encore du groupe, sans doute en raison de leur ethnicité plus éloignée. Ils n'ont cependant pas été écartés en raison de la rareté des patients tolérants.

**Figure 7** - Filtration informatique des variants.



**Légende:** le nombre de variants est représenté à chaque étape. *VCF*: tous les variants disponibles dans les 2 groupes à l'issue de l'appel des variants; *Pass-filter*: à l'issue de l'application du filtre-Pass; *Common bedfiles*: à l'issue de la restriction aux régions exoniques couvertes par les deux kits de capture; *Coding*: à l'issue de la restriction aux variants codants; *Moderately / highly impacting*: à l'issue de la restriction aux variants ayant un impact modéré à élevé sur la fonction de la protéine.

**Figure 8** - Analyse en composantes principales de l'ensemble des variants (n=84.643)

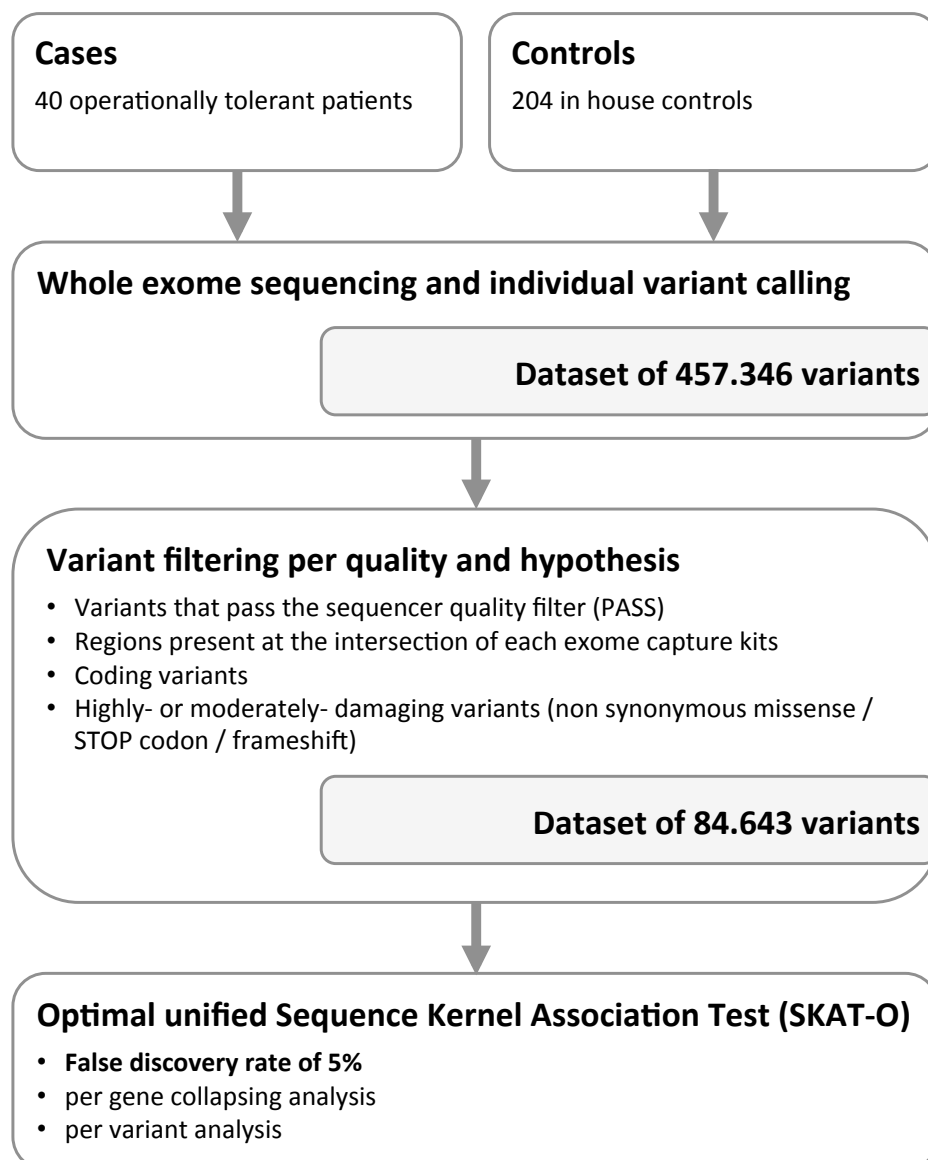


**Légende:** chaque point représente un patient et ceux-ci sont distribués en fonction des deux premières composantes principales. (a) Plateforme de séquençage A: les patients tolérants sont en orange; plateforme de séquençage B: les patients tolérants sont en vert et les contrôles en bleu ou en rose selon leur centre d'origine. (b) Les cas et les contrôles sont mis en couleur en fonction de leur ethnicité déclarée: européenne (verte), turque (jaune) ou maghrébine (mauve).

### 3.2.4 Analyses par SKAT à l'échelle des gènes et des variants

Pour chaque gène d'abord puis pour chaque variant ensuite, un test *SKAT* a comparé la distribution des variants dans le groupe entier des patients tolérants et le groupe entier des contrôles. L'ensemble du processus est illustré en **Figure 9**.

**Figure 9** - Organigramme de l'étude



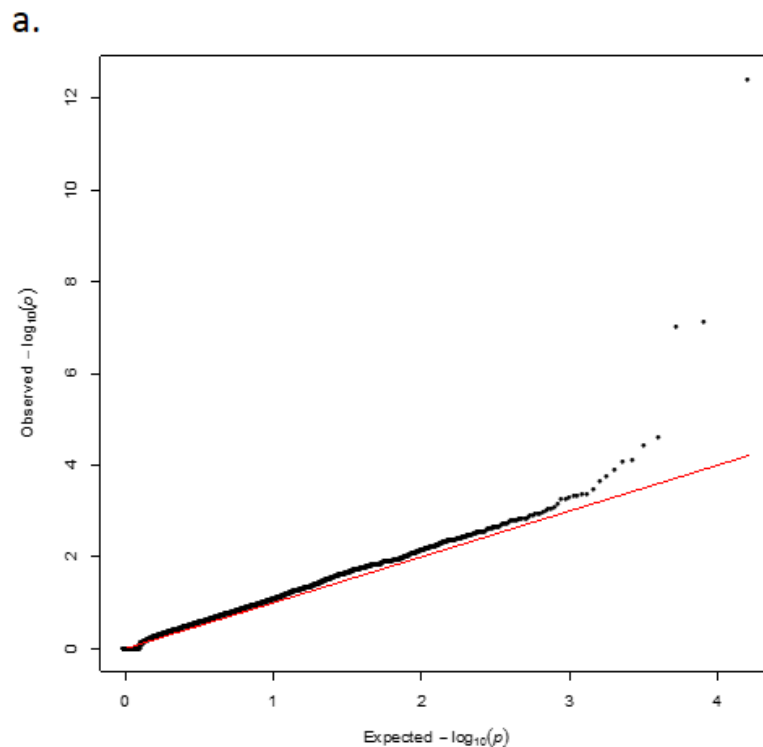
Note: Les contrôles *in-house* ont été sélectionnés sur base de l'absence de pathologie rénale connue et de leur homogénéité au cours d'une analyse en composantes principales

Réaliser une analyse de type *SKAT* revient à comparer les variances statistiques de deux distributions de variants chez les cas et les contrôles. Les variants peuvent être distribués selon différents critères au choix de l'investigateur; dans le cas présent nous avons choisi la fréquence allélique comme variable indépendante.

### Analyse SKAT à l'échelle des gènes

Ici on compare la distribution des variants d'un même gène chez les cas et les contrôles<sup>1</sup>. Un test SKAT est réalisé pour chaque gène étudié. Tous les variants d'un gène sont donc considérés de manière équivalente et supposés *a priori* délétères pour sa fonction. En d'autres termes, on cherche à capturer une hérédité monogénique qui reposerait sur différents variants du même gène selon les patients. Aussi, en réalisant une analyse composite (on dirait *collapsing* en anglais), on réduit le nombre de tests statistiques effectués, ce qui permet d'améliorer la puissance globale de l'essai (Figure 10).

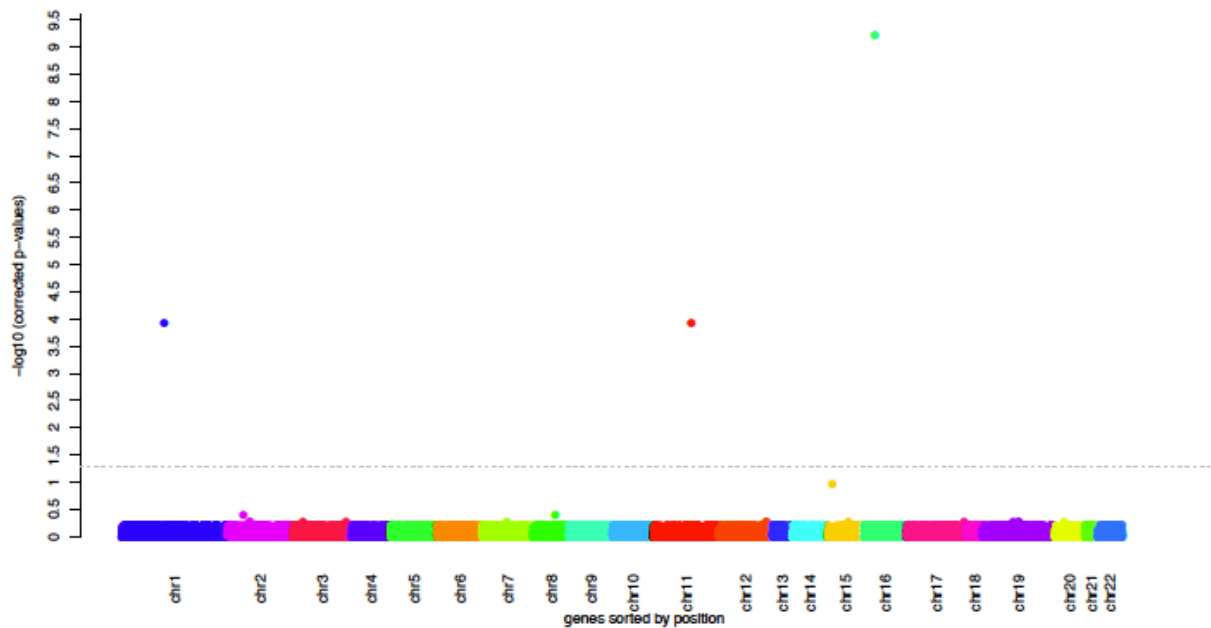
**Figure 10** - Comparaison gène-par-gène des patients tolérants et des contrôles.



<sup>1</sup> Ainsi, plutôt que de comparer la distribution du variant *v* du gène *ABC* au sein des *n* cas à la distribution du même variant *v* au sein des *m* contrôles, on peut choisir d'analyser la distribution de tous les variants *v*, *w*, *x*, *y*, *z*, ... retrouvés au sein du gène *ABC* chez les *n* cas versus *m* contrôles.



b.



Légende: les exomes de 40 patients tolérants ont été comparés à ceux de 204 contrôles. La comparaison a porté sur les variants d'impact modéré à élevé, regroupés par gène, et a été réalisée à l'aide d'un test *SKAT-O* ajusté pour les petits échantillons.

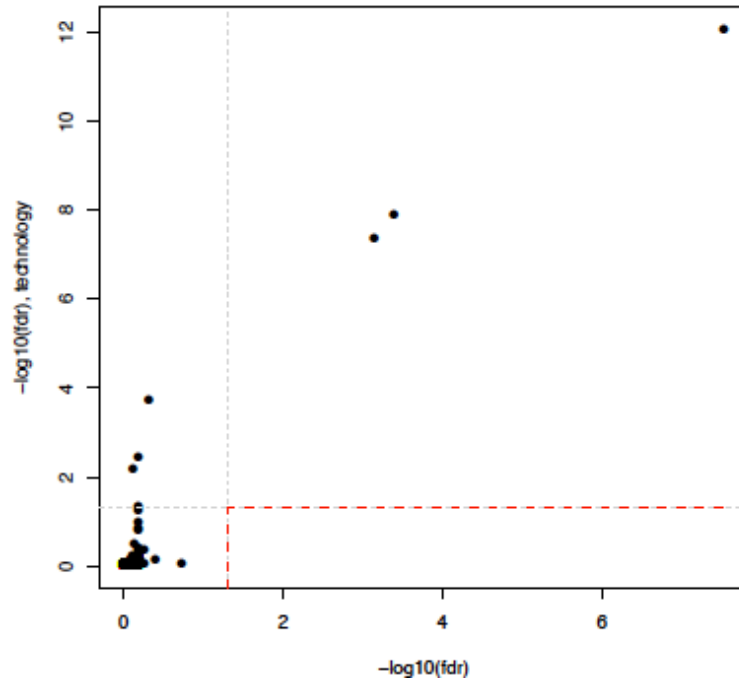
La probabilité de l'hypothèse nulle,  $p$  (en ordonnée) est représentée sous 2 formes:

(a) diagramme quantile-quantile. Chaque point représente un gène. Les valeurs attendues de  $p$  en l'absence d'effet du génotype sont données en abscisse. La droite rouge représente l'égalité entre les observations et les prédictions. Il n'y a pas de correction pour hypothèses multiples sur ce schéma.

(b) Diagramme de Manhattan. Chaque point représente un gène. Les valeurs de  $p$  sont données en ordonnée après correction de type *FDR* à 5%, tandis que l'abscisse indique les positions chromosomiques de chaque gène ordonnées du chromosome 1 au 22. La ligne horizontale en pointillés à hauteur 1.3 ( $-\log_{10}(0.05)$ ) représente la démarcation entre les résultats significatifs (en haut) et les autres (en bas).

A l'issue de cette première analyse, 3 gènes ont franchi le seuil de signification statistique. Cependant, compte-tenu que des *effets de lot* sont à craindre en raison des 2 séquenceurs utilisés, nous avons vérifié à l'aide d'un nouveau test *SKAT* que ces gènes ne ségréuaient pas significativement avec le séquenceur. Il s'agissait donc de réaliser un nouveau test *SKAT* dont le critère d'évaluation principal n'était plus le phénotype (cas / contrôle) mais bien le séquenceur. Il ressort de cette analyse (**Figure 11**) qu'aucun des gènes candidats mis en évidence à ce stade ne discrimine *exclusivement* le phénotype des patients.

**Figure 11** - Evaluation de la capacité de chaque gène à prédire le phénotype indépendamment du séquenceur utilisé, au travers d'analyses *SKAT-O* croisées.



Légende: les exomes de 40 patients tolérants ont été comparés à ceux de 204 contrôles. La comparaison a porté sur les variants d'impact modéré à élevé, regroupés par gène, et a été réalisée à l'aide d'un test *SKAT-O* ajusté pour les petits échantillons. Chaque point représente un gène. En abscisse, on lit les valeurs de *FDR* établies par un *SKAT* visant à déterminer l'impact du génotype sur le phénotype; en ordonnée, on lit les valeurs de *p* établies par un *SKAT* visant à déterminer "l'impact du génotype sur le séquenceur". Les lignes en pointillés représentent les démarcations entre les résultats significatifs et les autres. Les gènes pressentis comme ayant un impact réel sur le phénotype des patients sont attendus dans le quadrant inférieur droit de ce tableau. La présence de gènes dans le quadrant supérieur droit (les 3 gènes retrouvés à l'étape antérieure) suggère des résultats faussement positifs.

Le caractère artéfactuel des 3 gènes identifiés initialement a été confirmé par l'examen de la distribution des génotypes dans chaque groupe (**Tableau 6**). On constate que la répartition des génotypes<sup>2</sup> des variants ayant contribué à générer le signal statistique diffèrent bel et bien entre les contrôles et les cas séquencés sur le séquenceur A mais plus lorsque que les contrôles sont comparés aux cas séquencés sur le séquenceur B.

---

<sup>2</sup> Soit la proportion des nullizygotés, hétérozygotés et homozygotés

**Tableau 6** - Distribution des génotypes par groupe de patients concernant les 3 gènes mis en évidence par le test *SKAT* à l'échelle des gènes.

<i>FDR</i>	Variants par gène	Cas TOMOGRAM (séquenceur B)			Cas nantais (séquenceur A)			Contrôles		
		.	0/1	1/1	.	0/1	1/1	.	0/1	1/1
1.5x10 <sup>9</sup>	2	18	5	13	<b>35</b>	1	4	206	33	175
2.8x10 <sup>4</sup>	2	6	16	14	<b>22</b>	6	12	42	200	172
6.6x10 <sup>3</sup>	4	72	0	0	70	<b>10</b>	0	825	3	0

**Légende:** "1/1" désigne les homozygotes, "0/1" les hétérozygotes et "." les nullizygotés. Les valeurs marquées en gras sont celles qui nous ont paru les plus incohérentes. Le séquenceur A désigne le séquenceur danois de la compagnie Arosab; le B le séquenceur de l'institut de bioinformatique de l'Université Libre de Bruxelles et de la Vrije Universiteit Brussel (IB2, IBsquare, anciennement appelé Bigre).

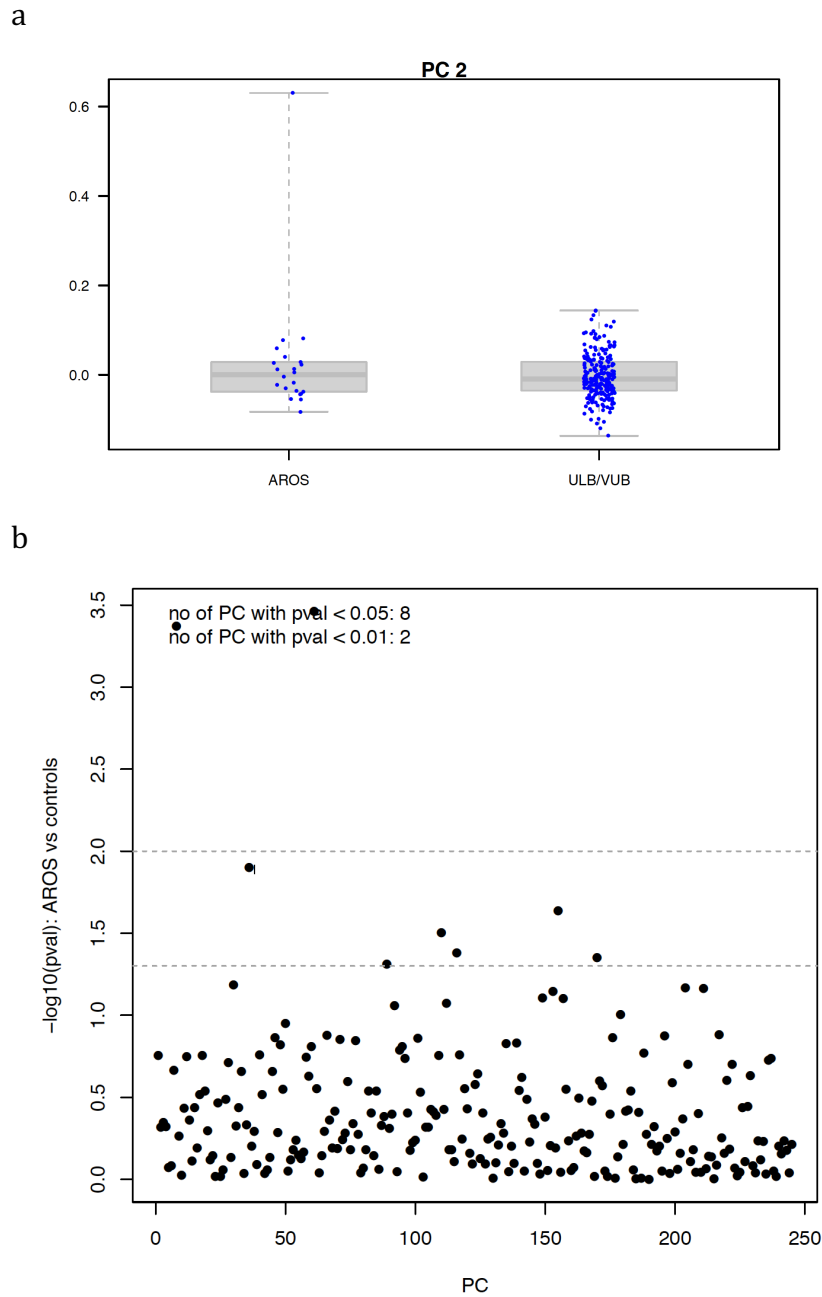
En l'absence de résultats probants, nous avons choisi de répéter nos analyses avec des **patients exhibant un phénotype plus marqué ou hyper-cas** répartis dans des sous-groupes de plus en plus extrêmes (n=26, 19 et 9: voir section 2.2.3, page 61).

En outre, face à ces données hautement suggestives d'un *effet de lot* nous avons choisi de réaliser toutes les nouvelles analyses en double, en introduisant dans une analyse sur 2, à titre exploratoire, **la composante principale qui ségréguait le plus significativement en fonction du séquenceur**. Cette démarche est illustrée en **Figure 12**.

Nous avons testé plusieurs configurations, reprises dans le **Tableau 7**. Si plusieurs résultats significatifs ont initialement émergé, à nouveau, il nous a fallu les écarter à l'issue des contrôles de qualité (tels qu'exposés en section 2.4.4, page 69).

En premier lieu, nous avons éliminé les gènes qui prédisaient le séquenceur utilisé, à l'aide d'un *SKAT* modifié dont le critère d'évaluation était le séquenceur (au lieu du phénotype). En second lieu, les fichiers BAM des gènes restants ont été inspectés afin de contrôler l'aspect des *reads*. Lors de ce processus, nous avons constaté que les gènes mis en évidence n'étaient pas intégralement couverts chez l'ensemble des cas et des contrôles générant par là même de faux signaux. *In fine*, nous avons considéré que les gènes que nous avons mis en évidence étaient des artéfacts et devaient être rejetés.

**Figure 12** - Différenciation des composantes principales en fonction du séquenceur



**Légende:**

(a) Distribution, à titre d'exemple de la composante principale n°2 chez les individus séquencés avec le séquenceur danois (Aros, à gauche) et chez les individus séquencés sur le séquenceur local (ULB/VUB, à droite). Les deux médianes peuvent ensuite être comparées à l'aide d'un test de Wilcoxon-Mann-Whitney.  
(b) Valeur p du test statistique pour chaque comparaison des composantes principales de 1 à 250 selon le séquenceur utilisé.

**Tableau 7-** Synthèse des analyses *SKAT* gène-par-gène réalisées et des gènes initialement retenus.

Tolerant group	Rho =0		Rho =1	
	<i>PC 1 - 3</i>	<i>+ strongest PC</i>	<i>PC 1 - 3</i>	<i>+ strongest PC</i>
<b>n=9</b>	FAAP100	FAAP100	0	0
<b>n=19</b>	FAAP100	FAAP100 ZNF521	EPHA8	EPHA8
<b>n=26</b>	0	DEFB108 FAAP10 RHPN2 AP5B1	EPHA8 RHPN2	DEFB108 RHPN2
<b>n=40</b>	0	0	0	0

Légende: les tests *SKAT*-O gène-par-gène réalisés sont ordonnés selon :

- le nombre de patients tolérants inclus, depuis les phénotypes les plus extrêmes (n=9) jusqu'à la cohorte entière sans exclusion (n=40),
- l'inclusion ou pas de la composante principale la plus significativement différenciée entre les sujets séquencés sur 2 séquenceurs différents ("*+ strongest PC*"). Dans tous les cas de figure, les 3 premières composantes principales ont été intégrées au modèle,
- la valeur du coefficient Rho: lorsqu'on lui donne la valeur 1, la pondération des variants rares augmente.

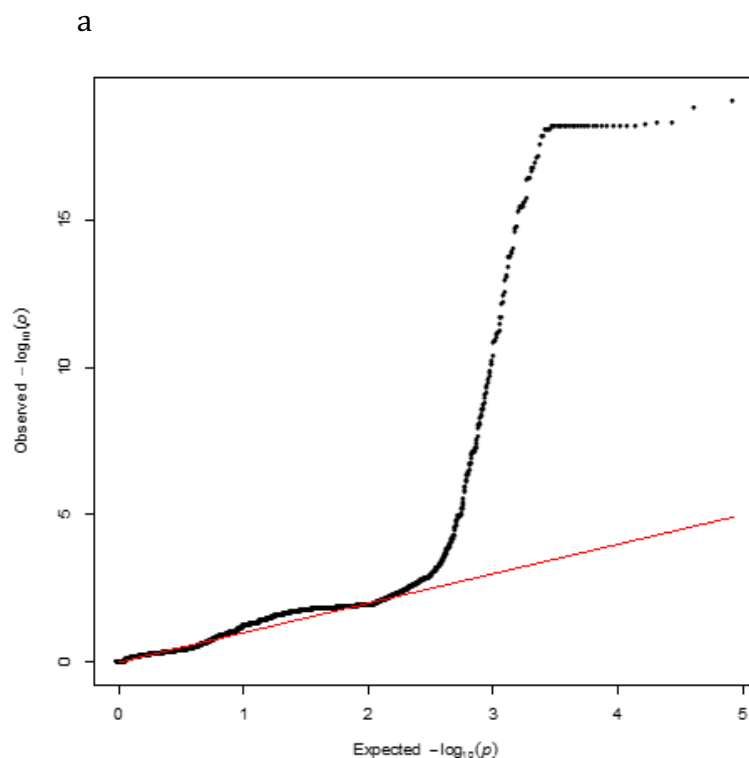
A noter, seuls les gènes non éliminés préalablement du fait de leur association avec le séquenceur sont montrés.

Face à l'absence de résultat avec le *SKAT* gène-par-gène, nous avons choisi de procéder à un *SKAT* variant-par-variant. En effet: nous pariions sur le fait que la fonction d'un même gène, par exemple impliqué dans l'inflammation, pouvait être altérée par une multitude de mutations différentes et où presque chaque patient tolérant aurait son propre variant. Dans ce cas de figure, il est utile de réaliser des analyses à hauteur des gènes pour gagner en puissance. En revanche, lorsqu'un trait ou une maladie est pratiquement toujours causée par le même variant précis, les stratégies d'agrégation perdent en puissance par rapport aux analyses ciblées sur ces variants individuels. Il convenait dès lors de réaliser également une analyse variant-par-variant. Ces résultats sont présentés ci-dessous.

## Analyse par SKAT à l'échelle des variants

Nous avons dès lors réalisé une analyse SKAT à l'échelle des variants, c'est-à-dire que chacun des 84.643 variants retenus après filtration a vu sa distribution dans le groupe des cas comparée à sa distribution dans le groupe contrôle. Ces résultats initiaux sont montrés en **Figure 13**.

**Figure 13** - Comparaison variant-par-variant des patients tolérants et des contrôles.

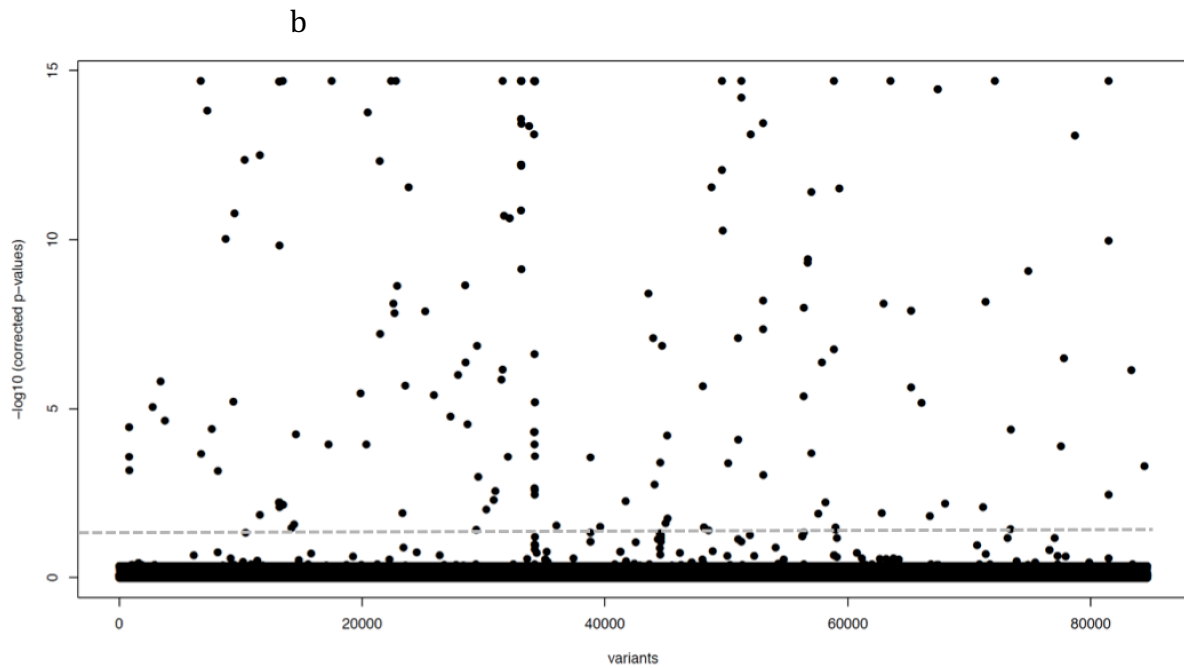


**Légende:** Les exomes de 40 patients tolérants ont été comparés à ceux de 204 contrôles. La comparaison a porté sur les variants d'impact modéré à élevé et a été réalisée à l'aide d'un test SKAT-O ajusté pour les petits échantillons.

La probabilité de l'hypothèse nulle,  $p$  (en ordonnée) est représentées sous 2 formes:

(a) diagramme quantile-quantile. Chaque point représente un variant précis. Les valeurs attendues de  $p$  en l'absence d'effet du génotype sont données en abscisse. La droite rouge représente l'égalité entre les observations et les prédictions. Il n'y a pas de correction pour hypothèses multiples sur ce schéma.

(b) Diagramme de Manhattan. Chaque point représente un variant précis. Les valeurs de  $p$  sont données en ordonnée après correction de type FDR à 5%, tandis que l'abscisse se limite ici à l'énumération des variants. La ligne horizontale en pointillés à hauteur 1.3 ( $-\log_{10}(0.05)$ ) représente la démarcation entre les résultats significatifs (en haut) et les autres (en bas).



Nous avons appliqué deux contrôles de qualité à l'ensemble des variants significatifs ayant émergé à l'issue du test *SKAT* et visibles sur la **Figure 13**, panneau b.

D'abord, nous avons réalisé une nouvelle analyse *SKAT* avec pour critère de jugement la capacité de chaque variant à prédire le séquenceur utilisé. La grande majorité des variants ont du être éliminés à cette étape. Ceux restants, au nombre de 34 variants individuels issus de 27 gènes différents, sont repris dans le **Tableau 8**, page 92.

Ensuite, chacun des variants restants a été inspecté dans les fichiers BAM. Nous avons malheureusement dû constater que l'ensemble de ces variants mis en évidence avaient été générés par des loci couverts de façon différenciée au séquençage et devient être invalidés. A noter également, aucun d'entre eux n'avait un score CADD élevé (défini comme  $> 10$ ), suggérant là-aussi que leur contribution à un phénotype marquant est moins vraisemblable.

Ainsi, au terme de ces analyses nous n'avons pas retenu d'association entre un gène et/ou un variant et le phénotype de la tolérance opérationnelle. Nous discutons ci-dessous les éléments qui ont pu grevé nos analyses et proposons des corrections.

**Tableau 8 - Synthèse des analyses SKAT variant-par-variant réalisées et des variants initialement retenus**

		ALL TOL PATIENTS (n=40)				TOL (n=26)			
		RHO 0		RHO 1		RHO 0		RHO 1	
+ Strongest PC		EHBP1 rs77187983		EHBP1 rs77187983		DOCK10 rs13021295		DOCK10 rs13021295	
		DNAH5 rs1530496		RSPH4A rs6927567		MUC2 rs41501548		MUC2 rs41501548	
		RSPH4A rs6927567		TRBV9 rs17208		DEF108B rs12285436		DEF108B rs12285436	
		TRBV30 rs17267		TRBV30 rs17267		HAPLN3 rs8024779		C17orf70 rs117756453	
		PXDNL rs117752382		PXDNL rs117752382		HAPLN3 rs8039131		RHPN2 rs79314177	
		ACTN3 rs618838		STK32C rs7100410		C17orf70 rs117756453		ELSPBP1 rs34647554	
		ACTN3 rs540874		ACTN3 rs618838		RHPN2 rs79314177			
				ACTN3 rs540874		ELSPBP1 rs34129198			
						ELSPBP1 rs34647554			
no added PC		EHBP1 rs77187983		EHBP1 rs77187983		DOCK10 rs13021295		DOCK10 rs13021295	
		DNAH5 rs1530496		DNAH5 rs1530496		CPED1 rs10953934		CPED1 rs10953934	
		RSPH4A rs6927567		RSPH4A rs6927567		MUC2 rs41501548		MUC2 rs41501548	
		PXDNL rs117752382		PXDNL rs117752382		AP5B1 rs201041158		AP5B1 rs201041158	
		MUC2 rs41501548		MUC2 rs41501548		FAM86C1 rs12283346		FAM86C1 rs12283346	
		ACTN3 rs618838		ACTN3 rs618838		DEF108B rs12285436		DEF108B rs12285436	
		ACTN3 rs540874		ACTN3 rs540874		C17orf70 rs117756453		C17orf70 rs117756453	
		LOXE3 rs3027232		DEF108B rs12285436		RHPN2 rs79314177		RHPN2 rs79314177	
				LOXE3 rs3027232		ELSPBP1 rs34129198		ELSPBP1 rs34129198	
						ELSPBP1 rs34647554		ELSPBP1 rs34647554	
		TOL (n=19)				TOL (n=9)			
+ Strongest PC		PCSK5 rs2803429		PCSK5 rs2803429		AC079354.1 rs10221698		AC079354.1 rs10221698	
		MUC2 rs41501548		MUC2 rs41501548		RAD51B rs8023214		RAD51B rs8023214	
		NDRG2 rs114504351		NDRG2 rs114504351		C17orf70 rs117756453		C17orf70 rs117756453	
		NDRG2 rs113995906		NDRG2 rs113995906					
		C17orf70 rs117756453		C17orf70 rs117756453					
	ZNF521 rs114155230								
no added PC		EPHA8 rs45498698		EPHA8 rs45498698		TVB54 chr7:142168466_A/C		TVB54 chr7:142168466_A/C	
		EPHA8 rs144329757		EPHA8 rs144329757		C17orf70 rs117756453		C17orf70 rs117756453	
		PCSK5 rs1110222		PCSK5 rs1110222					
		PCSK5 rs1110223		PCSK5 rs1110223					
		PCSK5 rs2803429		PCSK5 rs2803429					
		TTC40 rs4880433		TTC40 rs4880433					
		C17orf70 rs117756453		C17orf70 rs117756453					
		ZNF521 rs114155230		ZNF521 rs114155230					



Légende: les tests *SKAT-O* variant-par-variant réalisés sont ordonnés selon:

- le nombre de patients tolérants inclus, depuis les phénotypes les plus extrêmes (n=9) jusqu'à la cohorte entière sans exclusion (n=40),
- l'inclusion ou pas de la composante principale la plus significativement différenciée entre les sujets séquencés sur 2 séquenceurs différents. ("*strongest PC*"). Dans tous les cas de figure, les 3 premières composantes principales ont été intégrées au modèle,
- la valeur du coefficient Rho: lorsqu'on lui donne la valeur 1, la pondération des variants rares augmente.

A noter, seuls les variants non éliminés préalablement du fait de leur association avec le séquenceur sont montrés.

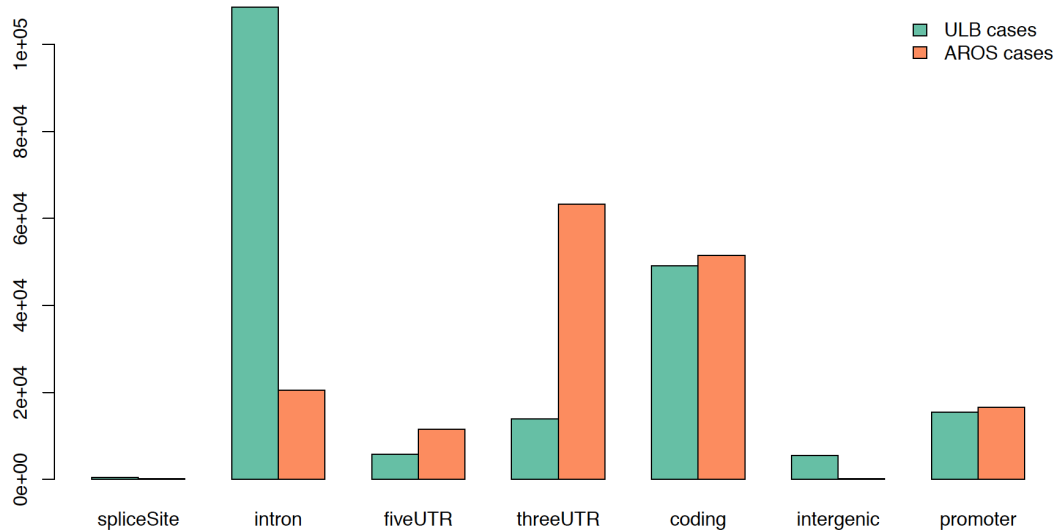
### 3.2.5 *Éléments de discussion portant sur nos analyses SKAT-O*

L'ensemble des variants et gènes initialement détectés par test *SKAT-O* ont été exclus au cours de l'une des deux étapes de vérification ultérieures, nous revenons ici sur la signification de ces éliminations de variants / gènes.

**Premièrement, de nombreux variants ou gènes ont été éliminés parce qu'ils ségréguent avec le séquenceur, ceci étant suggestif d'une stratification.** Cette stratification est également suggérée par l'inflation considérable des résultats observés par rapport aux résultats attendus observée à l'étape du *SKAT* variant-par-variant.

Nous suspectons que l'utilisation de deux séquenceurs distincts - avec pour corollaire des couvertures de séquençage mais également des kits de capture d'exome différents pour les cas de la cohorte nantaise et ceux de la cohorte TOMOGRAM - est principalement responsable de cette stratification. Comme montré en **Figure 14**, les deux kits de capture ciblent des séquences ou *reads* de biotype de natures hétérogènes. Ceci a théoriquement relativement peu d'importance dès lors que notre analyse a porté exclusivement sur les séquences codantes. Toutefois, si l'on se focalise sur ces dernières, on constate également des différences, quoique plus modestes, en fonction du groupe de séquençage. Les cas séquencés chez Aros (cohorte nantaise) comptent plus de variants codants que les patients tolérants séquencés à Bruxelles (cohorte TOMOGRAM). Nous émettons l'hypothèse que la couverture plus basse utilisée (X 50 versus X 75), et par conséquent moins sûre (Muzzey et al., 2015), a pu favoriser la détection de variants rares aberrants dans la cohorte nantaise et générer une stratification. Ceci n'a cependant pas pu être démontré.

**Figure 14** - Nombre moyen de variants chez les cas en fonction de la plateforme de séquençage et du biotype.



**Légende:** nombre moyen de variants chez les patients tolérants issus de la cohorte nantaise (n=22) et de la cohorte TOMOGRAM (=18) selon le biotype des séquences ou *reads*. Analyse réalisée après filtration des variants par le filtre Pass et restriction aux régions communes aux deux kits de capture d'exome. Concernant les seuls variants codants utilisés pour nos analyses, on dénombre 2.691 variants par patient dans la cohorte nantaise et 2.315 variants par patients dans la cohorte TOMOGRAM.

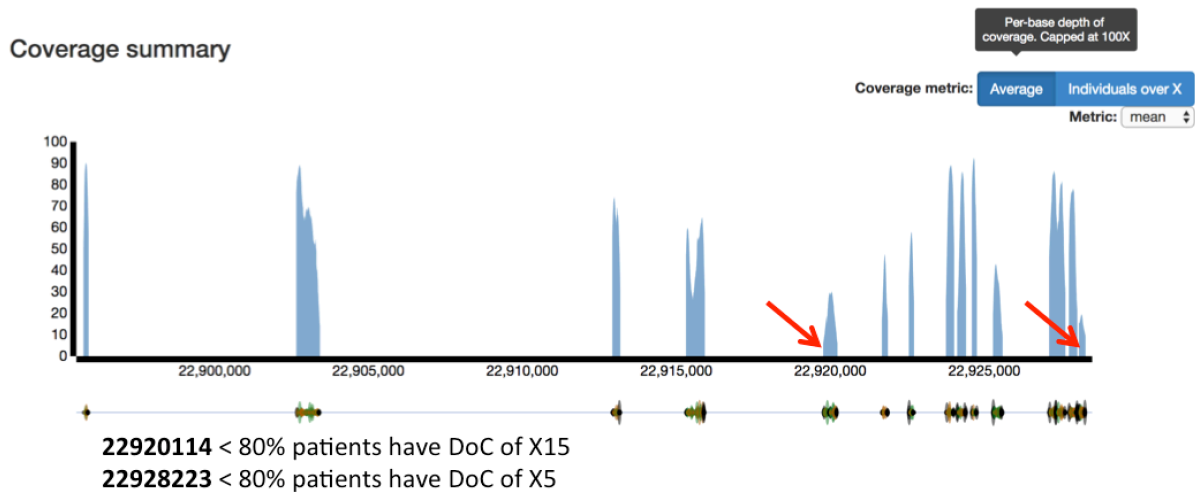
### **Deuxièmement, nos résultats ont été pollués par des gènes et des variants générés artificiellement en raison d'anomalies disparates de couverture du génome.**

Nous ne pouvons pas exclure que des anomalies de couverture soient apparues localement des suites d'aléas lors de la préparation de nos échantillons d'ADN ou du séquençage. Toutefois, il existe également des causes systémiques entravant la couverture optimale de l'exome lors du séquençage. Les kits de capture du génome n'assurent pas une couverture complète de l'exome. On sait qu'il existe une corrélation directe entre faible couverture de séquençage et contenu local en dinucléotides GC (Lelieveld et al., 2015). Les dinucléotides GC sont unis par 3 liaisons hydrogènes (contre 2 pour les dinucléotides AT), les régions qui en contiennent beaucoup sont plus difficiles à dénaturer, et dès lors à séquencer. Ainsi, nous avons pu montrer que plusieurs des gènes que nous avons mis en évidence fallacieusement sur base de problèmes de couverture étaient également très mal couverts dans des bases de données exomiques de référence telles qu'Exac

(<http://exac.broadinstitute.org/>) ou ESP (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>) attestant dès lors de difficultés locus-spécifiques. Nous fournissons un exemple en **Figure 15**.

**Figure 15** - Exemple de *loci* difficilement séquençables au niveau du gène EPHA8

Region: 1 / 22895500 / 22928500



**Légende:** dans la base de données Exac, 2 des variants (coordonnées sur le schéma et flèches rouges) à l'origine du signal pour le gène EPHA8 dans le *SKAT-O* gène-par-gène ont une profondeur médiocre, < X 15 voire à < X 5, chez plus de 80% des individus.

Il eût cependant été possible de détecter ces défauts de couverture du génome en amont du test *SKAT* en travaillant avec des *.VCF* génomiques (*genomic VCF* ou *gVCF*) plutôt que des fichiers *.VCF* ordinaires (*regular Variant Call Format*). Les *.VCF* ordinaires contiennent la liste de tous les variants appelés ainsi que des données techniques. Les *gVCF* rapportent en outre les informations concernant chaque position génomique séquencée, que l'on y retrouve un variant ou pas. Ainsi l'usage des *gVCF* permet de différencier une position non couverte de l'absence de variants, ce qui nous a manqué dans le cas présent. Utiliser des *gVCF* impose de plus lourdes contraintes en terme de stockage et était difficilement surmontable pour nous. Nous travaillons actuellement à déterminer les régions génomiques mal couvertes en amont des *gVCF* avant de relancer nos prochaines analyses *SKAT*.

### 3.2.6 Améliorations possibles

Nous avons identifié plusieurs difficultés ayant pu entraver nos analyses. Nous dressons ici et dans la liste des corrections immédiatement applicables, sans modifier nos effectifs, pour parfaire nos analyses. Elles peuvent être regroupées sous 3 bannières.

(Une synthèse est disponible dans le **Tableau 9**)

#### **1) Stratégies pour contrôler la stratification liée au groupe de séquençage**

- poursuivre les analyses croisées de *SKAT* avec pour critères de jugement le groupe de séquençage et le phénotype;
- étudier de façon plus détaillée la prévalence des variants dans les deux groupes de séquençage selon leur fréquence allélique et la profondeur de leur couverture. *Au besoin* restreindre l'analyse aux seuls variants retrouvés dans les deux cohortes de cas et/ ou analyser séparément les variants rares et communs.

#### **2) Stratégies pour limiter les faux positifs liés à des anomalies de couverture**

- comme préliminaire à toute nouvelle analyse *SKAT*, sous-sélectionner au niveau des BAM les seuls variants séquencés avec une profondeur de couverture X 8 chez l'ensemble des cas et des contrôles.

#### **3) Stratégies pour augmenter notre puissance**

- restreindre les variants étudiés à ceux dont le score CADD dépasse  $> 10$ . Ainsi nous escomptons 1°: réduire le nombre de variants considérés et rendre la correction pour erreurs multiples plus favorable, 2°: dans le cas de l'analyse gène-par-gène, cela modifiera en profondeur la distribution des variants et génère une analyse neuve (*propositions 1 et 2*);
- inclure les variants entraînant une modification de l'épissage alternatif des ARN;
- *Au besoin*: réduire le nombre de variants étudiés (soit en se limitant à des variants rares, soit à une liste de gènes candidats) - pour les mêmes raisons qu'expliqué plus haut (*propositions 3 à 6*);
- *Au besoin*: utiliser une correction *FDR* moins stringente (10% au lieu de 5);
- *Pour rappel*: l'estimation de la puissance de notre essai est en cours d'évaluation par une stratégie de simulation (voir section 2.4.5 page 69) et d'éventuels résultats négatifs seront établis à l'aune de cette donnée.

**Tableau 9** - Synthèse énumérant les caractéristiques techniques des analyses *SKAT-O* déjà effectuées et à venir.

<b>a. Performed analyses</b>							
Analysis level	TOL group	Rho	SNP effect	Minor allele frequency	CADD score	PCA	Gene list
GENE	- 40 - 26 - 19 - 9	1 - 0	High or moderate BIOTYPE coding	Not specified	Not used	PC1-3 + strongest PC	NO
VARIANT	- 40 - 26 - 19 - 9	1 - 0	high or moderate BIOTYPE coding	Not specified	Not used	PC1-3 + strongest PC	NO
<b>b. Planned analyses - following restriction to well-covered positions in all BAM files</b>							
<b>(1)</b> GENE	- 40 - 26 - 19 <i>- 9</i>	1 - 0	high or moderate BIOTYPE coding + splice site	Not specified	<i>&gt; 10 only, before SKAT</i>	PC1-3 + strongest PC	NO
<b>(2)</b> VARIANT	- 40 - 26 - 19 <i>- 9</i>	1 - 0	high or moderate BIOTYPE coding + splice site	Not specified	<i>&gt; 10 only, post SKAT</i>	PC1-3 + strongest PC	NO
<b>(3)</b> GENE	- 40 - 26 - 19 <i>- 9</i>	1 - 0	high or moderate BIOTYPE coding + splice site	<i>&lt; 0.005</i>	<i>No CADD</i>	PC1-3 + strongest PC	NO
<b>(4)</b> VARIANT	- 40 - 26 - 19 <i>- 9</i>	1 - 0	high or moderate BIOTYPE coding + splice site	<i>&lt; 0.005</i>	<i>No CADD</i>	PC1-3 + strongest PC	NO
<b>(5)</b> GENE	- 40 - 26 - 19 <i>- 9</i>	1 - 0	high or moderate BIOTYPE coding + splice site	Not specified	<i>No CADD</i>	PC1-3 + strongest PC	<i>Gene list</i>
<b>(6)</b> VARI- ANT	- 40 - 26 - 19 <i>- 9</i>	1 - 0	high or moderate BIOTYPE coding + splice site	Not specified	<i>No CADD</i>	PC1-3 + strongest PC	<i>Gene list</i>

**Légende:** ce tableau détaille les caractéristiques techniques des analyses *SKAT* déjà effectuées (a) ou à venir (b). Les modifications apportées entre les analyses effectuées et celles à venir sont indiquées en rouge et en italique dans le panneau b.

**Note:** "+ strongest PCA" désigne la composante principale statistiquement la plus significative parmi celles distinguant la cohorte nantaise des sujets contrôles.



# 4 CONCLUSION, DISCUSSION ET PROLONGEMENTS POSSIBLES

## RESUME

Dans ce chapitre nous résumons les principaux résultats et les contributions engendrées par notre travail (4.1), nous évoquons ensuite ses limites méthodologiques (4.2) et discutons quelques objections que pourraient susciter nos conclusions (4.3). Nous développons enfin sur ces bases un plan des nouvelles études qui, selon nous, devraient y succéder (4.4).

## SOMMAIRE

<b>4</b>	<b>CONCLUSION, DISCUSSION ET PROLONGEMENTS POSSIBLES .....</b>	<b>99</b>
<b>4.1</b>	<b>Contribution de la thèse et résultats .....</b>	<b>101</b>
<b>4.2</b>	<b>Limites méthodologiques .....</b>	<b>102</b>
4.2.1	<i>A propos de cette section .....</i>	102
4.2.2	<i>Une exploration partielle du génome .....</i>	102
4.2.3	<i>Le choix des contrôles .....</i>	103
4.2.4	<i>Effets de lot .....</i>	104
4.2.5	<i>Inaccessibilité des données et échantillons des donneurs .....</i>	105
<b>4.3</b>	<b>Éléments de discussion .....</b>	<b>105</b>
4.3.1	<i>A propos de cette section .....</i>	105
4.3.2	<i>Et si la tolérance n'avait pas de bases génétiques significatives? .....</i>	105
4.3.3	<i>Si la tolérance est déterminée génétiquement, pourquoi les patients tolérants ne présentent-ils pas en permanence une immunodéficience? .....</i>	107
<b>4.4</b>	<b>Futures recherches et perspectives .....</b>	<b>108</b>
4.4.1	<i>A propos de cette section .....</i>	108
4.4.2	<i>Pourquoi l'étude de la génomique des patients tolérants doit-elle être poursuivie? ..</i>	108

4.4.3	<i>Comment poursuivre l'étude de la génomique des patients tolérants? - Avec les données déjà disponibles.....</i>	110
4.4.4	<i>Comment poursuivre l'étude de la génomique des patients tolérants? - Possibles nouvelles investigations.....</i>	111
4.4.5	<i>Conclusion générale.....</i>	114



## 4.1 Contribution de la thèse et résultats

Pour rédiger cet ouvrage, nous avons rassemblé **la plus large cohorte de patients tolérants à leur greffon rénal sur le territoire européen** à ce jour et établi que la tolérance était un évènement extrêmement rare, de survenue apparemment spontanée et associée à un pronostic des plus favorables.

**Nous avons comparé les exomes de patients exceptionnels: des patients transplantés rénaux tolérants à leur allogreffe (n=40) à des contrôles sains (n= 204) et nous montrons qu'il est improbable, sous réserve de futures recherches, qu'une hérédité monogénique simple préside au développement de la tolérance chez l'humain.**

Ce faisant, nous avons également implémenté en néphrologie, l'usage d'un **test statistique élégant et innovant appelé SKAT-O** qui permet de rechercher une association génétique au travers de tout le génome à partir d'échantillons de taille limitée sans se cantonner à une hypothèse mécanistique préalable (Emond et al., 2012; Gao et al., 2016; Mackelprang et al., 2017; McLaren et al., 2015).

A notre connaissance, seule une étude préalable avait exploré les déterminants génétiques de la tolérance, en choisissant de se limiter à regarder si des polymorphismes établis pouvaient rendre compte des différences d'expression génique observées chez les tolérants par rapport à des contrôles (travail présenté en section 1.4.2, page 27 (Danger et al., 2012b)). Notre travail se positionne dès lors, selon nous, comme **le premier à comparer des patients tolérants à des contrôles sur l'étendue de leur génome, sans limitation à une hypothèse mécanistique préalable.**

Nous pensons que le présent projet collaboratif, même s'il n'a pas dégagé de résultat probant à ce stade, pourrait ouvrir la voie à d'autres études dans le champ de la génétique de la transplantation rénale. Dans la section suivante nous examinons les limites de notre travail et ébauchons ce qui pourrait être amélioré dans des études ultérieures.

## 4.2 Limites méthodologiques

### 4.2.1 *A propos de cette section*

Notre travail comporte plusieurs limitations. Nous évoquons ici les questions de la couverture de nos analyses (4.2.2); du choix des contrôles (4.2.3); des effets de lots (4.2.4) et enfin de l'absence de recours possible aux échantillons des donneurs (4.2.5).

### 4.2.2 *Une exploration partielle du génome*

Même si cette étude est l'étude la plus extensive jamais réalisée sur la génomique des patients tolérants, elle n'en demeure pas moins partielle et ne saurait prétendre exclure des mutations de types ou de localisations non recherchées.

Notre étude ciblait les régions exoniques des autosomes telles que capturées par nos kits de capture et, par hypothèse, **négligeait les variants introniques, intergéniques ainsi que les variants exoniques de pathogénicité faible** (variants synonymes) tous réputés comme ayant des conséquences phénotypiques peu marquées.

Aussi, la puissance limitée de notre essai - conséquence directe de la rareté des patients tolérants - ne nous permettait pas d'exclure des **formes plus complexes d'hérédité**, telles qu'une hérédité monogénique fort hétérogène: on parle *d'hétérogénéité génétique* lorsque le trait ou la maladie n'est pas causée par le(s) même(s) gène(s) chez tous les sujets concernés; ou une hérédité multigénique. Notons également que les **variants génétiques structurels**, telles que les insertions ou duplications impliquant plus de 25 paires de bases, de même que les mutations somatiques ne sont pas valablement détectées par le séquençage d'exome (*WES*) et devraient être explorées dans une autre étude.

Une étude d'association par séquençage du génome entier (*WGS*) apparaîtrait comme l'étape logique après cette étude et ce pour deux raisons: cette approche assure une couverture plus complète des exons grâce à l'absence d'étape de capture ; ensuite, il permet la détection des variants structurels, exoniques ou pas.

### 4.2.3 Le choix des contrôles

Nos patients tolérants ont été comparés à des sujets contrôles réputés dénués d'affections rénales et on ignore, forcément, s'ils eussent été tolérants à l'arrêt des immunosuppresseurs en cas de transplantation rénale. On peut dès lors craindre une contamination du groupe contrôle par des sujets porteurs du génotype de la tolérance.

Il est vraisemblable que des contrôles exprimant le phénotype opposé en nombre suffisant aurait été un meilleur choix et notre préférence se serait alors portée sur des patients en rejet chronique. Des patients en rejet aigu ne nous paraissaient pas opportuns car une part significative des patients tolérants ont déjà souffert de rejet aigu (Brouard et al., 2012; Massart et al., 2016). Les deux phénotypes ne paraissent donc pas mutuellement exclusifs. En outre, l'équipe du Prof. Brouard a montré dès 2007 que les patients en rejet chronique étaient ceux qui avait la signature transcriptomique la plus éloignée des patients tolérants (Brouard et al., 2007).

La fait d'utiliser des contrôles séquencés sur les mêmes plateformes que les tolérants a pour nous primé dans l'objectif de limiter les effets de lot. Nous avons donc choisi des contrôles *in-house* bien qu'ils ne fussent pas en rejet chronique. Séquencer *de novo* l'exome de plusieurs centaines de patients en rejet chronique sur nos machines aurait eu des coûts injustifiables compte-tenu que notre étude était la première de ce type.

Nous avons donc opté pour un *design* de type "extrêmes vs contrôles" (*single extreme versus control design*), plutôt que de type "extrêmes phénotypiques" (*extreme phenotypes design*). Il ressort de différents modèles de simulation<sup>1</sup>, qu'une contamination du groupe contrôle inférieure au pourcent a généralement un impact négligeable sur la puissance de l'essai (Emond et al., 2015b; Guo et al., 2016). Nous avons estimé que nous étions bien dans ces conditions<sup>2</sup>. Nous admettons qu'une erreur quant à la rareté de la tolérance

---

<sup>1</sup> Toutefois avec de plus larges groupes contrôles.

<sup>2</sup> Comme nous l'avons montré, la tolérance est une observation clinique rare, identifiée chez moins de 0.05% des patients mais sa prévalence exacte est inconnue. D'autre part, plusieurs études de biomarqueurs évoquent des prévalences de 3 à 16.7%, cependant leur valeur prédictive pourrait être très éloignée. Personne n'a encore osé arrêter les immunosuppresseurs sur cette base...

Voici comment nous avons estimé la prévalence de la tolérance

Partant de notre enquête paneuropéenne on compte

66 tolérants pour 218.913 transplantés rénaux (0,3/1.000) - TAUX DECLARE;

aurait pu entraîner une perte de puissance significative. Ces différentes hypothèses mériteraient également d'être testées dans des simulations qui tiennent compte des conditions spécifiques dans notre cohorte.

#### 4.2.4 Effets de lot

Malgré tous nos efforts, des échantillons ont, à un moment ou à un autre, connu des traitements différenciés (extractions d'ADN, 2 kist de capture, 2 séquenceurs, plusieurs vagues de séquençage). Toute hétérogénéité technique (espace-temps, expérimentateur, réactifs, machine...) est susceptible d'entraîner des effets de lots (Goh et al., 2017), qui à leur tour peuvent contribuer à accroître les erreurs alpha. La distribution de nos résultats telle que visualisée sur les graphiques quantiles-quantiles laisse effectivement entrevoir une stratification. Celle-ci pourrait être liée aux patients (origines géographiques différentes) ou bien avoir été générée par des disparités techniques dans le traitement des échantillons (effets de lot). Le plus grand risque encouru était selon nous que les patients tolérants ont été séquencés de façon différenciée. Nous avons dès lors cherché à en minimiser les conséquences. D'abord en introduisant dans notre modèle de *SKAT* les composantes principales qui ségréuaient le plus significativement selon le séquenceur utilisé et dès lors les plus à risque d'être artéfactuelles. Ensuite, l'ensemble des variants retenus comme significatifs après analyse par *SKAT* ont été re-testés, dans un *SKAT* modifié, et exclus s'ils prédisaient significativement, non seulement le phénotype mais aussi,

---

fixons que ce soit effectivement une sous-évaluation et comptons que 4 patients sur 5 ne furent pas rapportés:  
*330 tolérants pour 218.913 transplantés rénaux (1,5/1.000) - TAUX CONSERVATEUR;*

enfin, le nombre de patients potentiellement porteurs du génotype de la tolérance pourrait être affiné tenant compte du fait que seuls les patients qui ont cessé leurs immunosuppresseurs ont pu développer le phénotype et qu'une large majorité de ces arrêts thérapeutiques a résulté de leur non-observance thérapeutique. On mesure régulièrement que l'incompliance tourne autour des 22% parmi les transplantés rénaux (Butler et Al. *Transpl.*, Vlaminc Am J *Transpl.* 2007, Takemoto, Am J *Transpl* 2007). Notre estimation devient donc:

*330 tolérants pour 48.161 transplantés rénaux inobservants (6,8/1.000)*

Notre appréciation finale est que moins d'un pourcent des patients transplantés rénaux inobservants pourraient devenir tolérants à leur greffon suite à l'arrêt de leurs traitements. Ceci paraît en tout cas toujours consistant avec l'expérience quotidienne des cliniciens transplantateurs qui côtoient au quotidien des patients inobservants mais, pour la plupart, n'ont jamais rencontré de patient tolérant. Pour l'anecdote il nous a été demandé de donner à la Société Européenne de Transplantation (ESOT), à Copenhague, en 2019, une présentation intitulée: "Operational tolerance : does it really exist?": cela semble en dire long.

anormalement, le séquenceur. Si nous avons pu éliminer plusieurs faux positifs par ces techniques, nous retenons qu'il est primordial de faire prévenir les *effets de lots*.

#### 4.2.5 *Inaccessibilité des données et échantillons des donneurs*

Pour la plupart des donneurs des reins devenus "tolérés", il n'existe plus ou il n'y a jamais eu d'ADN conservé. Les informations sur les incompatibilités HLA entre donneurs et receveurs reposent sur des rapports et ne sont plus contrôlables, ce qui a pu occasionner des erreurs. Plusieurs informations sur le typage HLA-DR sont manquantes. Cette situation est naturellement irrémédiable.

### 4.3 **Éléments de discussion**

#### 4.3.1 *A propos de cette section*

Nous discutons ici des objections que pourraient soulever nos conclusions. En particulier de savoir si nos résultats, négatifs, plaident contre une contribution génétique du receveur aux réactions d'alloimmunité (4.3.2). Ensuite du paradoxe, qui n'est qu'apparent, qu'il y aurait à être prédisposé génétiquement à développer une tolérance aux greffons sans aucune autre forme d'immunodéficience (4.3.3).

#### 4.3.2 *Et si la tolérance n'avait pas de bases génétiques significatives?*

Il est de plus en plus évident que la tolérance repose sur des rééquilibrages individuels au sein des répertoires de cellules alloréactives où les cellules suppressives ou régulatrices l'emportent sur les cellules effectrices. Différentes populations de cellules suppressives ont été identifiées et caractérisées, par le biais d'études transcriptomiques et mécanistiques, tant au sein des répertoires B (Baron et al., 2015; Chesneau et al., 2015; Chesneau et al., 2014; Pallier et al., 2010); T (Braza et al., 2015; Chenouard et al., 2017; VanBuskirk et al., 2000) que CD4<sup>+</sup> (Dugast et al., 2017; Roedder et al., 2015). Les propriétés

immunosuppressives de ces cellules s'exercent soit via des médiateurs solubles (par exemple: l'IL-10, le TGF- $\beta$ ), soit via des molécules de surface (par exemple: le CTLA-4 ou PD-1), et concourent à l'immunoquiescence vis-à-vis du greffon. On sait aujourd'hui également que la stabilité phénotypique des populations cellulaires des patients tolérants repose sur des modifications de type épigénétique; qu'il s'agisse de méthylations (comme dans le cas des cellules T mémoires régulatrices dont la déméthylation d'une région spécifique, la *Treg-specific demethylated region*, est critique pour la fonction (Braza et al., 2015)) ou bien de profils spécifiques d'expression de microARN (Cabral et al., 2019; Danger et al., 2012a). Ainsi, chez les patients tolérants, la sous-/ sur-expression de plusieurs microARN module des milliers de gènes qui concourent à l'homéostasie des populations cellulaires, notamment B, et au climat protecteur vis-à-vis du greffon (Cabral et al., 2019; Danger et al., 2012a). Les microARN sont eux aussi susceptibles d'être modulés par l'environnement, notablement par l'immunosuppression et ils sont donc aussi susceptibles d'apparaître... ou de disparaître (Anglicheau et al., 2010).

**Si les phénomènes concourant au maintien de la tolérance aux greffons rénaux commencent à être décryptés, le problème central demeure aujourd'hui d'identifier le ou les mécanismes causaux responsable(s) de leur mise en place.**

D'aucuns pourraient penser que la tolérance spontanée aux greffons rénaux résulte, pour l'essentiel, d'une conjoncture d'évènements environnementaux au sens large (drogues utilisées, qualité du greffon, appariements HLA , ...) sans lien avec le génome du receveur. On ne peut écarter formellement cette hypothèse à cette heure, cependant elle peine à rendre compte du fait qu'une poignée de patients seulement vont développer une tolérance à leur greffon dans des conditions en apparence pourtant similaires (Brouard et al., 2012; Massart et al., 2016; Roussey-Kesler et al., 2006).

On sait par contre que quantités de variants exoniques rares ou moins rares causent des présentations phénotypiques extrêmes. Ainsi, plusieurs variants hautement pénétrants contribuent à expliquer des traits *biologiques* extrêmes (quelques exemples ont été présentés dans notre introduction en section 1.5), mais également la variabilité de conditions *a priori exogènes* ou multifactorielles telles que le risque d'être contaminé.e par le virus du SIDA lors d'un contact à risque (Mackelprang et al., 2017), le risque de développer

précocement un infarctus du myocarde ou encore une maladie d'Alzheimer (Cacace et al., 2016; Chaudhury et al., 2017; Do et al., 2015). D'autres variants expliquent également des formes les plus sévères d'hémochromatose et de mucoviscidose, sans lien avec les variants causaux de ces maladies (Agrawal et al., 2017; McLaren et al., 2015)

Concernant la transplantation spécifiquement, il existe aussi des données laissant penser que le patrimoine génétique des receveurs contribue à moduler les réactions d'alloréactivité. Nous avons cité en introduction plusieurs arguments épidémiologiques, expérimentaux et transcriptomiques (voir en section 1.4.2 page 27): s'y ajoute désormais, la démonstration formelle, dans notre *GWAS*, qu'au moins 2 *SNPs* des receveurs sont associés au rejet aigu d'allogreffe chez l'humain. Tout récemment, le groupe de Zhang et collègues a montré qu'une signature transcriptomique *pré-greffe* permettait de prédire les occurrences de rejets cellulaires aigus précoces et tardifs ainsi que les rejets humoraux et le développement d'anticorps anti-greffons, le tout indépendamment des caractéristiques du donneur (Zhang et al., 2019)! Si ces éléments ne sont pas tous des preuves définitives d'une implication significative des variants génomiques du receveur dans les réactions allo-immunes, ils constituent néanmoins des arguments forts pour continuer à les rechercher. Seuls des études génomiques de plus grande ampleur permettront de répondre définitivement à cette question.

#### 4.3.3 *Si la tolérance est déterminée génétiquement, pourquoi les patients tolérants ne présentent-ils pas en permanence une immunodéficience?*

Nous n'avons personnellement pas connaissance de patients qui auraient été d'emblée tolérants à leur greffon, bien au contraire: 13 à 40% des patients tolérants ont un antécédent de rejet aigu sur le même greffon (Brouard et al., 2012; Massart et al., 2016). Ces constatations, de même que la multitude des protocoles de laboratoire qui permettent de rendre les animaux tolérants mènent à penser que la tolérance aux greffes *s'acquiert*. Précisons au passage que l'acquisition active d'un phénotype ne s'oppose aucunement à la possibilité d'une prédisposition héréditaire, comme c'est le cas pour le langage.

Ainsi, le système immunitaire doit déterminer, pour chaque antigène, s'il convient de le rejeter ou de le tolérer et dans le cas de la transplantation rénale, la présentation antigénique a lieu concomitamment à l'administration de nombreuses autres drogues qui visent

à empêcher une réponse alloréactive délétère. Plusieurs travaux ont mis en exergue que la tolérance aux greffons, chez l'humain, passe par l'inhibition d'une compilation de mécanismes singuliers (Miller et al., 2017; Sachs, 2003), témoin que les mécanismes de l'alloréactivité humaine sont pléiotropes et redondants, bien plus que chez les souris.

**Nous faisons l'hypothèse qu'une prédisposition génétique à développer une tolérance aux greffons est une condition nécessaire mais non suffisante pour entraîner une anergie à l'égard de certains antigènes, laquelle ne prendrait place qu'en présence d'autres altérations des réponses immunitaires, lesquelles sont induites par les immunosuppresseurs dans la phase qui précède la tolérance.**

## 4.4 Futures recherches et perspectives

### 4.4.1 *A propos de cette section*

Dans la première partie de cette section, nous exposons les raisons qui doivent selon nous, nous faire poursuivre et approfondir la recherche sur la génomique des patients tolérants (4.4.2). Dans les deux sections suivantes, nous détaillons les aspects que pourraient revêtir ces recherches; immédiatement: avec les données déjà engendrées (4.4.3) et; à moyen ou long terme, au cours de nouvelles investigations, génétiques ou non (4.4.4). Nous concluons sur les enjeux plus larges soulevés par la recherche sur la tolérance aux greffons (4.4.5).

### 4.4.2 *Pourquoi l'étude de la génomique des patients tolérants doit-elle être poursuivie?*

Evidemment, la découverte d'un réseau de gènes supportant le développement de la tolérance aux greffons rénaux serait importante pour les patients porteurs. Ces populations pourraient ainsi être les premières intégrées à de nouveaux **protocoles de minimisation** contrôlée de l'immunosuppression et in fine concourir à **l'établissement de nouveaux biomarqueurs** de tolérance aux greffons, à la fois fiables et prédictifs pour guider la minimisation chez d'autres.



Au-delà des applications tournées vers les patients directement concernés, que l'on suppose peu nombreux, nous pensons que les recherches sur les prédispositions génomiques des receveurs à développer une tolérance aux allogreffes rénales peuvent avoir une portée beaucoup plus large. Nous souhaitons souligner les points suivants:

Les études sur la génomique des patients tolérants pourraient mener à identifier des **gènes candidats susceptibles d'être actionnés**. Différentes interventions: pharmacologiques; de type thérapie cellulaire; mimétiques ou d'inhibiteurs d'ARN; ou encore l'édition génomique somatique, pourraient permettre d'orienter plus ou moins durablement le système immunitaire vers la tolérance. La plupart des études antérieures sur la tolérance opérationnelle se sont focalisées sur des marqueurs transcriptomiques et/ou épigénétiques. Ce type d'études ne permet ni de déterminer si les voies métaboliques découvertes constituaient des causes ou bien des conséquences de tolérance; ni, trop souvent, de s'assurer que les signatures ne reflétaient pas simplement l'absence d'immunosuppression (Bottomley et al., 2016; Rebollo-Mesa et al., 2016). En outre, le choix du tissu et/ou de la population cellulaire de référence pose régulièrement question<sup>3</sup> (Danger et al., 2016). **A la différence des études transcriptomiques, les études génomiques congédient les questions de temporalité, d'interférence des immunosuppresseurs et de relevance des populations cellulaires.** Nous pensons que ce type d'études est à même de fournir des bases plus solides pour la recherche d'une cible thérapeutique permettant d'induire de la tolérance aux greffes.

Nous espérons avoir démontré le bien-fondé et la relevance de mener des investigations génomiques chez les receveurs de reins transplantés. Dans les paragraphes suivants, nous examinons les chemins qui pourraient être empruntés.

---

<sup>3</sup> A commencer par savoir si le choix du compartiment sanguin pour identifier un biomarqueur reflétant les événements intrarénaux est le bon.

#### 4.4.3 *Comment poursuivre l'étude de la génomique des patients tolérants? - Avec les données déjà disponibles*

Au vu de nos observations actuelles, une hérédité purement mendélienne à pénétrance complète n'est pas probable. Avec les données disponibles, il est encore possible d'aller un peu **plus loin dans la recherche de variants monogéniques**: en assouplissant notre tolérance vis-à-vis des faux positifs (correction *FDR*) et/ou en restreignant d'emblée notre recherche aux variants très rares pour augmenter notre puissance. A ce stade, il est également nécessaire d'objectiver la puissance de notre essai dans une simulation a posteriori.

- **Calcul de puissance**: contrairement à une étude épidémiologique classique ou une étude randomisée, il est difficilement concevable de générer une hypothèse statistique *a priori* dans les études de séquençage pangénomique et ceci du fait, qu'à la base, on ne connaît pas le taux de sujets contrôles arborant des *variants qualifiants*<sup>4</sup> (*taux de variation de base* ou *background rate of variation*), un élément qui impacte de façon critique la puissance des études d'association (Guo et al., 2016). Il faut savoir que la puissance utile pour détecter un variant différentiellement représenté chez les cas et les contrôles va être différente pour chaque gène et en conséquence aussi pour chaque cohorte. En effet, certains gènes contiennent beaucoup de variants (soit parce qu'ils sont "particulièrement longs"<sup>5</sup>, soit parce qu'ils sont relativement tolérants aux mutations, soit pour des raisons d'hétérogénéité ethnique, ou encore pour certains gènes, dans certaines expériences, du fait d'erreurs techniques), d'autres peu. Ainsi, l'architecture génétique de référence varie selon la cohorte de contrôles examinée. Pour éviter les estimations et les erreurs, la puissance statistique d'une étude d'association sera plus valablement évaluée en réalisant des simulations au départ des données réelles de séquençage de l'expérience. Nous sommes désormais en mesure de calculer

---

<sup>4</sup> Par *variant qualifiant* on entend simplement dire les variants répondant aux critères (fréquence, biotype, ...) que l'investigateur choisit d'examiner.

<sup>5</sup> Ou du moins contiennent beaucoup de séquences exoniques dans le cas qui nous occupe. A titre d'exemple, dans une cohorte donnée, les taux de sujets contrôles porteurs d'au moins 1 variant non synonyme de fréquence allélique < 0.1%, soient des variants très rares, étaient encore de 0.2 et 0.4 respectivement pour les gènes MUC16 et TTN. Ces 2 derniers gènes comptent parmi les plus longs du génome humain (respectivement 304.813 et 132.498 pb). Leur examen amplifie considérablement les besoins en terme d'échantillons (Guo et al. Am J Hum Genet 2016).

la puissance statistique exacte de notre essai. Cette estimation est en cours (voir section 2.4.5 page 69).

Nous souhaitons réaliser de **nouvelles analyses SKAT** avec les adaptations suivantes:

- en appliquant une correction *FDR* moins stringente (10% au lieu de 5%),
- en nous limitant aux variants dont la fréquence allélique est inférieure à 0,005 (soit un 1% des individus sont hétérozygotes). Limiter le nombre de variants investigués, et en conséquence aussi de gènes, permet de limiter le nombre des hypothèses multiples, ce qui est bénéfique pour la puissance de l'essai.

#### 4.4.4 *Comment poursuivre l'étude de la génomique des patients tolérants? - Possibles nouvelles investigations*

Nos résultats négatifs doivent nous pousser à rechercher des **causes génétiques plus complexes**, telles que: une hérédité monogénique hétérogène; une hérédité di-ou oligogénique; des variants structurels ou enfin, des variants somatiques. Pour ce faire, nous indiquons ci-dessous les directions qui, selon nous, devraient être prises.

- Nous pensons qu'il faut activement travailler à **élargir les consortiums actuels pour atteindre des masses critiques d'échantillons et de données cliniques** permettant de mener des études d'association de plus grande puissance. Ceci est particulièrement important pour espérer capturer une hérédité hétérogène car plus les causes monogéniques sont réparties sur de nombreux gènes, plus la taille requise des échantillons croît rapidement (Guo et al., 2016). Précisons, à cet égard, que nous avons récemment entamé des démarches pour participer à un consortium international intéressé par la néphro-génétique appliquée à la transplantation <http://igenetrain.org/>.

Par ailleurs, plusieurs auteurs, ont mis en **relation tolérance et longévité des greffons** (Brouard et al., 2012; Massart et al., 2016; Scandling et al., 2015; Starzl et al., 2004): nous pensons que des cohortes de ce type (par exemple survie du greffon > 30 ans) doivent être constituées et étudiées (transcriptomique, génétique) conjointement aux tolérants et à des patients appariés pour l'âge afin de déterminer si ces patients sont semblables et ne pourraient pas utilement gonfler les cohortes de patients tolérants.

- Concernant les **contrôles**: deux *designs* sont possibles: soit les patients tolérants sont comparés à des sujets sains (*single extreme versus control design*) - leur nombre est à déterminer par simulation. Soit ils sont comparés à des contrôles présentant le phénotype opposé (*extreme phenotypes design*) en l'occurrence en rejet chronique: un tel groupe contrôle accentue le contraste entre les groupes, ce qui améliore la puissance (Emond et al., 2015a; Guey et al., 2011)<sup>6</sup>. En outre, c'est le seul groupe contrôle adapté si la prévalence de la prédisposition à la tolérance est en réalité très élevée. En l'absence de données définitives à ce sujet, nous suggérons d'utiliser deux cohortes de sujets contrôles, les uns sains, les autres en rejet chronique sur base d'hypothèses statistiques. Les contrôles doivent dans tous les cas être ethniquement semblables aux cas (dans leur majorité).

- Au niveau technique, nous recommandons de séquencer l'ADN par **whole genome sequencing** (*WGS*) afin d'améliorer la capture de l'exome. Pour des coûts de plus en plus abordables (un génome coûte 1,5 à 2 fois le prix d'un exome) le séquençage génome entier peut-être réalisé en lieu et place du séquençage d'exome, la capture bioinformatique de l'exome remplaçant alors la capture physique. Le séquençage du génome entier offre de nombreux avantages sur le séquençage de l'exome: le premier produit moins d'erreurs de séquençage; a une sensibilité accrue pour les *SNVs* (Belkadi et al., 2015); assure une meilleure couverture des régions codantes<sup>7</sup> (Lelieveld et al., 2015); et enfin, assure un séquençage du génome très uniforme, ce qui permet dès aujourd'hui des applications telles que la détection des variants structurels impliquant une perte ou un gain de matériel génétique (les *CNVs* pour *copy number variants*) ou encore l'identification de variants somatiques (Lelieveld et al., 2015; Meienberg et al., 2016). Le *WGS* identifie également les variants non codants. Certains ont une pénétrance élevée. Ils sont encore mal connus, mais notre cohorte mais notre cohorte pourrait être revisitée avec le temps. De plus, les variants fréquents étudiés dans les *GWAS* sont généralement non codants et sont identifiés par le *WGS*.

---

<sup>6</sup> A entendre par rapport à une comparaison sans extrêmes phénotypiques. Car, par ailleurs, la puissance d'une comparaison de type *single extreme versus control* peut, si les contrôles sont suffisamment nombreux, dépasser celle d'une comparaison de type *extreme phenotypes design* avec de petits effectifs. Autrement dit, à nombres inégaux, la comparaison des extrêmes n'est pas systématiquement la plus puissante (Emond et al. PloS Genet 2015).

<sup>7</sup> La comparaison entre le *WES* et *WGS* est basée sur des profondeurs de séquençage respectives de 95 à 160x et 87x.

- Nous pensons que l'ensemble des échantillons des cas et des contrôles doivent être séquencés sur un **séquenceur unique (type et place)**, si possible simultanément afin de limiter au minimum les *effets de lots* (Goh et al., 2017). Autrement dit, les cohortes doivent être entièrement constituées avant la réalisation des analyses.

- Les résultats éventuels doivent faire l'objet **d'une validation dans une cohorte externe et par permutations des phénotypes**. Les variants pertinents ne sauraient être retrouvés dans plus de 5% des tests pratiqués au hasard de l'identité des sujets. In fine, les variants pertinents doivent faire l'objet d'une validation mécanistique explorant leur retentissement fonctionnel dans des modèles cellulaires ou sur de petits animaux.

- **Les ADN des donneurs doivent être autant que possible**. Comme nous l'avons dit en introduction (**Figure 2**); si plusieurs propriétés des receveurs modulent, à l'évidence, l'alloimmunité, les interactions greffon-hôte y occupent bien sûr toujours une place de premier plan. Il semble admis qu'un bon appariement HLA facilite la tolérance (Rodriguez et al., 2004; Zoller et al., 1980), on en sait pourtant encore très peu **sur le type, l'appariement et les propriétés de molécules HLA impliquées** dans la tolérance. A côté des antigènes traditionnels de transplantation que sont les molécules HLA, il est de plus en plus évident qu'un certain nombre de protéines polymorphes, charriées par le greffon lors de la transplantation sous une forme inconnue du receveur, entrent dans la formation **d'antigènes de transplantation non-HLA** et concourent au développement de la réponse inflammatoire (Delville et al., 2019; Mesnard et al., 2016; Pineda et al., 2017; Steers et al., 2019). A terme, les interactions rein-hôte impliquant des motifs moléculaires non-HLA devront également être étudiées chez les patients tolérants; il est possible que certains appariements soient rédhibitoires et empêchent toute tolérance de se produire ou qu'au contraire d'autres la facilitent. Compte-tenu de la rareté des patients tolérants, il faut dès aujourd'hui collecter dans des biobanques les échantillons qui serviront à répondre à nos questions demain. Le projet TOMOGRAM a été d'emblée conçu dans cette optique.

- Outre les études génétiques, **les études transcriptomiques et épigénétiques**, en particulier celles recherchant des biomarqueurs de la tolérance doivent absolument être poursuivies en parallèle. Si les études pangénomiques ont le potentiel d'identifier des mécanismes causaux plus sûrement que les études transcriptomiques, ces dernières seront

sans doute d'un plus grand secours pour capturer l'état changeant de la tolérance au greffon. Lesquels biomarqueurs, si cruellement manquants aujourd'hui, sont indispensables au développement de protocoles de minimisation. En outre, compte-tenu du fait que la tolérance est un état métastable, il est également nécessaire d'obtenir des biomarqueurs annonçant l'érosion de la tolérance et indiquant qu'une intervention est nécessaire avant un rejet irrémédiable, un peu comme on le ferait pour une vaccination. Nous signalons que le consortium TOMOGRAM que nous avons mis sur pieds a déjà généré 2 autres *working packages* destinés à investiguer les ARN messagers (PI Prof. O. Viklicky, Prague, CZ) et les microRNAs rencontrés dans la tolérance (PI Prof. K. Ledeganck, and Prof. Claas, Anvers, BE) par le biais de méthodes de séquençage à haut débit non biaisées.

#### 4.4.5 Conclusion générale

La transplantation s'accompagne presque systématiquement de complications plus ou moins graves. Les immunosuppresseurs utilisés aujourd'hui sont la cause directe de diabète post-greffe, d'hypertension artérielle, d'athérosclérose, de sepsis, de diarrhée, de nécroses osseuses, de lymphoedèmes, d'infections opportunistes, d'insuffisance rénale aiguë ou chronique, de néoplasies: la liste est longue... En outre, au bout d'une médiane de 10 ans, les greffons usés par les phénomènes de rejet chronique ou la toxicité des médicaments anti-rejet doivent être remplacés. La perte d'un greffon rénal est synonyme de retour en dialyse chez la majorité des patients et la retransplantation est conditionnée par la disponibilité des organes, l'âge et la condition des patients. Il importe toujours d'améliorer la prise en charge des patients transplantés.

### **La tolérance est un enjeu majeur en transplantation**

Les premières observations de cohortes de patients tolérants laissent penser que la tolérance pourrait allonger radicalement la survie des greffons et des patients. Même si maîtriser la tolérance ne règlera pas tout<sup>8</sup>, la possibilité d'induire la tolérance au quotidien constituera une révolution épistémologique en transplantation, comme le fut l'avènement des transplantations elles-mêmes. Le présent ouvrage a décrit notre contribution à la

---

<sup>8</sup> Subsisteront entre autres, les lésions rénales induites par l'ischémie-reperfusion initiale ou encore les risques de récurrence de plusieurs maladies rénales sur le greffon.

progression de ce vaste chantier qui requiert des efforts internationaux et concertés. Plusieurs consortiums s'y attachent aux Etats-Unis et en Europe.

(<https://www.immunetolerance.org/>, <http://www.onestudy.org/>).

Notre travail ouvre la voie à de nouvelles études sur la génomique des patients tolérants. Il pose des bases qui devront être prises en compte lors de l'établissement de nouvelles hypothèses statistiques. De plus, nos échantillons conservés en biobanque (GENIRI, ULB) et pourront être réutilisés dans le cadre de futures études plus larges.

**"Rejet" ou "tolérance" constituent les seules réponses possibles de notre système immunitaire face à tout antigène;** qu'il provienne d'un greffon, du soi, d'une tumeur ou encore d'un allergène. Tout progrès dans la compréhension de la tolérance aux greffes ensemence d'autres disciplines et vice-et versa.

Plusieurs patients atteints de cancer bénéficient désormais *d'inhibiteurs de points de contrôle*, c'est-à-dire des molécules capables d'inhiber les signaux tolérogènes transmis par les cellules tumorales aux lymphocytes T et de "réveiller" les cellules quiescentes. Il est question d'antagonistes du CTLA4 (voir rubrique 1.2.5, page 16 - tolérance périphérique) et de PD-1 / PD-L1 (voir également en rubrique 1.2.5) qui en réduisant la tolérance aux antigènes des tumeurs, améliorent significativement la survie de patients atteints de différents types de cancers (Eggermont et al., 2018; Gandhi et al., 2018; Wolchok et al., 2017). Ces résultats sont encourageants et démontrent que la réponse aux antigènes n'est pas donnée pour toujours et qu'elle est potentiellement modifiable .





## LISTE DES ABREVIATIONS

Remarque: les noms de substances, gènes, protéines ainsi que les noms de fichiers informatiques sont exclusivement signalés au moment de leur première apparition.

<i>ABMR</i>	<i>Antibody-mediated rejection</i>
<i>aSKAT-O</i>	<i>Sequence kernel association test, optimisé et ajusté pour les petits échantillons</i>
<i>C4d</i>	<i>Fraction 4d du système du complément</i>
<i>CADD score</i>	<i>Combined annotation-dependent depletion score</i>
<i>CTL</i>	<i>Lymphocyte cytotoxique</i>
<i>FDR</i>	<i>False discovery rate</i>
<i>GWAS</i>	<i>Genome-wide association study</i>
<i>HLA</i>	<i>Human leukocyte antigen</i>
<i>IC à 95%</i>	<i>Intervalle de confiance à 95%</i>
<i>InDel</i>	<i>Courte insertion ou délétion</i>
<i>NK</i>	<i>Cellule natural killer</i>
<i>NST</i>	<i>Nombre de sujets à taiter</i>
<i>pb</i>	<i>Paire de bases</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PRA</i>	<i>Panel reactive antibody</i>
<i>pmp</i>	<i>par million de population</i>
<i>SKAT</i>	<i>Sequence kernel association test</i>
<i>SKAT-O</i>	<i>Sequence kernel association test, optimisé</i>
<i>SNP</i>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>SNV</i>	<i>Single nucleotide variant</i>
<i>TCMR</i>	<i>T cell-mediated rejection</i>
<i>TCR</i>	<i>T cell receptor</i>
<i>Treg</i>	<i>Lymphocyte T régulateur</i>
<i>WES</i>	<i>Whole Exome Sequencing</i>
<i>WGS</i>	<i>Whole Genome Sequencing</i>

## BIBLIOGRAPHIE

Abbas, K.A.L., A.H.; Pillai, S.; Masson, P. L. (2016). Les Bases de l'Immunologie Fondamentale et Clinique, Traduction de la 5ème édition. edn.

Agrawal, P.B., Wang, R., Li, H.L., Schmitz-Abe, K., Simone-Roach, C., Chen, J., Shi, J., Louie, T., Sheng, S., Towne, M.C., *et al.* (2017). Epithelial Sodium Channel ENaC is a Modifier of the Long Term Non-progressive Phenotype Associated with F508del CFTR Mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol.*

Alegre, M.L., Lakkis, F.G., and Morelli, A.E. (2016). Antigen Presentation in Transplantation. *Trends Immunol* 37, 831-843.

Almoguera, B., Shaked, A., and Keating, B.J. (2014). Transplantation genetics: current status and prospects. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14, 764-778.

Andreola, G., Chittenden, M., Shaffer, J., Cosimi, A.B., Kawai, T., Cotter, P., Locascio, S.A., Morokata, T., Dey, B.R., Tolkoff-Rubin, N.T., *et al.* (2011). Mechanisms of donor-specific tolerance in recipients of haploidentical combined bone marrow/kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11, 1236-1247.

Anglicheau, D., Muthukumar, T., and Suthanthiran, M. (2010). MicroRNAs: small RNAs with big effects. *Transplantation* 90, 105-112.

Bao, R., Huang, L., Andrade, J., Tan, W., Kibbe, W.A., Jiang, H., and Feng, G. (2014). Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer Inform* 13, 67-82.

Baron, D., Ramstein, G., Chesneau, M., Echasseriau, Y., Pallier, A., Paul, C., Degauque, N., Hernandez-Fuentes, M.P., Sanchez-Fueyo, A., Newell, K.A., *et al.* (2015). A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney international* 87, 984-995.

Belkadi, A., Bolze, A., Itan, Y., Cobat, A., Vincent, Q.B., Antipenko, A., Shang, L., Boisson, B., Casanova, J.L., and Abel, L. (2015). Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 5473-5478.

Benitez, C., Londono, M.C., Miquel, R., Manzia, T.M., Abraldes, J.G., Lozano, J.J., Martinez-Llordella, M., Lopez, M., Angelico, R., Bohne, F., *et al.* (2013). Prospective multicenter

clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology* 58, 1824-1835.

Benjamini, Y.H., Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289-300.

Botstein, D., and Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics* 33 *Suppl*, 228-237.

Bottomley, M.J., Chen, M., Fuggle, S., Harden, P.L., and Wood, K.J. (2016). Application of operational tolerance signatures are limited by variability and type of immunosuppression in renal transplant recipients: a cross-sectional study. *Transplantation Direct* 3.

Braza, F., Dugast, E., Panov, I., Paul, C., Vogt, K., Pallier, A., Chesneau, M., Baron, D., Guerif, P., Lei, H., *et al.* (2015). Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26, 1795-1805.

Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S.C., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., *et al.* (2007). Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15448-15453.

Brouard, S., Pallier, A., Renaudin, K., Foucher, Y., Danger, R., Devys, A., Cesbron, A., Guillot-Guegen, C., Ashton-Chess, J., Le Roux, S., *et al.* (2012). The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12, 3296-3307.

Brown, K.M., Kondeatis, E., Vaughan, R.W., Kon, S.P., Farmer, C.K., Taylor, J.D., He, X., Johnston, A., Horsfield, C., Janssen, B.J., *et al.* (2006). Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *The New England journal of medicine* 354, 2014-2023.

Cabral, A., da Silva Candido, D., Monteiro, S.M., Lemos, F., Saitovitch, D., Noronha, I.L., Alves, L.F., Geraldo, M.V., Kalil, J., Cunha-Neto, E., *et al.* (2019). Differential microRNA Profile in Operational Tolerance: A Potential Role in Favoring Cell Survival. *Frontiers in immunology* 10, 740.

Cacace, R., Slegers, K., and Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement* 12, 733-748.

Chaisson, M.J., Brinza, D., and Pevzner, P.A. (2009). De novo fragment assembly with short mate-paired reads: Does the read length matter? *Genome Res* 19, 336-346.

Chaudhury, S., Patel, T., Barber, I.S., Guetta-Baranes, T., Brookes, K.J., Chappell, S., Turton, J., Guerreiro, R., Bras, J., Hernandez, D., *et al.* (2017). Polygenic risk score in postmortem diagnosed sporadic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*.

Chenouard, A., Chesneau, M., Bui Nguyen, L., Le Bot, S., Cadoux, M., Dugast, E., Paul, C., Malard-Castagnet, S., Ville, S., Guerif, P., *et al.* (2017). Renal Operational Tolerance Is Associated With a Defect of Blood Tfh Cells That Exhibit Impaired B Cell Help. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 17, 1490-1501.

Chesneau, M., Michel, L., Dugast, E., Chenouard, A., Baron, D., Pallier, A., Durand, J., Braza, F., Guerif, P., Laplaud, D.A., *et al.* (2015). Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26, 2588-2598.

Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., Aubert-Wastiaux, H., *et al.* (2014). Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14, 144-155.

Choudhuri, K., and Dustin, M.L. (2010). Signaling microdomains in T cells. *FEBS letters* 584, 4823-4831.

Chronic Kidney Disease Prognosis, C., Matsushita, K., van der Velde, M., Astor, B.C., Woodward, M., Levey, A.S., de Jong, P.E., Coresh, J., and Gansevoort, R.T. (2010). Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 375, 2073-2081.

Cirulli, E.T., and Goldstein, D.B. (2010). Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet* 11, 415-425.

Cohen, J.C., Kiss, R.S., Pertsemlidis, A., Marcel, Y.L., McPherson, R., and Hobbs, H.H. (2004). Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 305, 869-872.

Couser, W.G., Remuzzi, G., Mendis, S., and Tonelli, M. (2011). The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney international* 80, 1258-1270.

Danger, R., Pallier, A., Giral, M., Martinez-Llordella, M., Lozano, J.J., Degauque, N., Sanchez-Fueyo, A., Soulillou, J.P., and Brouard, S. (2012a). Upregulation of miR-142-3p in

peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23, 597-606.

Danger, R., Sawitzki, B., and Brouard, S. (2016). Immune monitoring in renal transplantation: The search for biomarkers. *Eur J Immunol* 46, 2695-2704.

Danger, R., Thervet, E., Grisoni, M.L., Puig, P.L., Pallier, A., Tregouet, D., Lecorre, D., Giral, M., Legendre, C., Souillou, J.P., and Brouard, S. (2012b). PARVG gene polymorphism and operational renal allograft tolerance. *Transplantation proceedings* 44, 2845-2848.

de Jager, D.J., Vervloet, M.G., and Dekker, F.W. (2014). Noncardiovascular mortality in CKD: an epidemiological perspective. *Nature reviews. Nephrology* 10, 208-214.

Delville, M., Lamarthee, B., Pagie, S., See, S.B., Rabant, M., Burger, C., Gatault, P., Giral, M., Thauinat, O., Arzouk, N., *et al.* (2019). Early Acute Microvascular Kidney Transplant Rejection in the Absence of Anti-HLA Antibodies Is Associated with Preformed IgG Antibodies against Diverse Glomerular Endothelial Cell Antigens. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 30, 692-709.

Do, R., Stitzel, N.O., Won, H.H., Jorgensen, A.B., Duga, S., Angelica Merlini, P., Kiezun, A., Farrall, M., Goel, A., Zuk, O., *et al.* (2015). Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature* 518, 102-106.

Ducroux, E., Martin, C., Bouwes Bavinck, J.N., Decullier, E., Brocard, A., Westhuis-van Elsacker, M.E., Lebbe, C., Frances, C., Morelon, E., Legendre, C., *et al.* (2017). Risk of Aggressive Skin Cancers After Kidney Retransplantation in Patients With Previous Posttransplant Cutaneous Squamous Cell Carcinomas: A Retrospective Study of 53 Cases. *Transplantation* 101, e133-e141.

Dugast, E., David, G., Oger, R., Danger, R., Judor, J.P., Gagne, K., Chesneau, M., Degauque, N., Souillou, J.P., Paul, P., *et al.* (2017). Broad Impairment of Natural Killer Cells from Operationally Tolerant Kidney Transplanted Patients. *Frontiers in immunology* 8, 1721.

Eggermont, A.M.M., Blank, C.U., Mandala, M., Long, G.V., Atkinson, V., Dalle, S., Haydon, A., Lichinitser, M., Khatkhat, A., Carlino, M.S., *et al.* (2018). Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *The New England journal of medicine* 378, 1789-1801.

Eggers, P.W. (2011). Has the incidence of end-stage renal disease in the USA and other countries stabilized? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20, 241-245.

El-Zoghby, Z.M., Stegall, M.D., Lager, D.J., Kremers, W.K., Amer, H., Gloor, J.M., and Cosio, F.G. (2009). Identifying specific causes of kidney allograft loss. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, 527-535.

Emond, M.J., Louie, T., Emerson, J., Chong, J.X., Mathias, R.A., Knowles, M.R., Rieder, M.J., Tabor, H.K., Nickerson, D.A., Barnes, K.C., *et al.* (2015a). Correction: Exome Sequencing of Phenotypic Extremes Identifies CAV2 and TMC6 as Interacting Modifiers of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis. *PLoS Genet* 11, e1005424.

Emond, M.J., Louie, T., Emerson, J., Chong, J.X., Mathias, R.A., Knowles, M.R., Rieder, M.J., Tabor, H.K., Nickerson, D.A., Barnes, K.C., *et al.* (2015b). Exome Sequencing of Phenotypic Extremes Identifies CAV2 and TMC6 as Interacting Modifiers of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis. *PLoS Genet* 11, e1005273.

Emond, M.J., Louie, T., Emerson, J., Zhao, W., Mathias, R.A., Knowles, M.R., Wright, F.A., Rieder, M.J., Tabor, H.K., Nickerson, D.A., *et al.* (2012). Exome sequencing of extreme phenotypes identifies DCTN4 as a modifier of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Nature genetics* 44, 886-889.

Gandhi, L., Rodriguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M.J., Powell, S.F., *et al.* (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* 378, 2078-2092.

Gao, L., Emond, M.J., Louie, T., Cheadle, C., Berger, A.E., Rafaels, N., Vergara, C., Kim, Y., Taub, M.A., Ruczinski, I., *et al.* (2016). Identification of Rare Variants in ATP8B4 as a Risk Factor for Systemic Sclerosis by Whole-Exome Sequencing. *Arthritis Rheumatol* 68, 191-200.

Gaynor, J.J., Ciancio, G., Guerra, G., Sageshima, J., Hanson, L., Roth, D., Chen, L., Kupin, W., Mattiazzi, A., Tueros, L., *et al.* (2014). Graft failure due to noncompliance among 628 kidney transplant recipients with long-term follow-up: a single-center observational study. *Transplantation* 97, 925-933.

Genomes Project, C., Abecasis, G.R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Gibbs, R.A., Hurles, M.E., and McVean, G.A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061-1073.

Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H.G., and Veltman, J.A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European journal of human genetics : EJHG* 20, 490-497.

Go, A.S., Chertow, G.M., Fan, D., McCulloch, C.E., and Hsu, C.Y. (2004). Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine* 351, 1296-1305.

Goh, W.W.B., Wang, W., and Wong, L. (2017). Why Batch Effects Matter in Omics Data, and How to Avoid Them. *Trends Biotechnol* 35, 498-507.

Goldfarb-Rumyantzev, A.S., and Naiman, N. (2010). Genetic predictors of acute renal transplant rejection. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 25, 1039-1047.

Goldfarb-Rumyantzev, A.S., Shihab, F., Emerson, L., Mineau, G., Schaefer, C., Tang, H., Hunter, C., Naiman, N., Smith, L., and Kerber, R. (2009). A population-based assessment of the familial component of acute kidney allograft rejection. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24, 2575-2583.

Gondos, A., Dohler, B., Brenner, H., and Opelz, G. (2013). Kidney graft survival in Europe and the United States: strikingly different long-term outcomes. *Transplantation* 95, 267-274.

Guey, L.T., Kravic, J., Melander, O., Burt, N.P., Laramie, J.M., Lyssenko, V., Jonsson, A., Lindholm, E., Tuomi, T., Isomaa, B., *et al.* (2011). Power in the phenotypic extremes: a simulation study of power in discovery and replication of rare variants. *Genetic epidemiology* 35, 236-246.

Guo, M.H., Dauber, A., Lippincott, M.F., Chan, Y.M., Salem, R.M., and Hirschhorn, J.N. (2016). Determinants of Power in Gene-Based Burden Testing for Monogenic Disorders. *American journal of human genetics* 99, 527-539.

Haas, M., Sis, B., Racusen, L.C., Solez, K., Glotz, D., Colvin, R.B., Castro, M.C., David, D.S., David-Neto, E., Bagnasco, S.M., *et al.* (2014). Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14, 272-283.

Hariharan, S., Johnson, C.P., Bresnahan, B.A., Taranto, S.E., McIntosh, M.J., and Stablein, D. (2000). Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *The New England journal of medicine* 342, 605-612.

Heaphy, E.L., Poggio, E.D., Flechner, S.M., Goldfarb, D.A., Askar, M., Fatica, R., Srinivas, T.R., and Schold, J.D. (2014). Risk factors for retransplant kidney recipients: relisting and outcomes from patients' primary transplant. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14, 1356-1367.

Hodges, E., Xuan, Z., Balija, V., Kramer, M., Molla, M.N., Smith, S.W., Middle, C.M., Rodesch, M.J., Albert, T.J., Hannon, G.J., and McCombie, W.R. (2007). Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nature genetics* 39, 1522-1527.

Hricik, D.E., Formica, R.N., Nickerson, P., Rush, D., Fairchild, R.L., Poggio, E.D., Gibson, I.W., Wiebe, C., Tinckam, K., Bunnapradist, S., *et al.* (2015). Adverse Outcomes of Tacrolimus

Withdrawal in Immune-Quiescent Kidney Transplant Recipients. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 26, 3114-3122.

Illumina, I. (2011). Understanding Illumina Quality Scores. (Illumina, Inc.).

Illumina, I. (2014). Understanding Illumina Quality Scores. (Illumina, Inc.).

Illumina, I. (2017). Calculating Percent Passing Filter for Patterned and Nonpatterned Flow Cells. (Illumina, Inc.).

Ionita-Laza, I., Lee, S., Makarov, V., Buxbaum, J.D., and Lin, X. (2013). Sequence kernel association tests for the combined effect of rare and common variants. *American journal of human genetics* 92, 841-853.

Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., Saran, R., Wang, A.Y., and Yang, C.W. (2013). Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 382, 260-272.

Johansen, C.T., Wang, J., Lanktree, M.B., Cao, H., McIntyre, A.D., Ban, M.R., Martins, R.A., Kennedy, B.A., Hassell, R.G., Visser, M.E., *et al.* (2010). Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. *Nature genetics* 42, 684-687.

Kawai, T., Cosimi, A.B., Spitzer, T.R., Tolckoff-Rubin, N., Suthanthiran, M., Saidman, S.L., Shaffer, J., Preffer, F.I., Ding, R., Sharma, V., *et al.* (2008). HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *The New England journal of medicine* 358, 353-361.

Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O'Roak, B.J., Cooper, G.M., and Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature genetics* 46, 310-315.

Lamb, K.E., Lodhi, S., and Meier-Kriesche, H.U. (2011). Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11, 450-462.

Laupacis, A., Keown, P., Pus, N., Krueger, H., Ferguson, B., Wong, C., and Muirhead, N. (1996). A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney international* 50, 235-242.

Lee, P.W., Hanekamp, J.S., Villani, V., Vagefi, P.A., Cina, R.A., Kamano, C., O'Malley, P.E., Arn, S., Yamada, K., and Sachs, D.H. (2014). Evidence for a gene controlling the induction of transplantation tolerance. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 14, 952-959.



Lee, S., Emond, M.J., Bamshad, M.J., Barnes, K.C., Rieder, M.J., Nickerson, D.A., Team, N.G.E.S.P.-E.L.P., Christiani, D.C., Wurfel, M.M., and Lin, X. (2012). Optimal unified approach for rare-variant association testing with application to small-sample case-control whole-exome sequencing studies. *American journal of human genetics* 91, 224-237.

Lelieveld, S.H., Spielmann, M., Mundlos, S., Veltman, J.A., and Gilissen, C. (2015). Comparison of Exome and Genome Sequencing Technologies for the Complete Capture of Protein-Coding Regions. *Hum Mutat* 36, 815-822.

Lerut, J., and Sanchez-Fueyo, A. (2006). An appraisal of tolerance in liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, 1774-1780.

Leventhal, J., Abecassis, M., Miller, J., Gallon, L., Ravindra, K., Tollerud, D.J., King, B., Elliott, M.J., Herzog, G., Herzog, R., and Ildstad, S.T. (2012). Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. *Science translational medicine* 4, 124ra128.

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760.

Li, H., Ruan, J., and Durbin, R. (2008). Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res* 18, 1851-1858.

London, C.A., Lodge, M.P., and Abbas, A.K. (2000). Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *J Immunol* 164, 265-272.

Mackelprang, R.D., Bamshad, M.J., Chong, J.X., Hou, X., Buckingham, K.J., Shively, K., deBruyn, G., Mugo, N.R., Mullins, J.I., McElrath, M.J., *et al.* (2017). Whole genome sequencing of extreme phenotypes identifies variants in CD101 and UBE2V1 associated with increased risk of sexually acquired HIV-1. *PLoS Pathog* 13, e1006703.

Magee, J.C., Barr, M.L., Basadonna, G.P., Johnson, M.R., Mahadevan, S., McBride, M.A., Schaubel, D.E., and Leichtman, A.B. (2007). Repeat organ transplantation in the United States, 1996-2005. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, 1424-1433.

Manolio, T.A. (2010). Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *The New England journal of medicine* 363, 166-176.

Massart, A., Ghisdal, L., Abramowicz, M., and Abramowicz, D. (2017). Operational tolerance in kidney transplantation and associated biomarkers. *Clin Exp Immunol* 189, 138-157.

Massart, A., Pallier, A., Pascual, J., Viklicky, O., Budde, K., Spasovski, G., Klinger, M., Sever, M.S., Sorensen, S.S., Hadaya, K., *et al.* (2016). The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 31, 1002-1013.

Matas, A.J., Gillingham, K.J., Humar, A., Kandaswamy, R., Sutherland, D.E., Payne, W.D., Dunn, T.B., and Najarian, J.S. (2008). 2202 kidney transplant recipients with 10 years of graft function: what happens next? *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, 2410-2419.

Mauri, C., and Ehrenstein, M.R. (2008). The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol* 29, 34-40.

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., and DePristo, M.A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20, 1297-1303.

McLaren, C.E., Emond, M.J., Subramaniam, V.N., Phatak, P.D., Barton, J.C., Adams, P.C., Goh, J.B., McDonald, C.J., Powell, L.W., Gurrin, L.C., *et al.* (2015). Exome sequencing in HFE C282Y homozygous men with extreme phenotypes identifies a GNPAT variant associated with severe iron overload. *Hepatology* 62, 429-439.

McPherson, J.D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R.H., Chinwalla, A., Wallis, J., Sekhon, M., Wylie, K., Mardis, E.R., Wilson, R.K., *et al.* (2001). A physical map of the human genome. *Nature* 409, 934-941.

Meienberg, J., Bruggmann, R., Oexle, K., and Matyas, G. (2016). Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet* 135, 359-362.

Meier-Kriesche, H.U., Schold, J.D., and Kaplan, B. (2004). Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, 1289-1295.

Mesnard, L., Muthukumar, T., Burbach, M., Li, C., Shang, H., Dadhania, D., Lee, J.R., Sharma, V.K., Xiang, J., Suberbielle, C., *et al.* (2016). Exome Sequencing and Prediction of Long-Term Kidney Allograft Function. *PLoS Comput Biol* 12, e1005088.

Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11, 31-46.

Miller, M.L., Chong, A.S., and Alegre, M.L. (2017). Fifty Shades of Tolerance: Beyond a Binary Tolerant/Non-Tolerant Paradigm. *Curr Transplant Rep* 4, 262-269.

Mills, K.T., Xu, Y., Zhang, W., Bundy, J.D., Chen, C.S., Kelly, T.N., Chen, J., and He, J. (2015). A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney international* 88, 950-957.

Morange, M. (2003). *Biologie: une causalité éclatée*, Presses Universitaires de France edn (Paris).

Morris, H., DeWolf, S., Robins, H., Sprangers, B., LoCascio, S.A., Shonts, B.A., Kawai, T., Wong, W., Yang, S., Zuber, J., *et al.* (2015). Tracking donor-reactive T cells: Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. *Science translational medicine* 7, 272ra210.

Muzzey, D., Evans, E.A., and Lieber, C. (2015). Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep* 3, 158-165.

Nankivell, B.J., and Alexander, S.I. (2010). Rejection of the kidney allograft. *The New England journal of medicine* 363, 1451-1462.

Newell, K.A. (2011). Clinical transplantation tolerance. *Seminars in immunopathology* 33, 91-104.

Newell, K.A., Asare, A., Kirk, A.D., Gisler, T.D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W.J., Marks, W.H., Sanz, I., Lechler, R.I., *et al.* (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *The Journal of clinical investigation* 120, 1836-1847.

Ng, S.B., Turner, E.H., Robertson, P.D., Flygare, S.D., Bigam, A.W., Lee, C., Shaffer, T., Wong, M., Bhattacharjee, A., Eichler, E.E., *et al.* (2009). Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461, 272-276.

Nielsen, R., Paul, J.S., Albrechtsen, A., and Song, Y.S. (2011). Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet* 12, 443-451.

Obenchain, V., Lawrence, M., Carey, V., Gogarten, S., Shannon, P., and Morgan, M. (2014). VariantAnnotation: a Bioconductor package for exploration and annotation of genetic variants. *Bioinformatics* 30, 2076-2078.

Ogutmen, B., Yildirim, A., Sever, M.S., Bozfakioglu, S., Ataman, R., Erek, E., Cetin, O., and Emel, A. (2006). Health-related quality of life after kidney transplantation in comparison intermittent hemodialysis, peritoneal dialysis, and normal controls. *Transplantation proceedings* 38, 419-421.

Ooms, L.S., Roodnat, J.I., Dor, F.J., Tran, T.C., Kimenai, H.J., Ijzermans, J.N., and Terkivatan, T. (2015). Kidney retransplantation in the ipsilateral iliac fossa: a surgical challenge. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 15, 2947-2954.

Oura, T., Cosimi, A.B., and Kawai, T. (2017). Chimerism-based tolerance in organ transplantation: preclinical and clinical studies. *Clin Exp Immunol* 189, 190-196.

Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racape, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., Pettre, S., Lozano, J.J., *et al.* (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney international* 78, 503-513.

Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N., and Cosimi, A.B. (2002). Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *The New England journal of medicine* 346, 580-590.

Pineda, S., Sigdel, T.K., Chen, J., Jackson, A.M., Sirota, M., and Sarwal, M.M. (2017). Novel Non-Histocompatibility Antigen Mismatched Variants Improve the Ability to Predict Antibody-Mediated Rejection Risk in Kidney Transplant. *Frontiers in immunology* 8, 1687.

Pippias, M., Kramer, A., Noordzij, M., Afentakis, N., Alonso de la Torre, R., Ambuhl, P.M., Aparicio Madre, M.I., Arribas Monzon, F., Asberg, A., Bonthuis, M., *et al.* (2017). The European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association Registry Annual Report 2014: a summary. *Clin Kidney J* 10, 154-169.

Rebollo-Mesa, I., Nova-Lamperti, E., Mobillo, P., Runglall, M., Christakoudi, S., Norris, S., Smallcombe, N., Kamra, Y., Hilton, R., Indices of Tolerance, E.U.C., *et al.* (2016). Biomarkers of Tolerance in Kidney Transplantation: Are We Predicting Tolerance or Response to Immunosuppressive Treatment? *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.

Rodriguez, D.S., Jankowska-Gan, E., Haynes, L.D., Levenson, G., Munoz, A., Heisey, D., Sollinger, H.W., and Burlingham, W.J. (2004). Immune regulation and graft survival in kidney transplant recipients are both enhanced by human leukocyte antigen matching. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, 537-543.

Roedder, S., Li, L., Alonso, M.N., Hsieh, S.C., Vu, M.T., Dai, H., Sigdel, T.K., Bostock, I., Macedo, C., Metes, D., *et al.* (2014). A Three-Gene Assay for Monitoring Immune Quiescence in Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*.

Roedder, S., Li, L., Alonso, M.N., Hsieh, S.C., Vu, M.T., Dai, H., Sigdel, T.K., Bostock, I., Macedo, C., Metes, D., *et al.* (2015). A Three-Gene Assay for Monitoring Immune Quiescence in

Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 26, 2042-2053.

Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 42, 607-612.

Roussey-Kesler, G., Giral, M., Moreau, A., Subra, J.F., Legendre, C., Noel, C., Pillebout, E., Brouard, S., and Souillou, J.P. (2006). Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, 736-746.

Sachs, D.H. (2003). Tolerance: of mice and men. *The Journal of clinical investigation* 111, 1819-1821.

Sarwal, M., Chua, M.S., Kambham, N., Hsieh, S.C., Satterwhite, T., Masek, M., and Salvatierra, O., Jr. (2003). Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *The New England journal of medicine* 349, 125-138.

Scandling, J.D., Busque, S., Dejbakhsh-Jones, S., Benike, C., Millan, M.T., Shizuru, J.A., Hoppe, R.T., Lowsky, R., Engleman, E.G., and Strober, S. (2008). Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 358, 362-368.

Scandling, J.D., Busque, S., Shizuru, J.A., Lowsky, R., Hoppe, R., Dejbakhsh-Jones, S., Jensen, K., Shori, A., Strober, J.A., Lavori, P., *et al.* (2015). Chimerism, graft survival, and withdrawal of immunosuppressive drugs in HLA matched and mismatched patients after living donor kidney and hematopoietic cell transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 15, 695-704.

Sellares, J., de Freitas, D.G., Mengel, M., Reeve, J., Einecke, G., Sis, B., Hidalgo, L.G., Famulski, K., Matas, A., and Halloran, P.F. (2012). Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12, 388-399.

Solez, K., Colvin, R.B., Racusen, L.C., Sis, B., Halloran, P.F., Birk, P.E., Campbell, P.M., Cascalho, M., Collins, A.B., Demetris, A.J., *et al.* (2007). Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, 518-526.

Starzl, T.E., Murase, N., Demetris, A.J., Trucco, M., Abu-Elmagd, K., Gray, E.A., Eghtesad, B., Shapiro, R., Marcos, A., and Fung, J.J. (2004). Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* 77, 926-929.

Steers, N.J., Li, Y., Drace, Z., D'Addario, J.A., Fischman, C., Liu, L., Xu, K., Na, Y.J., Neugut, Y.D., Zhang, J.Y., *et al.* (2019). Genomic Mismatch at LIMS1 Locus and Kidney Allograft Rejection. *The New England journal of medicine* 380, 1918-1928.

Takemoto, S.K., Pinsky, B.W., Schnitzler, M.A., Lentine, K.L., Willoughby, L.M., Burroughs, T.E., and Bunnapradist, S. (2007). A retrospective analysis of immunosuppression compliance, dose reduction and discontinuation in kidney transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, 2704-2711.

Van der Auwera, G.A., Carneiro, M.O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., *et al.* (2013). From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* 43, 11 10 11-33.

VanBuskirk, A.M., Burlingham, W.J., Jankowska-Gan, E., Chin, T., Kusaka, S., Geissler, F., Pelletier, R.P., and Orosz, C.G. (2000). Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *The Journal of clinical investigation* 106, 145-155.

Varaganam, M., Yaqoob, M.M., Dohler, B., and Opelz, G. (2009). C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *The New England journal of medicine* 360, 874-880.

Vlaminck, H., Maes, B., Evers, G., Verbeke, G., Lerut, E., Van Damme, B., and Vanrenterghem, Y. (2004). Prospective study on late consequences of subclinical non-compliance with immunosuppressive therapy in renal transplant patients. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, 1509-1513.

Walsh, P.T., Taylor, D.K., and Turka, L.A. (2004). Tregs and transplantation tolerance. *The Journal of clinical investigation* 114, 1398-1403.

Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research* 38, e164.

Whiteford, N., Haslam, N., Weber, G., Prugel-Bennett, A., Essex, J.W., Roach, P.L., Bradley, M., and Neylon, C. (2005). An analysis of the feasibility of short read sequencing. *Nucleic acids research* 33, e171.

Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F., *et al.* (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine* 377, 1345-1356.

Wolfe, R.A., Ashby, V.B., Milford, E.L., Ojo, A.O., Ettenger, R.E., Agodoa, L.Y., Held, P.J., and Port, F.K. (1999). Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis

awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *The New England journal of medicine* 341, 1725-1730.

Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nature reviews. Immunology* 12, 417-430.

Wu, M.C., Lee, S., Cai, T., Li, Y., Boehnke, M., and Lin, X. (2011). Rare-variant association testing for sequencing data with the sequence kernel association test. *American journal of human genetics* 89, 82-93.

Zhang, W., Yi, Z., Wei, C., Keung, K.L., Sun, Z., Xi, C., Woytovich, C., Farouk, S., Gallon, L., Menon, M.C., *et al.* (2019). Pretransplant transcriptomic signature in peripheral blood predicts early acute rejection. *JCI Insight* 4.

Zoller, K.M., Cho, S.I., Cohen, J.J., and Harrington, J.T. (1980). Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey. *Kidney international* 18, 110-114.





## TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> - Voies de transduction des signaux dans les lymphocytes T.....	11
<b>Figure 2</b> - Le rejet et la tolérance au croisement d'influences.....	26
<b>Figure 3</b> - Place des différentes méthodes d'exploration pangénomique .....	30
<b>Figure 4</b> - Bases générales du séquençage d'ADN: méthode Sanger et synthèse à haut débit selon ILLUMINA®.....	38
<b>Figure 5</b> - Description simplifiée du traitement bioinformatique des données de séquençage, exemples de programmes, fichiers standards.....	42
<b>Figure 6</b> - Principes de l'alignement et de la détection des variants .....	45
<b>Figure 7</b> - Filtration informatique des variants.....	82
<b>Figure 8</b> - Analyse en composantes principales de l'ensemble des variants.....	82
<b>Figure 9</b> - Organigramme de l'étude .....	83
<b>Figure 10</b> - Comparaison gène-par-gène des patients tolérants et des contrôles. ....	84
<b>Figure 11</b> - Evaluation de la capacité de chaque gène à prédire le phénotype indépendamment du séquenceur utilisé, au travers d'analyses <i>SKAT-O</i> croisées. ...	86
<b>Figure 12</b> - Différenciation des composantes principales en fonction du séquenceur....	88
<b>Figure 13</b> - Comparaison variant-par-variant des patients tolérants et des contrôles. 90	
<b>Figure 14</b> - Nombre moyen de variants chez les cas en fonction de la plateforme de séquençage et du biotype.....	94
<b>Figure 15</b> - Exemple de <i>loci</i> difficilement séquençables au niveau du gène <i>EPHA8</i> .....	95



## TABLE DES TABLES

<b>Tableau 1</b> - Modes de présentation et formation des antigènes de transplantation.....	9
<b>Tableau 2</b> - Principales médications administrées en pratique courante pour prévenir le rejet d'allogreffe et leurs mécanismes d'action.....	15
<b>Tableau 3</b> - Différentes stratégies ayant permis d'induire de la tolérance aux greffes dans des modèles murins et chez les grands primates. ....	20
<b>Tableau 4</b> - Particularités du phénotype "tolérance" et leurs conséquences méthodologiques .....	59
<b>Tableau 5</b> - Caractéristiques des patients tolérants enrôlés.....	63
<b>Tableau 6</b> - Distribution des génotypes par groupe de patients concernant les 3 gènes mis en évidence par le test <i>SKAT</i> à l'échelle des gènes. ....	87
<b>Tableau 7</b> - Synthèse des analyses <i>SKAT</i> gène-par-gène réalisées et des gènes initialement retenus. ....	89
<b>Tableau 8</b> - Synthèse des analyses <i>SKAT</i> variant-par-variant réalisées et des variants initialement retenus .....	92
<b>Tableau 9</b> - Synthèse énumérant les caractéristiques techniques des analyses <i>SKAT-O</i> déjà effectuées et à venir.....	97