

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Contribution à l'étude de la dysfonction chronique des greffons en allo- transplantation rénale

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline : Biologie-Medecine-Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Magali Giral

Le 03/07/2007

Devant le Jury ci-dessous

Président :

Rapporteurs : Pr. Eric Thervet
Pr. Emmanuel Morelon

Examineurs : Pr Dominique Durand
Dr Sophie Brouard

Directeur de thèse : Pr. Jean Paul Souillou

AVANT PROPOS.....	4
INTRODUCTION.....	6
A . LA DYSFONCTION CHRONIQUE DU GREFFON.....	8
I . La néphropathie chronique du transplant NCT (ou CAN pour Chronic Allograft Nephropathy).....	10
1. Anatomo-pathologie de la NCT	10
2. Pathogénie de la NCT	12
2.a. Histopathogénie de la NCT	14
2.a.1. Les lésions du donneur	14
2.a.2. La dégradation architecturale	14
2.a.3. La fibrose.....	15
2.a.4. Le vieillissement.....	15
2.a.5. La transition épithélio-mésenchymateuse	16
2.b. Histopathogénie du rejet chronique « vrai »	17
2.b.1. La vasculopathie.....	17
2.b.2. L'atteinte des capillaires.....	17
2.b.3. La glomérulopathie d'allogreffe.....	17
3. Physiopathogénie de la NCT et du rejet chronique «vrai».....	20
3.a. Les Causes immunologiques	20
3.a.1. Rejet aigu et infra-clinique	20
3.a.2. Le HLA matching	23
3.a.3. L'Immunsation HLA et non-HLA avant et après la greffe	25
3.a.3.2. L'Immunsation post greffe.....	28
3.a.3.3. Le Dépôt de C4d dans le greffon.....	28
3.a.3.4. L'Hypothèse du rôle de l'autoimmunité dans le Rejet chronique.....	31
3.a.4. La re-transplantation.....	31
3.a.5. L'implication des deux voies d'allorecognition dans la pathogénie de la NCT avec rejet chronique.....	32
3.a.5.1. L'Allorecognition indirecte	32
3.a.5.2. L'Allorecognition directe	32
3.a.6. L'implication de la fonction de régulation	33
3.a.7. La Non compliance / Sous immunosuppression	34
3.a.8. L'âge du donneur.....	35
3.a.9. L'âge du receveur	35
3.b. Les causes non immunologiques.....	37
3.b.1. La qualité du greffon	37
3.b.1. 1. Les lésions du donneur	39
3.b.1. 2. La mort encéphalique	41
3.b.2. Le DGF/Ischémie froide.....	42
3.b.3. L'Effet du sexe du donneur et du receveur	44
3.c. Les facteurs de progression	45
3.c.1. La protéinurie facteur de progression de la NCT	45
3.c.2. L'hypertension artérielle du receveur	47
3.c.3. La dyslipidémie	48
3.c.4. L'obésité	49
3.c.5. Le tabac	49
3.c.6. Le diabète	50

3.c.7. L'hyperparathyroïdie	51
3.c.8. L'inflammation chronique et le stress oxydatif	51
3.c.9. L'hyperfiltration	52
II. Les causes spécifiques de dysfonction chronique des greffons :	56
1. L'infections à BK virus	56
2. La toxicité aux inhibiteurs des calcineurines	56
3. La récurrence de la maladie initiale et la glomérulopathie de novo.....	56
5. Le reflux vésico-urétéral.	57
6. La pyélonéphrite aiguë	57
B. LA BASE DE DONNEES D.I.V.A.T. (DONNEES INFORMATISEES ET VALIDEES EN TRANSPLANTATION).....	58
1. Historique.....	58
2. Projets collaboratifs avec les partenaires du réseau :.....	59
3. Cellule de Biostatistique du réseau DIVAT.....	59
4. Production scientifique du réseau :	60
RESULTATS.....	62
A. IMPACTS DES ÉPISODES DE PYELONÉPHRITES SUR LA DYSFONCTION DES GREFFONS	66
ACUTE GRAFT PYELONEPHRITIS AND LONG-TERM KIDNEY ALLOGRAFT OUTCOME	66
B. RÔLE DE L'INADÉQUATION ENTRE LA MASSE DU GREFFON RÉNAL ET LA MASSE DU RECEVEUR	83
C RÔLE DES PARAMÈTRES DE RÉANIMATION DU DONNEUR EN ÉTAT DE MORT ENCÉPHALIQUE DANS LA REPRISE DE FONCTION DES GREFFONS RÉNAUX.	94
Gelatin other than HES >1250 ml	111
CONCLUSION.....	123
BIBLIOGRAPHIE	126
ANNEXE	140

Contribution à l'étude de la dysfonction chronique des greffons en allo- transplantation rénale

AVANT PROPOS

La transplantation rénale est le traitement de choix en cas d'insuffisance rénale chronique terminale. Elle améliore la mortalité et la morbidité des patients. Elle permet une réinsertion socio-professionnelle et une amélioration de la qualité de vie des patients. La survie des greffons s'est accrue considérablement durant ces vingt dernières années en majeure partie grâce à une meilleure efficacité et tolérance des traitements immunosuppresseurs, mais aussi grâce à une plus grande compréhension et attention données à tous les autres paramètres associés à la greffe. Il est maintenant assez clairement établi que la survie des greffons est corrélée autant à des facteurs dit « immunologiques » que « non immunologiques ».

L'objectif de ce travail porte sur la mise en évidence de facteurs dits « non immunologiques » de perte des greffons qui nous conduiront à discuter les mécanismes immunologiques et inflammatoires qui en découlent et qui mènent invariablement à la perte des greffons. Dans la première partie je me suis intéressée aux causes et conséquences des pyélonéphrites aiguës sur le rein greffé ouvrant la discussion sur le « signal de danger ». La deuxième partie porte sur l'effet de l'inadéquation entre la masse du greffon rénal et la masse du receveur sur la fonction précoce et le devenir à long terme des transplantations, permettant de discuter du rôle de l'hyperfiltration dans genèse de la glomérulosclérose et artériosclérose du greffon. Enfin, la troisième partie est une analyse sur les facteurs de risque de survenue d'un retard au démarrage des greffons, traduction clinique du syndrome d'ischémie reperfusion et plus particulièrement des paramètres liés au donneur en état de mort encéphalique et aux paramètres de réanimation.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La greffe est le transfert de cellules de tissus ou d'organes d'un individu chez un autre individu. Si le donneur reçoit son propre tissu, on parle d'isogreffe. Si le donneur et le receveur sont différents mais de la même espèce, il s'agit d'allogreffe. Enfin, la xéno greffe définit la greffe entre des espèces différentes.

En 1902, Emerich Ullmann, réalise à Vienne, la première transplantation expérimentale entre deux chiens. Rapidement suivie en 1906, de Mathieu Jaboulay, professeur en chirurgie à Lyon, qui utilisant la technique de son élève Alexis Carrel, réalise l'anastomose de vaisseaux de reins de mouton et de porc sur les vaisseaux du membre supérieur de deux patients insuffisants rénaux terminaux. Cependant, l'obstacle chirurgical rapidement surmonté, l'incompréhension des réactions de l'organisme du receveur contre un tissu étranger conduit à un moratoire d'un demi-siècle avant que le premier succès d'une greffe entre frère jumeau identique ne relance l'engouement pour la transplantation. La première greffe est réalisée avec succès à l'hôpital Peter Bent Brigham de Boston (USA) par John Merrill, Joseph Murray et Hartwell Harrison (1, 2) le 23 décembre 1954 et marque le début de l'ère moderne de la transplantation. Les premières transplantations réalisées sans aucune immunosuppression n'ont des survies que de quelques jours. L'irradiation corporelle totale (premier traitement immunosuppresseur utilisé) est rapidement abandonnée devant la « sur-léthalité » due aux infections secondaires à l'aplasie. C'est la mise en évidence de l'effet immunosuppresseur de la 6-mercaptopurine chez le chien et de son dérivé l'azathioprine, qui conduit à son utilisation comme premier traitement conventionnel rapidement associé aux corticostéroïdes en traitement d'entretien de la greffe. Finalement, les sérums de globulines anti lymphocytes, d'abord utilisés dans le traitement du rejet aigu, sont introduits en traitement d'induction des greffes à partir des années 80, date d'apparition de la cyclosporine qui marque une nouvelle ère de la transplantation (3, 4) (5). L'introduction de la cyclosporine dans le traitement d'entretien des greffes permet de faire passer le taux de survie des greffons à 1 an de 60 % à plus de 80% (cf figure 1) (6).

La greffe représente actuellement le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale (7). Depuis 1959 plus d'un demi million de patients ont été transplantés dans le monde (8). En France, en 2006, plus de 4000 greffes d'organe ont été réalisées dont 60% sont des greffes rénales. A Nantes, l'ITERT (Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation) enregistre une moyenne de 160 greffes rénales ou combinées rénales et pancréatiques depuis 2000 (figure 2).

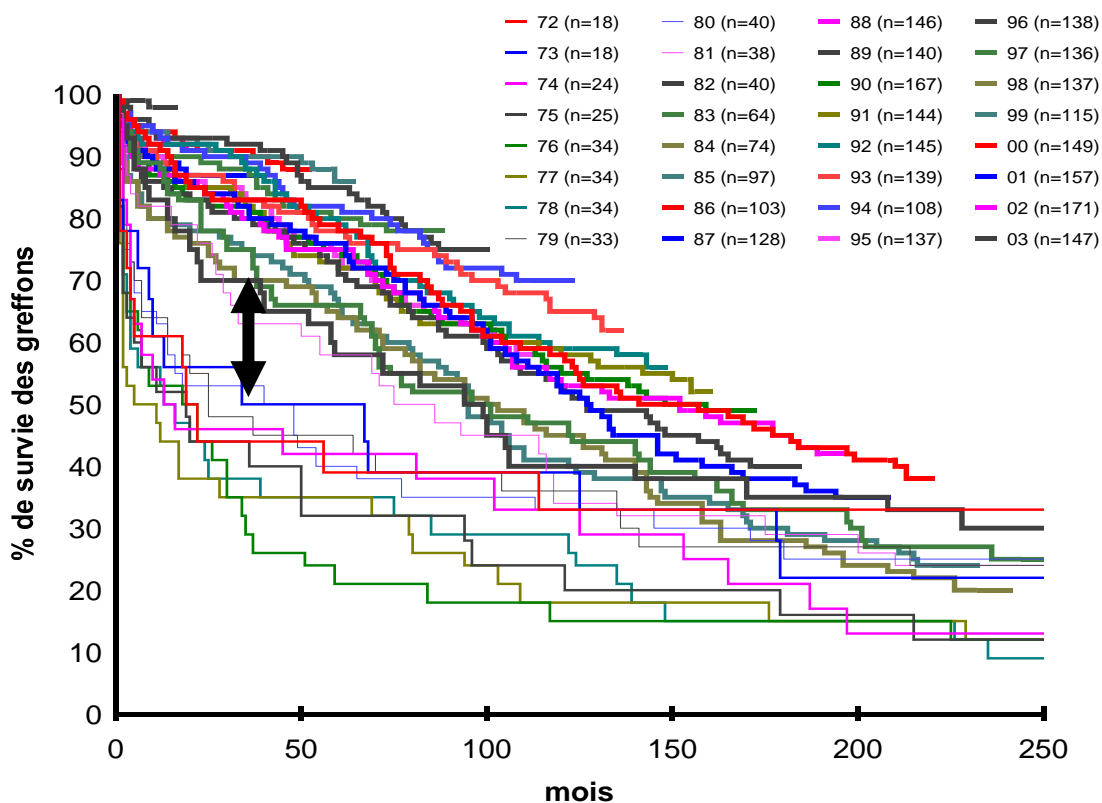


Figure 1 : Evolution des courbes de survie de Kaplan Meier par année de greffe depuis 1972 au CHU de Nantes

L'introduction de la cyclosporine dès 1981 a permis une augmentation de la survie des greffons à un an de 30 à 50% par rapport aux années antérieures. On observe par ailleurs une augmentation constante de la survie des greffons à 1 an jusqu' à nos jours. Cependant, la pente de décroissance des survies reste constante après 1 an quelques soit l 'année de greffe, témoin de la perte chronique des greffons. Ces données sont extraites de la base DIVAT de l'ITERT (Données Informatisées et Validées en transplantation)

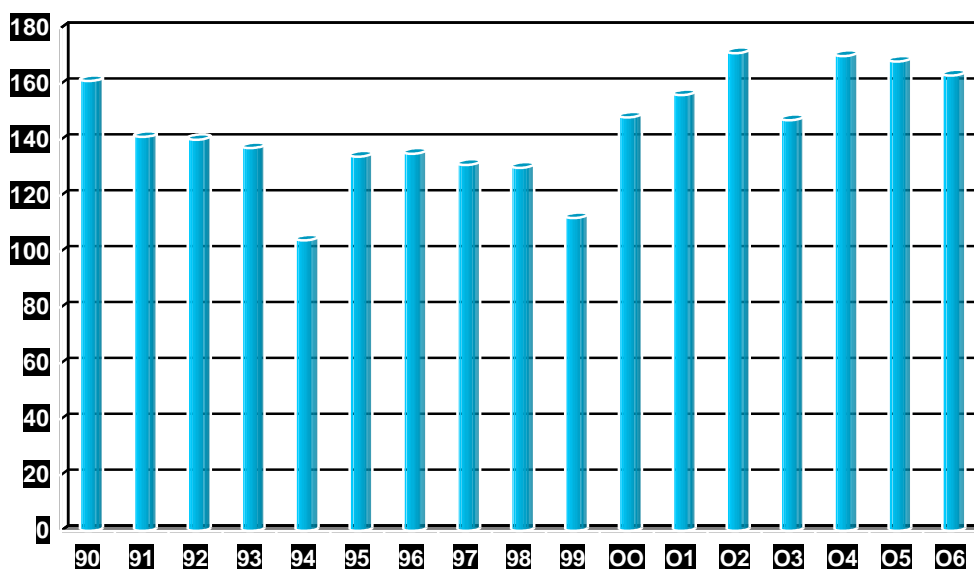


Figure 2 : Evolution du nombre de greffes à l'ITERT depuis 1990

A . La dysfonction chronique du greffon

L'incidence et la sévérité des épisodes de rejets aigus ont été considérablement réduites durant la dernière décade grâce à l'introduction de nouvelles thérapeutiques immunosuppressives (9, 10). Dans les années 80-90, une meilleure compréhension et prise en charge des facteurs de risques associés à la perte précoce des greffons permet d'augmenter significativement la survie des greffes à 1 an. En revanche, le taux de perte des greffons sur le long terme, regroupé sous les termes de « rejet chronique », ne suit pas la même tendance et est estimé entre 50 et 80 % des pertes de greffons en dehors du décès (11) (6).

La mention « rejet chronique » qui définissait la perte chronique des greffons est abandonnée au début des années 2000 et remplacée par la mention plus générale de « dysfonction chronique des greffons ». Après 1 an de greffe, environ 50% des greffons sont perdus par dysfonction chronique, tandis que les 50 % restants sont perdus par le décès du patient avec un rein fonctionnel. La dysfonction chronique ne correspond à aucune entité pathologique proprement dite, mais est un vaste « fourre tout » qui regroupe toutes les causes de perte des greffons en dehors du décès du patient. Il est cependant possible de définir à l'intérieur de la dysfonction chronique des entités plus précises dont la néphropathie chronique du transplant (NCT) (ou chronic allograft nephropathy, CAN pour les anglosaxons) qui est centrale et qui doit être réservée aux lésions histologiques clairement non spécifiques. Elle représente entre 30 à 40% des causes de perte des greffons et peut elle même être divisée en : 1) NCT à composante immunologique ou «rejet chronique vrai» et 2) NCTd'origine mixte. Les autres causes de dysfonction chronique en dehors de la NCT et qui s'imbrique lors du diagnostic histologique sont des causes spécifiques dont : 1) la toxicité aux anticalcineurines, 2) la récurrence de la maladie initiale (12), 3) l'apparition de maladie rénale de novo sur le greffon, 4) les infections du greffon par le BK virus (figure 3) (13). L'analyse histologique d'une série récente de greffons transplantés, montre que seulement 37% des biopsies présentent des lésions non spécifiques de fibrose tubulo interstitielle et d'atrophie tubulaire correspondant à la définition de la NCT (CAN). Les 63% restantes révèlent toutes un diagnostic spécifique de dysfonction chronique (14).

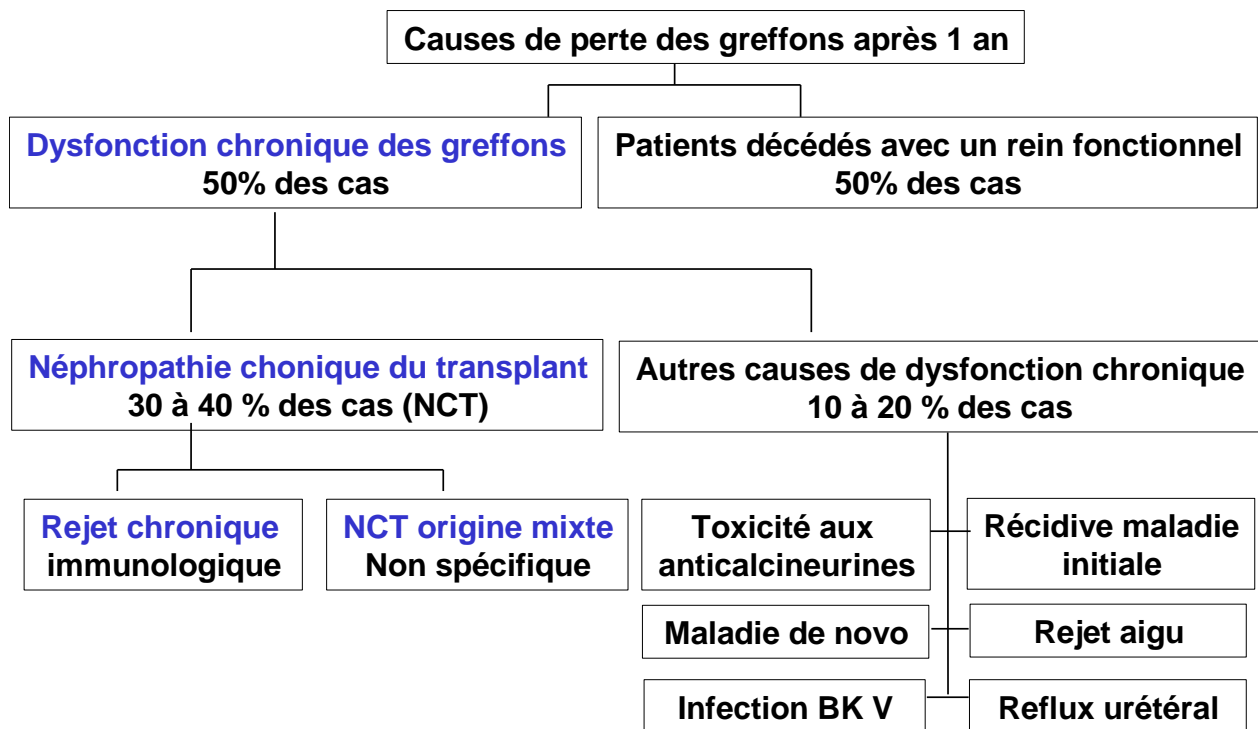


Figure 3 : Cause de dysfonction chronique du transplant (adapté de Pascual M, NEJM vol 346, page 581)

La dysfonction chronique des greffons représente 50 % des causes de perte des greffons et regroupe différentes entités dont la néphropathie chronique du transplant qui inclut le rejet chronique proprement dit de cause immunologique qui peut être démontré par la présence histologique de dépôts de C4d dans les capillaires péritubulaires et d'anticorps anti HLA dans le sérum et la néphropathie chronique aspécifique d'origine mixte.

I . La néphropathie chronique du transplant NCT (ou CAN pour Chronic Allograft Nephropathy)

La NCT est avant tout cliniquement définie par une dégradation progressive de la fonction rénale généralement associée à une protéinurie (15) et une hypertension artérielle survenant après un délai de 3 ou 6 mois en post greffe (16, 17). Elle représente la première cause de perte chronique du transplant, de 30 à 40%, et ce malgré l'amélioration très sensible de l'immunosuppression durant ces 20 dernières années. La NCT est histologiquement définie par l'apparition progressive de lésions non spécifiques : 1) fibrose interstitielle chronique, 2) atrophie tubulaire diffuse et est, souvent mais non obligatoirement, associée à 3) une endartérite fibreuse et 4) une glomérulosclérose (14), (18).

1. Anatomie-pathologique de la NCT

La NCT ou (CAN pour chronic allograft nephropathy) dans la classification de Banff 1997/2003 (18) (19) comprend deux types. Le *type a* correspond à la fibrose non spécifique et à l'atrophie tubulaire. Le *type b* est défini par le *type a* sur lequel se surajoutent des lésions évocatrices de médiation immune :

- 1) le dédoublement des membranes basales glomérulaires et l'augmentation de la matrice mésangiale définissant la glomérulopathie d'allogreffe,
- 2) l'atteinte vasculaire avec hyperplasie fibro-intimale des petites artéioles avec présence de cellules mononuclées dans l'intima et interruption de la limitante élastique interne. L'hyperplasie intimale artérielle touche l'ensemble des artères du greffon mais de façon discontinue. Cette prolifération myo-intimale concentrique est responsable au niveau des petites artères d'un aspect typique en bulbe d'oignon et entraîne des lésions ischémiques en aval. (figure 4).

En fonction du degré de l'atteinte parenchymateuse, 4 grades sont définis:

grade 0 : moins de 6% du cortex atteint,

grade I : de 6 à 25 %,

grade II : de 26 à 50%,

grade III : > 50%.

Lors de la dernière conférence (VIIIème) à Edmonton au Canada en juillet 2005, les experts réunis ont estimé que devant la dérive de l'utilisation du terme "CAN", non plus en temps que description histologique des lésions aspécifiques du greffon mais comme un "diagnostic" parfois erroné, il était souhaitable de supprimer cette terminologie de la

classification de Banff et de revenir au descriptif purement histologique des lésions de fibrose et d'atrophie tubulaire. De plus une part plus précise de la part humorale des mécanismes impliqués dans le "rejet chronique vrai ou actif" a été clarifiée en séparant les lésions chroniques avec médiation humorale associant fibrose et atrophie tubulaire (ci-ct, anciennement CAN), endartérite fibreuse (cv), glomérulopathie d'allogreffe (cg) et duplication des membranes basales des capillaires en microscopie électronique. La présence de C4 d+ sur plus de 50% des capillaires péri-tubulaires et / ou d'anticorps anti donneur spécifiques circulants définirait le rejet chronique actif humoral, tandis que la présence d'un infiltrat lymphocytaire intimal définirait le rejet chronique actif cellulaire T. La classification d'une glomérulopathie d'allogreffe sans présence de C4d, ni anticorps anti-donneur reste cependant flou dans cette nouvelle nomenclature. Par mesure de clarté et devant la nouveauté de la classification de Banff 05 (20), nous continuerons à utiliser dans la suite de l'exposé la terminologie de CAN (ou NCT) jusqu'alors employée dans la classification de Banff 03 (NCT)

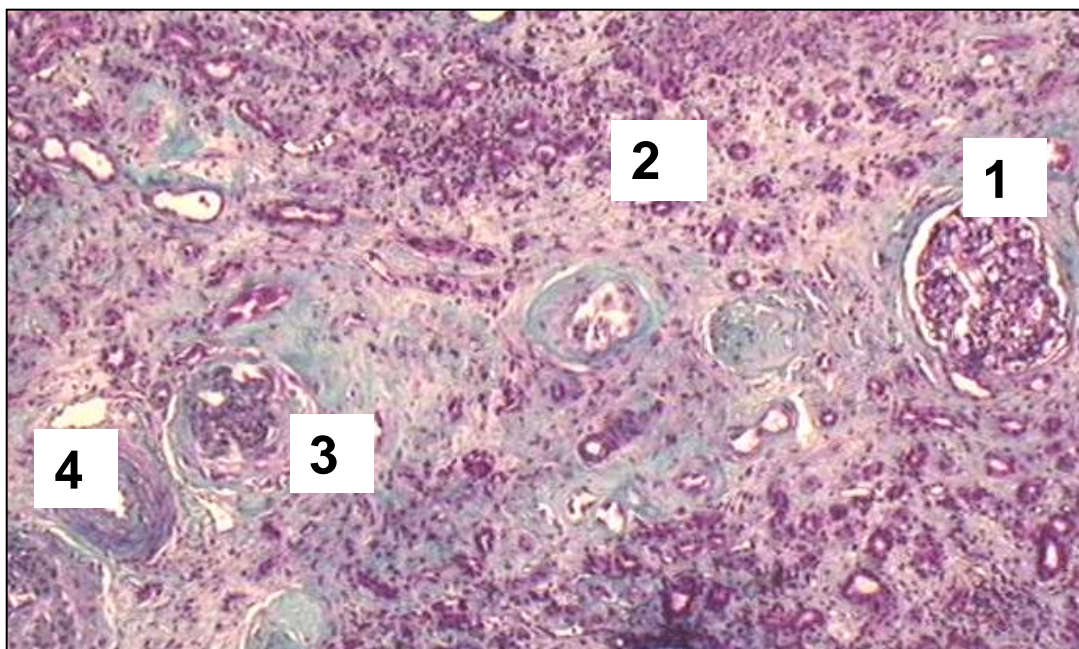


Figure 4 : Lésions s aspécifiques de Néphropathie chronique du transplant

Les lésions de NCT associent une atrophie tubulaire (1), une fibrose intertistielle (2), définissant la NCT type a associé ou non à une glomérulosclérose (3) et une endartérite oblitérative (4)

2. Pathogénie de la NCT

Les lésions de NCT peuvent être d'origines multiples et souvent intriquées. Elles sont la somme de lésions dues à des agressions diverses incluant la réponse alloimmune et les traitements. Le modèle le plus communément admis actuellement est celui où la NCT est le résultat d'une série d'agression dépendante du temps ayant pour conséquence la perte des néphrons et la perte de l'intégrité architecturale du greffon conduisant à la dysfonction chronique puis à l'insuffisance rénale terminale. La qualité du greffon et le syndrome d'ischémie reperfusion constituent les stress initiaux sur lesquels se surajoutent les agressions immunologiques et non immunologiques. Cette « histoire naturelle de la NCT » est décrite dans une étude récente de BJ Nankivell (21). Cette étude peut être critiquable car elle se déroule dans des conditions optimales, c'est à dire utilisant des donneurs et receveurs jeunes avec une courte ischémie froide et une bonne compliance au traitement. Ce type de population ne reflète pas la réalité de la majorité des transplantations actuelles qui s'adressent à des receveurs vieillissants recevant des reins de qualité limite. Cependant ce travail a le mérite d'éclaircir la probable genèse et chronologie de ces lésions de NCT. En effet l'étude porte sur 119 patients présentant un diabète de type I et greffés d'une greffe combinée rénale et pancréatique entre 1987 et 2000. Des biopsies itératives sont réalisées chez les patients à intervalle de 1 mois, 3 mois, 6 mois puis tous les ans pendant 10 ans. La moyenne de suivi des patients est de 7 ans, les patients reçoivent tous une trithérapie associant un inhibiteur des calcineurines (Cyclosporine A ou Prograf) et un antimétabolite (Azathioprine ou mycophénolate mofétyl) et des corticostéroïdes. Les grades de NCT sont définis selon la classification de Banff (grade 0: moins de 6% du cortex atteint, grade I: de 6 à 25 %, grade II: de 26 à 50%, grade III: > 50%). Le rejet aigu est jugé sévère si l'utilisation d'un traitement par un sérum anti lymphocytaire est nécessaire. Le rejet infra clinique correspond à un rejet histologique sans dégradation de la fonction rénale. Enfin, le rejet chronique est défini comme un rejet infra clinique qui survient après 1 an et qui est présent soit sur 50 % des biopsies d'un même patient, soit sur les 2 dernières biopsies séquentielles après 1 an, soit sur toutes biopsies après 2 ans. A partir de ces définitions, cette étude permet de distinguer 2 phases. Une première phase de constitution de lésion d'atrophie tubulaire et de fibrose interstitielle survenant dans la première année de greffe et générée essentiellement par les agressions immunologiques (rejet aigus cliniques et infracliniques) et ischémiques (ischémie reperfusion/nécrose tubulaire aiguë). Les lésions d'inflammation aiguë à type d'infiltrat lymphocytaire, de tubulite et de rejet infraclinique sont présentes chez plus de 60% des

patients à 1 mois, puis diminuent à 45% à 3 mois pour finalement ne toucher que 25% des patients à 1 an et moins de 20% après 1 an. A 1 an post greffe, 94% des patients présentent des lésions de NCT de grade I. La seconde phase survient après 1 an et touche la microvascularisation avec apparition d'une hyalinose artériolaire et des capillaires péritubulaires ainsi que les glomérules et l'interstitium qui deviennent scléreux. La néphrotoxicité des anticalcineurines et les rejets infracliniques semblent majoritairement à l'origine de cette seconde phase plus tardive de la NCT. En effet à A 10 ans post greffe, 37% des glomérules sont scléreux et plus de 58 % des patients présentent des lésions de NCT de grade II ou III. Cependant seulement 5.8% des biopsies présentent des lésions de type b c'est à dire avec lésions vasculaires et glomérulaires spécifiques du rejet chronique « vrai » avec signes actifs d'inflammation. Finalement à 10 ans les signes histologiques de toxicité des anticalcineurines sont constants (21) (figure 5).

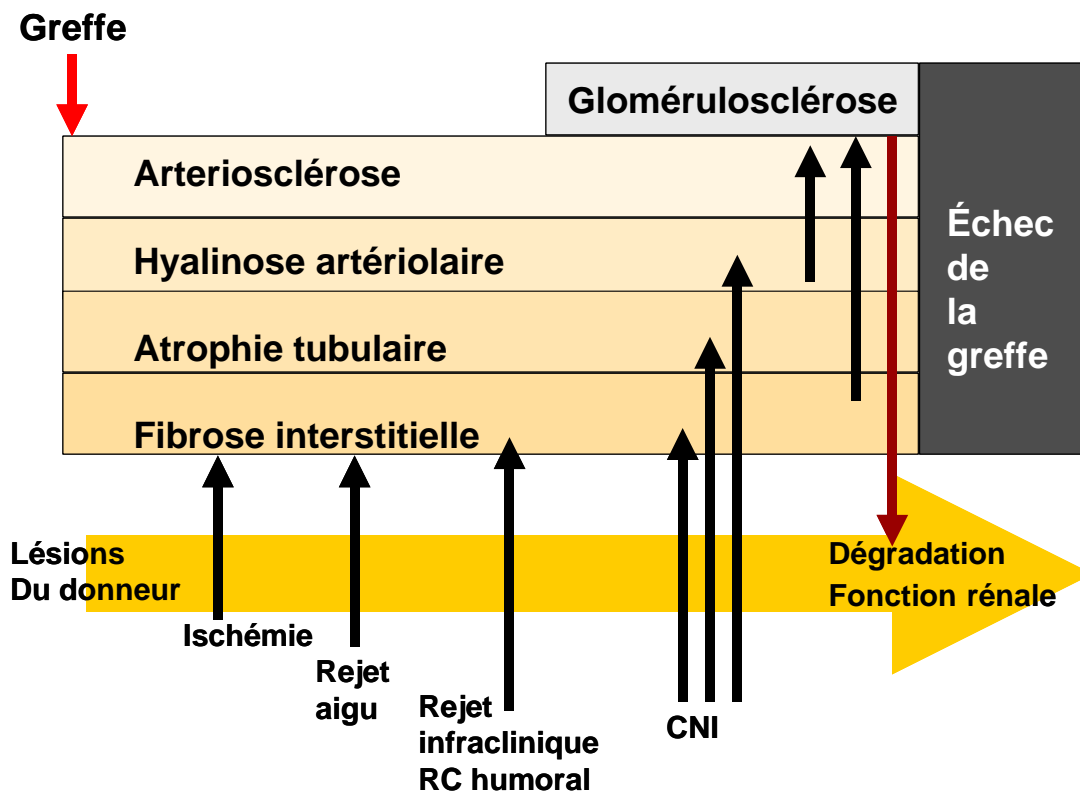


Figure 5: *Schéma de synthèse de la physiopathogénie du rejet chronique adapté de Jérémy Chapman (JASN 2005)*

2.a. Histopathogénie de la NCT

Les lésions de NCT correspondent à la somme des lésions dues à des agressions alloimmunes, ischémiques et inflammatoires et sont essentiellement caractérisées par des lésions des tubules ayant pour conséquence une réponse pro-fibrotique due à des processus de sclérose active qui résultent dans l'apparition de fibrose interstitielle chronique et d'atrophie tubulaire.

2.a.1. Les lésions du donneur

Elles n'entrent pas en soit dans la définition de la NCT, cependant elles l'influencent car elles jouent un rôle dès l'implantation du greffon, sur la structure initiale du rein, puis sur sa fonction et ses réponses aux agressions. Ainsi, l'importance initiale dans la survie des greffons de la fibrose interstitielle est démontrée et doit être prise en compte dans NCT même si elle n'en est pas à l'origine. L'influence des lésions du donneur sur la NCT sera traitée ultérieurement dans le chapitre 3.b.1.1.

2.a.2. La dégradation architecturale

La dégradation de l'architecture du tissu touche soit le néphron, soit l'architecture rénale elle-même, soit les deux. La défaillance des néphrons peut être la conséquence de la glomérulosclérose proprement dite, de l'interruption tubulaire rendant le glomérule atubulaire (22) donc non fonctionnel ou de l'atteinte tubulaire qui se traduit par une atrophie tubulaire ou une obstruction du tubule par des débris cellulaires nécrotiques.

L'apparition de synéchies à la capsule de Bowman dans les glomérules peut quand à elle conduire à la fuite d'urine primitive vers le tissu interstitiel rendant le rein moins fonctionnel. Enfin, de plus les lésions de la membrane basale tubulaire et notamment le nombre d'interruptions de celle-ci, du au rejet aigu par exemple, favorisent la fibrose locale et corrélent avec un grade élevé de NCT dans la classification de Banff et ce en absence de lésions vasculaires associées. (23) (24).

C'est en partie, la glomérulosclérose, la hyalinose artériolaire et l'ischémie aiguë due aux inhibiteurs des calcineurines (22) (25) qui auraient pour conséquence une atteinte prioritaire des cellules tubulaires qui sont très sensibles à l'ischémie et qui seraient à l'origine du désordre architectural des néphrons. De plus, les lésions et la perte progressive des capillaires péri-tubulaires conduisent à la dysfonction du greffon (26).

2.a.3. La fibrose

La fibrose active du greffon est le reflet d'une résolution incomplète du processus inflammatoire généré par les agressions aiguës du greffon. La majorité (environ 70%) de la fibrose interstitielle apparaît dans les 3 premiers mois de la greffe et résulte directement de la nécrose tubulaire et des épisodes de rejets aigus et infracliniques. La présence d'un infiltrat mononucléé annonce la progression histologique vers la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire. L'importance de la fibrose interstitielle corrèle avec l'atrophie tubulaire et précède la glomérulosclérose. Après un an, l'extension de la fibrose interstitielle diminue ce qui correspond à une diminution de l'inflammation due au rejet mais est relayée par une augmentation de la néphrotoxicité due aux inhibiteurs de calcineurines. A noter que FK506 et MMF protègeraient de la fibrose indépendamment de leur effet immunosupresseur. (27)

2.a.4. Le vieillissement

Les cellules somatiques in vivo ont une capacité de replication limitée appelée « la limite de HAYFLICK (28). Cette limite est expliquée par la perte des séquences télomériques TTAGGG à la fin des chromosomes compromettant la fonction télomérique et conduisant à l'instabilité du chromosome et à la perte de l'information génétique. Quand les cellules ont atteint leur potentiel maximum de réplication, elles arrêtent de proliférer et commencent à vieillir. Elles restent bloquer en phase G1 du cycle cellulaire, mais restent métaboliquement actives et contribuent à l'intégrité tissulaire. Les cellules vieillissantes présentent quelques caractéristiques qui sont : 1) le raccourcissement des télomères, 2) l'augmentation de l'activité de l'enzyme SA- β -Gal (Senescence associated β galactosidase) (29) (30). Chez l'animal, il a été montré que le nombre de cellules vieillissantes dans le tissu rénal augmentait avec l'âge alors que la moyenne de la longueur des télomères diminuait. De plus, il a été montré que le degré de vieillissement du rein, déterminé par le nombre de cellules marquées positivement par la SA- β -Gal, était inversement corrélé avec la récupération de la fonction du rein après un syndrome d'ischémie reperfusion. Il existerait donc une corrélation entre le nombre de cellules vieillissantes du rein et sa susceptibilité à l'ischémie. Chez l'homme il est aussi montré que la longueur des télomères est significativement associée à l'expression de la SA- β -Gal et que la présence de cellules vieillissantes est significativement associée à la NCT et à son degré de sévérité (31). D'autres marqueurs de vieillissement sont associés aux lésions de NCT. En effet, il est montré que l'expression génique de régulateurs du cycle cellulaire comme la P16INK4a et la P53 corrèlent avec la glomérulosclérose, et que la fibrose

interstitielle et l'atrophie tubulaire, seraient corrélées avec l'expression de PI16INK4a, P53, Cox 1 (cyclooxygénase 1), TGF β 1 et de la heat shock protein A 5 (HSPA5) (32).

2.a.5. La transition épithélio-mésenchymateuse

La fibrose interstitielle est un processus caractérisé par l'activation de novo des myofibroblastes, principales cellules responsables de l'excès de dépôt de matrice extracellulaire interstitielle dans des conditions pathologiques (33). Alors que le rôle des myofibroblastes est largement accepté dans la genèse de la fibrose rénale, son origine et son processus d'activation dans le rein fibrotique demeurent indéfinis et controversés. Les premières observations (34) en 1995 indiquent que les cellules tubulaires épithéliales peuvent exprimer des marqueurs de fibroblastes ouvrant ainsi la voie d'une possibilité de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT tubulaire, par définition est un processus dans lequel les cellules tubulaires rénales perdent leur phénotype épithélial et acquièrent des nouvelles caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Cette incroyable conversion conduit à la genèse de fibroblastes pouvant produire de la matrice extracellulaire en conditions pathologiques.

Les cellules tubulaires épithéliales perdent leur polarité apicale et basale, s'allongent et migrent dans l'interstitium péritubulaire à travers la membrane basale tubulaire endommagée (35). Elles perdent ensuite leur marqueur cellulaire, type E cadherin, et acquièrent des marqueurs mésenchymateux comme l'alpha actine des muscles lisses et la vimentine et produisent des composants de la matrice interstitielle comme la fibronectine et le collagène de type I (36). L'EMT est régulée par de nombreuses cytokines et facteurs dont le principal est le TGF β 1 (37) mais aussi l'Epithelial growth factors (EGF), le fibroblaste growth factor (FGF) et l'angiotensine II, elle même promoteur de l'effet du TGF β 1 à induire l'EMT. (38). Les paramètres environnementaux sont aussi importants dans l'apparition de l'EMT comme en témoignent, l'effet promoteur du collagène I sur l'EMT et son inhibition par le collagène IV. Enfin, il a été montré que la simple interruption de la membrane basale tubulaire était responsable de l'EMT in vitro (39).

En transplantation rénale, l'EMT est décrite comme un élément pathogénique majeur de la détérioration chronique et tardive du rein greffé. En effet, les cellules tubulo interstitielle dans la fibrose et l'atrophie tubulaire de la NCT montrent une perte des marqueurs épithéliaux (E Cadherin, cytokeratin) mais aussi la présence de marqueurs mésenchymateux (Vimentine, alpha actine des muscles lisses, collagène ; HSP 47). Le double marquage des cellules épithéliales (cytokeratine et vimentine) indique des stades intermédiaires d'EMT dans la

fibrose et l'atrophie tubulaire. L'importance de l'EMT n'est pas encore bien définie dans la genèse de la NCT, et ce d'autant plus qu'elle peut être réversible quand des cellules épithéliales fonctionnelles survivantes repeuplent les tubules lésés.

2.b. Histopathogénie du rejet chronique « vrai »

L'histopathologie du rejet chronique est incluse dans la définition de la NCT et se distingue par des spécificités histologiques (ie vasculopathie et glomérulopathie) que l'on retrouve sur 6 à 27 % des biopsies (21). Le rejet chronique «vrai» aussi appelé «récurrent» est défini par la lettre b dans la classification des lésions chroniques du BANFF 97. Cette distinction est due au fait que ces lésions de rejet chronique « vrai » qui se surajoutent aux lésions de NCT aspécifiques, sont dues à des mécanismes immunologiques d'alloreconnaissance et sont importantes à distinguer des lésions de NCT banales car elles peuvent impliquer des choix thérapeutiques différents.

Le rejet chronique « vrai » (NCT grade I, II ou III b) est défini actuellement par trois caractéristiques histologiques qui sont :

2.b.1. La vasculopathie

Elle est caractérisée par l'interruption de la limitante élastique interne avec épaissement fibro intimal des artères associé à la présence d'un infiltrat lymphocytaire dans l'intima. L'épaississement fibro intimal semble résulter d'une migration myofibroblastique suivie d'une prolifération locale et de dépôts de protéines de la matrice extracellulaire. L'hypothèse de l'origine de ces cellules myofibroblastiques selon laquelle elles seraient dérivées des muscles lisses de la media des vaisseaux lésés, a été controversée en 2001 par Grimm et al qui ont montré que ces cellules étaient issues de cellules précurseurs circulantes dans le sang du receveur (40)

2.b.2. L'atteinte des capillaires.

Ces lésions touchent aussi les capillaires comme en témoigne l'atteinte des capillaires péri-tubulaires caractérisée par le dédoublement des membranes basales péri-tubulaires uniquement visible en microscopie électronique (41).

2.b.3. La glomérulopathie d'allogreffe

Elle est définie par un élargissement mésangial du glomérule associé à une hypercellularité, une mésangiolyse, une infiltration du mésangium par des cellules mononuclées et une

duplication de la membrane basale glomérulaire avec des dépôts sous endothéliaux caractéristiques en microscopie électronique qui permettent de la distinguer des glomérulopathies membrano prolifératives de novo (18). (Figure 6)

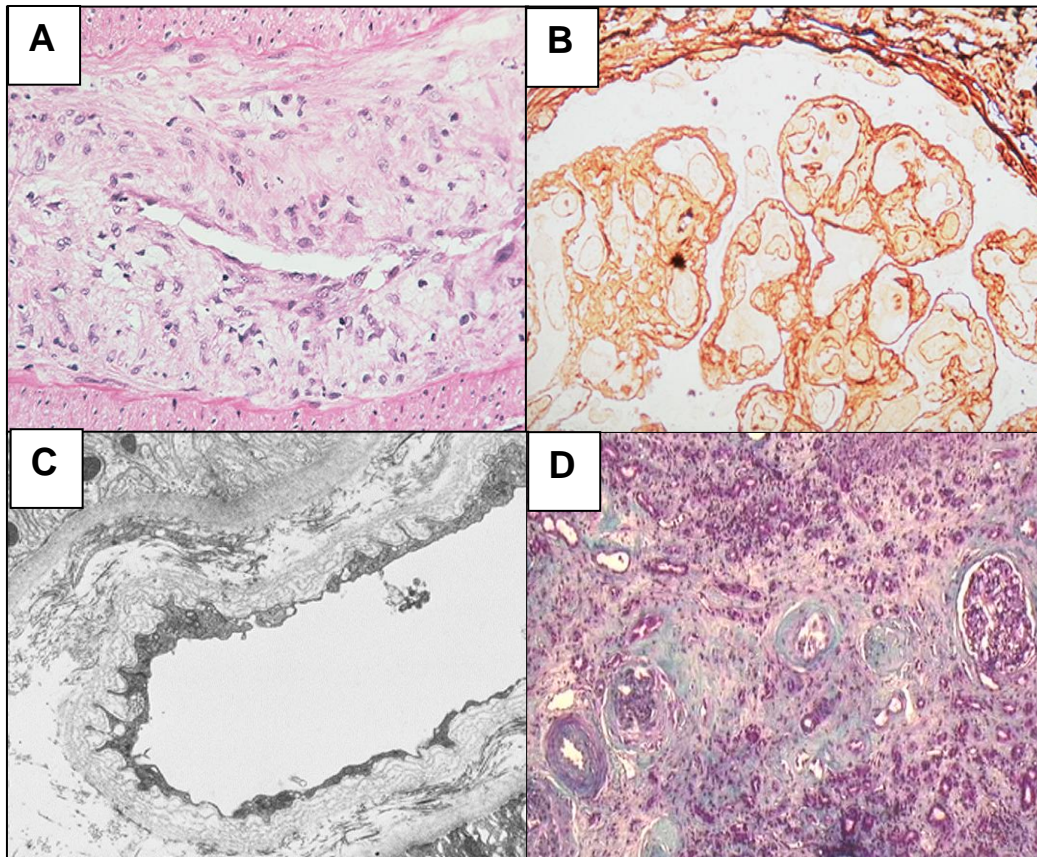


Figure 6 : Lésions histologiques caractéristique du rejet chronique « vrai » ou récurrent

La photo A montre des lésions d'endartérite fibroproliférative (épaissement fibroblastique intimal, lymphocytes dans l'intima, altération de la limitante élastique interne). La photo B montre des lésions de glomérulopathie d'allogreffe (duplication de la membrane des capillaires glomérulaires : doubles contours. La photo C montre la duplication de la lamina densa des capillaires péritubulaires en microscopie électronique. La photo D montre des lésions non spécifiques de NCT (atrophie tubulaire, fibrose interstitielle), substratum du diagnostic histologique du rejet chronique « vrai »

3. Etio-pathogénie de la NCT et du rejet chronique «vrai»

La néphropathie chronique du transplant semble donc être le résultat de lésions cumulées, dépendantes du temps et impliquant des mécanismes immuns et non immuns aggravées par les lésions préexistantes du donneur et la toxicité aiguë et chronique des inhibiteurs des calcineurines. L'hypothèse d'une phase précoce de lésions touchant essentiellement le tissu tubulo-interstitiel serait la conséquence du syndrome d'ischémie reperfusion et des rejets aigus cliniques et infra-cliniques. Cette première phase inflammatoire serait suivie d'une phase plus tardive moins inflammatoire et touchant essentiellement les glomérules et les vaisseaux, aggravée ici aussi par les inhibiteurs de calcineurines et de nombreux autres facteurs de progression. Il est maintenant communément admis que les facteurs de risque de la NCT sont autant d'origine immunologique que non immunologique sans que la frontière entre les deux mécanismes ne soit facilement distinguable pour la plupart d'entre eux.

Par souci de clarté et d'exhaustivité les facteurs de risques seront donc présentés selon cette distinction et compléter par la liste des facteurs de progression ou d'aggravation de la NCT.

3.a. Les Causes immunologiques

3.a.1. Rejet aigu et infra-clinique

Dans la phase très précoce de la greffe, l'endothélium des vaisseaux est altéré par l'ischémie/reperfusion et les épisodes de rejets aigus contribuant à l'inflammation chronique du tissu rénal (tubules et interstitium). Cette inflammation chronique est responsable de processus de sclérose active qui a pour conséquence une réponse pro-fibrotique et résulte dans l'apparition de fibrose interstitielle chronique et d'atrophie tubulaire. Les processus qui conduisent aux lésions vasculaires peuvent débiter dès l'activation du système immunitaire durant l'ischémie de l'organe avec une sur-régulation de l'INF gamma et l'expression qui en découle de MHC de classe I et II qui augmentent l'immunogénicité de l'endothélium. Les cellules endothéliales et musculaires lisses migrent alors au travers de l'intima et prolifèrent via l'induction des récepteurs du fibroblaste growth factor (FGF). Ce processus conduit à l'hypertrophie concentrique des vaisseaux, à l'ischémie et à la fibrose. La physiopathogénie de la glomérulopathie d'allogreffe est moins claire et pourrait être due à un processus auto immunitaire par exemple à la présence d'anticorps anti-membrane basale spécifiques (42).

La principale cause de dysfonction chronique des greffons par NCT est ainsi due à l'existence de rejet aigu. La demi vie d'un greffon est estimée à 6.6 ans chez un patient recevant un rein

de cadavre qui présente un rejet aigu comparé à 12.5 ans en l'absence de rejet aigu (43). Actuellement, l'incidence des rejets aigus a considérablement chuté depuis l'introduction du cellcept (Moins de 10%, contre plus de 30% sous azathioprine), mais aussi du prograf et grâce à la prévention du cytomégalovirus en post greffe. Néanmoins, la survie des greffons chez les receveurs de reins de cadavre qui présentent au moins un épisode de rejet aigu reste très significativement inférieure (>20%) à la survie des greffons indemnes de rejet aigus, comme le montre la figure 7 (données de l'ITERT issue de la base DIVAT). De plus, il est admis que les patients qui présentent des épisodes de rejets aigus qui ne sont pas suivis d'une récupération complète de la fonction rénale ou qui présentent des rejets aigus récidivants ou résistants au traitement ont un risque de NCT plus important que les patients dont les épisodes de rejet récupèrent complètement ou qui ne font qu'un seul épisode de rejet aigu dans leur suivi (44) (45) (21). La date de survenue de l'épisode de rejet aigu joue aussi un rôle dans son impact sur la dysfonction chronique. En effet, les épisodes de rejets aigus survenant avant trois mois et dont la récupération est complète ne conduisent pas à la NCT alors que les rejets plus tardifs sont plus à risque (46). Enfin, la persistance du rejet aigu histologique sans traduction clinique, aussi appelé infraclinique, contribue lourdement à la physiopathogénie et la gravité de la NCT voire du rejet chronique « vrai » (47) (48) (49). Dans son étude décrivant l'histoire naturelle de la NCT de Nankivell montre que 60.8% des patients présentent des signes de rejets infracliniques à un mois après la greffe, puis de 45.7 % à 3 mois pour tomber à 25.8% à un an puis à 17.7 % après un an. Le risque de présenter un rejet infraclinique est par ailleurs accru sous CsA comparé au FK 506. Le cellcept seul ou en association avec le prograf diminue aussi ce risque. Enfin une étude récente évaluant l'incidence du rejet infraclinique montre que 46% des patients biopsiés à 1 mois et 6 mois post greffe présentent des lésions aiguës qui peuvent être contrôlées par l'augmentation de la charge immunosuppressive dont le tacrolimus mais pas par les corticoïdes seuls. (50)

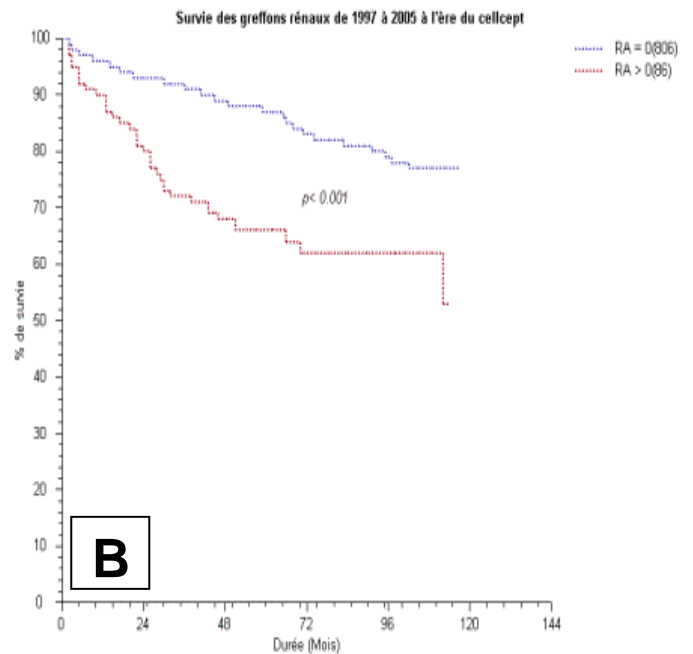
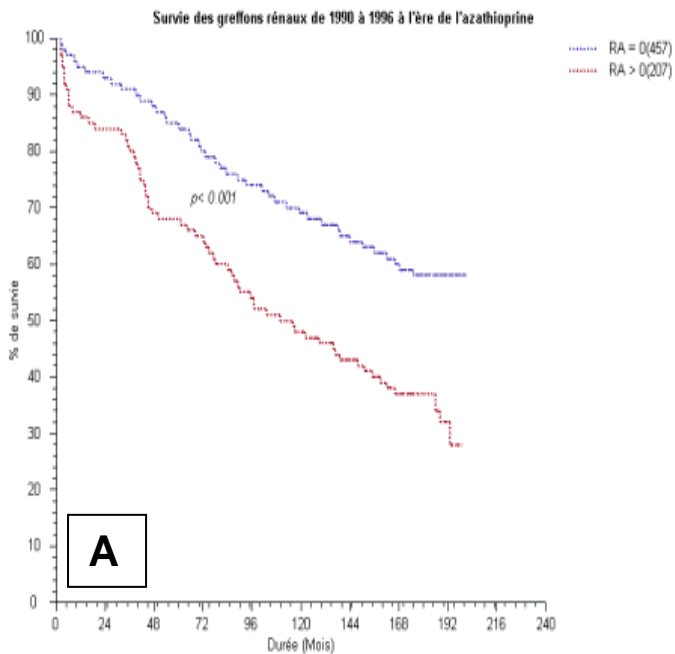


Figure 7 A : Survie des greffons rénaux chez des receveurs adultes greffés entre 1990 et 1996 traités par imurel et ICN en traitement d'entretien, en fonction de la présence ou non d'un épisode de rejet aigu dans le suivi (taux de rejet aigu est de 31%). **Figure 7 B :** Survie des greffons rénaux chez des receveurs adultes greffés entre 1997 et 2005 traités par Cellcept et ICN en traitement d'entretien, en fonction de la présence ou non d'un épisode de rejet aigu dans le suivi (taux de rejet aigu est de 9%) mais l'impact du rejet aigu sur la survie des greffons reste toujours majeur.

3.a.2. La compatibilité HLA

Il existe un bénéfice clinique de l'effet de la compatibilité HLA entre donneur et receveur sur la survie à long terme des greffons comme le montre les registres de l'UNOS (51) (52). Une étude prospective américaine portant sur l'effet de la compatibilité HLA entre donneur et receveur en greffe de rein de cadavre montre que la survie des greffons à 1 an est de 88% pour les greffons matchés en HLA comparé à 79 % pour les greffons non matchés. L'estimation de la demi-vie est de 17.3 ans pour les greffes compatibles et seulement 7.8 ans pour les greffes incompatibles. Cicciarelli J. évoque la possibilité d'un seuil de compatibilité HLA au delà duquel la survie des greffons est significativement meilleure (≤ 2 incompatibilités vs > 2) (53). Nous observons ce même seuil dans notre base de données en réseau DIVAT (1^{ère} greffe de rein de cadavre depuis 1990) (figure 8), cependant il apparaît ici que l'impact du HLA est majeur essentiellement durant la première année de greffe. Bien que l'effet du HLA ne soit plus « trop » controversé, l'étude de P.Terasaki montre par contre que cet effet est contrebalancé par la qualité des greffons (NEJM 1995). En effet, il montre sur une étude portant sur 3680 donneurs vivants entre époux que la survie des greffons à 3 ans est de 85% contre 82% chez 3368 receveurs de reins de donneurs familiaux et de 70% chez 43341 patients receveurs de reins de cadavre. Cette supériorité de survie des greffons dans le cadre de la greffe entre époux (donc par principe non-HLA compatible) ne peut être expliquée ni par la compatibilité HLA, ni par l'âge du donneur ni par une ischémie froide plus courte, mais par l'excellente qualité du greffon prélevé.

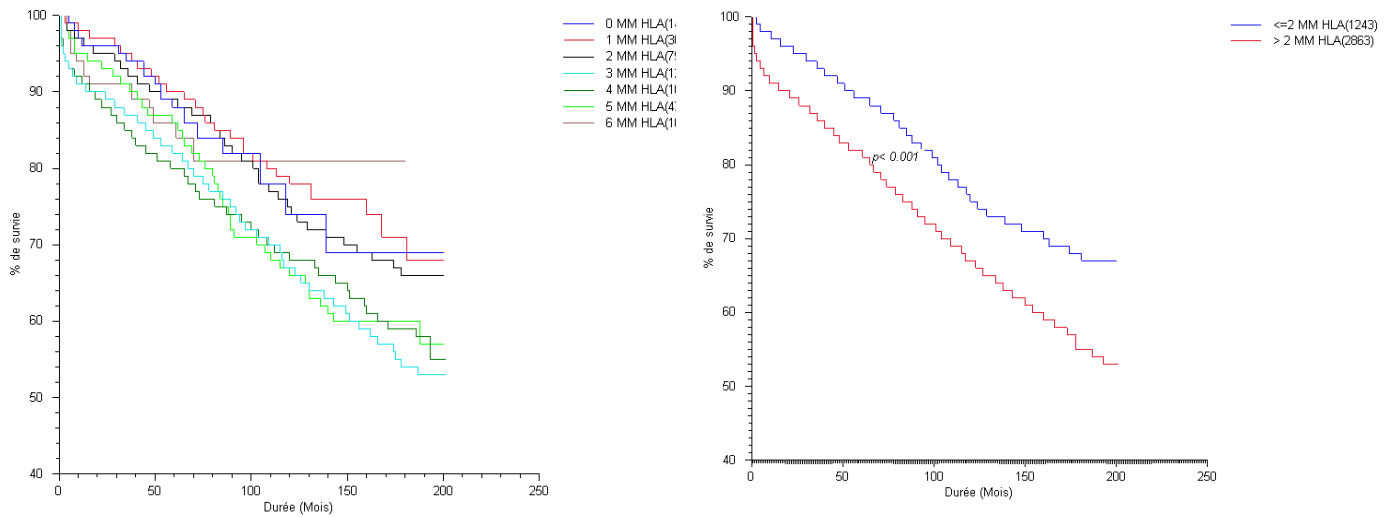


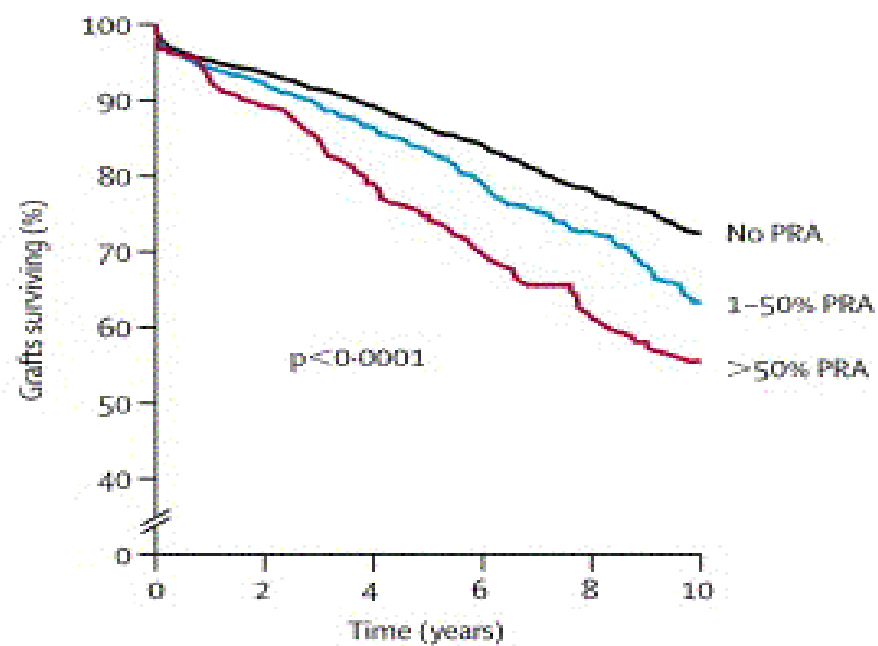
Figure 8 : effet de l'incompatibilité HLA-A-B-DR sur la survie des greffons rénaux portant sur une population de 4287 patients ayant reçu une première greffe de rein de cadavre depuis 1990. L'existence de plus de 2 incompatibilités HLA est un facteur de risque de perte des greffons. Données issues de la base DIVAT réseau.

3.a.3. L' Immunisation HLA et non-HLA avant et après la greffe

3.a.3.1. Immunisation avant greffe.

Il est actuellement admis que les patients qui présentent une pré-immunisation anti HLA sur le panel avant la transplantation, en rapport avec des greffes antérieures, des transfusions ou des grossesses, présentent un risque accru de rejet aigu humoral ou cellulaire et de perte chronique des greffons comparé aux patients non immunisés (54) (55), (56). L'immunisation pré transplantation est généralement évaluée par des tests de cytotoxicité complément dépendante (CDC), technique décrite par Terasaki et al dès 1964 (57). Cependant, il apparaît que la technique de lymphotoxicité ne peut pas discriminer les allo-anticorps (Ac) anti HLA spécifiques des allo Ac non anti HLA spécifiques ou des faux positifs dus à des auto anticorps anti lymphocytes. De nouvelles techniques de détection des allo-anticorps permettent d'en définir la spécificité (Elisa ou cytométrie en flux) mais ne permettent pas de discriminer quels allo-anticorps fixent le complément, potentiellement important sur le caractère délétère de ces anticorps. Wahrmann et al on récemment utilisé une nouvelle technique [C4d]flow PRA permettant détecter les allo-anticorps qui activent la fraction C4 du complément et de ces composés (C4b et C4d). Ils montrent que seuls les patients qui ont des anticorps anti HLA de classe I qui fixent le complément ont une survie des greffons significativement moins bonne. Cette nouvelle technique devrait permettre d'améliorer le repérage des patients qui présentent des anticorps anti HLA à fort risque immunologique (58). Le groupe de G. Opelz a aussi récemment montré que la présence d'une immunisation pré-greffe non HLA spécifique pouvait jouer un rôle majeur sur la survie des greffes. Cette étude, qui concerne 3001 patients ayant reçu des greffons HLA identiques à partir de donneurs vivants montre que les patients qui n'ont pas d'anticorps contre les antigènes HLA avant greffe sur le panel (PRA = 0%) ont une survie des greffons à 10 ans significativement accrue par rapport aux patients présentant des PRA entre 0 et 50% (63.3% de survie, $p < 0.0006$) ou à plus de 50% (55.5% de survie, $p < 0.0001$). Ces résultats suggèrent que l'immunité non HLA joue un rôle majeur dans la dysfonction chronique des greffons (Figure 9), (59). Ces antigènes cibles des anticorps responsables de rejets chroniques sont aussi parfois appelés Ag mineurs d'histocompatibilité et ne sont pas codés par le système HLA. L'apparition d'Ac contre ces antigènes mineurs conduirait préférentiellement au rejet chronique. Deux hypothèses sont envisagées pour expliquer le rôle de ces Ac dans la perte chronique des greffons. L'une est que les anticorps non HLA contre les Ag mineurs d'histocompatibilité apparaissent fréquemment avec les

anticorps anti HLA, l'autre que la cross réactivité des anticorps anti HLA avec les épitopes des Ag mineurs d'histocompatibilités induisent des rejets chroniques tardifs. Cependant, d'autres études montrent que la présence d'anticorps en pré transplantation peut ne pas être délétère en fonction du type d'anticorps et de sa spécificité antigénique. En effet, S Lebas montre en 2003 que sur le sérum d'une série de 62 patients qui présentent un cross match B positif (cross match T négatif) avant la greffe, dans 77% des cas il ne s'agit pas d'Ac anti HLA et dans ces cas là, la survie des greffons est similaire à celle des patients qui présentent un cross match B négatif. L'autre partie des patients qui eux présentent un cross match B positif du à des anticorps anti HLA de classe II ont une moins bonne survie de leur greffons (au moins précoce) (60). Enfin, récemment Zou et al ont montré que dans le sérum d'une série de 85 patients en attente de transplantation, 24.7% présentaient des anti corps dirigés contre les antigènes MICA (MHC class I-related chain A), exprimés par les monocytes, les keratinocytes, les fibroblastes, et les cellules endotheliales. Ces anticorps anti MICA, non HLA, pourraient potentiellement être impliqués dans le rejet aigu et la perte chronique des greffons (61).



Number of transplants						
No PRA	3001	2495	1929	1418	989	687
1-50% PRA	803	647	514	362	249	158
>50% PRA	244	192	149	111	84	65

Figure 9: La courbe de survie des greffes HLA identiques décroît lentement après 1 an indiquant des événements immunologiques tardifs médiés par des Ac non anti HLA compte tenu qu'il s'agit de greffe HLA identiques. Issue de G.Oplez, Lancet 2005 ; 365 :1570-76

3.a.3.2. L'Immunisation post greffe.

Les anticorps sont responsables d'une cascade d'événements dans le greffon qui conduisent essentiellement à une hyperplasie intinale et à des processus de réparations chroniques dont la re-colonisation des vaisseaux par les cellules musculaires lisses du receveur et la prolifération myo-intimale. L'apparition d'anticorps de novo en post greffe et leur rôle dans l'apparition de rejet aigu précoce a été observé il y a maintenant quelques décennies (62). Des études plus récentes montrent le rôle des anticorps apparus en post greffe dans la survenue de rejet chronique (55). Dans une étude prospective récente concernant des patients qui ne présentent pas d'anticorps préformés avant la greffe, 244 patients développent des anticorps en post greffe contre 1421 qui en restent indemnes. Dans le groupe de patients qui produisent des anticorps post greffe, le taux de perte de greffon à 1 an est de 8.6% contre 3% dans le groupe sans anticorps ($P < 0.00003$) (63). Campos et al ont fait récemment la distinction du rôle des anticorps anti HLA post greffe sur la NCT en fonction de leur spécificité anti HLA classe I ou II. Sur une série monocentrique de 512 patients, ils montrent que la présence d'anticorps anti classe II post greffe est associée à un risque de perte du greffon par NCT (RR 2.9) alors que ce n'est pas le cas des anticorps anti classe I (64). Il apparaît de plus que les anticorps qu'ils soient anti donneur spécifiques ou non, sont délétères pour les greffons (survie raccourcie, protéinurie, mauvaise fonction), probablement du fait soit que les anticorps non donneur spécifiques sont le reflet d'une réponse anticorps forte du receveur, soit que les Ac anti donneurs spécifiques sont adsorbés sur le greffon, donc indétectables, ne laissant en circulation que les Ac non donneurs spécifiques (65).

3.a.3.3. Le Dépôt de C4d dans le greffon

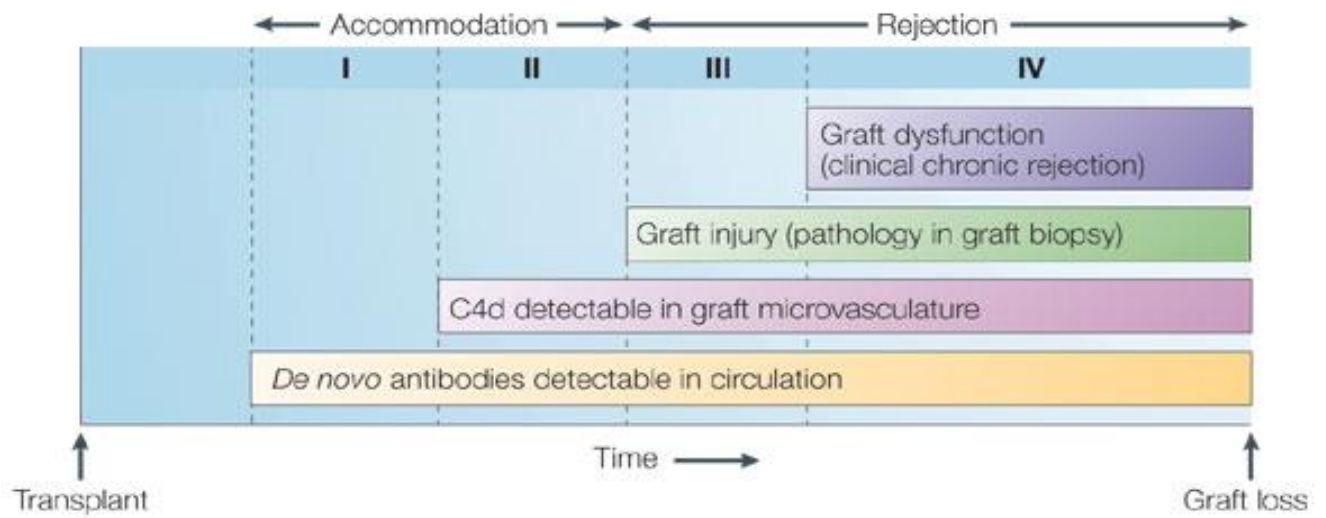
Le C4d est un produit de dégradation de la fraction C4 du complément qui signe une activité humorale avec dépôt d'anticorps et de complément dans un tissu. La présence de C4d dans la microvascularisation rénale en signant l'existence d'une activité humorale participe à la physiopathogénie du rejet chronique caractérisé par la glomérulopathie d'allogreffe et le dédoublement des membranes des capillaires péri-tubulaires. Regele et al ont été parmi les premiers à montrer sur une série de 213 patients biopsiés pour dysfonction chronique du greffon que 34% des patients présentaient des dépôts endothéliaux de C4d et que ces dépôts étaient associés très significativement à la présence d'une glomérulopathie d'allogreffe, d'un dédoublement des membranes des capillaires péri-tubulaires et de la présence d'un infiltrat

mononucléé dans la paroi des capillaires péri-tubulaires (66). Il s'avère que des dépôts diffus de C4d glomérulaires et péri-tubulaires sont retrouvés chez 1 à 2/3 des patients qui présentent des signes histologiques de rejet chronique vrai (66) (67). Enfin, chez 88% des patients qui présentent des dépôts de C4d sur le greffon, on a mis en évidence des anticorps circulants anti HLA spécifiques du donneur alors qu'aucun anticorps circulant n'est détecté en l'absence de C4d dans le rein (67).

L'ensemble de ces données sur le rôle des anticorps préformés avant greffe et sur l'apparition d'une immunisation post greffe spécifique ou non du donneur suggère fortement l'implication de la réponse humorale dans la physiopathogénie de la néphropathie chronique du transplant sous sa forme dite de rejet chronique « vrai ».

Robert Colvin a récemment proposé l'hypothèse d'une séquence d'événements à l'origine de la survenue d'un rejet chronique à médiation humorale (figure 10) comprenant 4 étapes (68):

- Etape I : détection d'Ac anti donneur circulants de novo
- Etape II : signe d'activité humorale (anticorps et complément) avec dépôts de C4d dans les capillaires péri-tubulaires et les glomérules.
- Etape III : Apparition des lésions histologiques sans retentissement fonctionnel
- Etape IV : Apparition d'une dysfonction chronique du greffon conduisant à l'échec de la transplantation.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Figure 10 : Propositions de séquence des étapes d'apparition d'un rejet chronique à médiation humorale. Les étapes I et II correspondraient à des phases d'accommodation puisque la présence d'anticorps circulants et dans le greffon n'a pas de conséquence sur la fonction du greffon. Issu de Colvin RB, Nature reviews immunol 2005

3.a.3.4. L'Hypothèse du rôle de l'autoimmunité dans le Rejet chronique

Si les mécanismes immuns ont une implication probable dans la pathogénie des lésions de rejet chronique, la nature des antigènes réellement impliqués dans ce processus immunitaire n'est encore pas claire. Rolls et al ont montré en 2002 que la transplantation cardiaque chez la souris induit une réponse cellulaire T auto-immune contre une protéine spécifique du tissu cardiaque : la myosine et ce en absence de réponse allo-immune contre le greffon (69). Dans un modèle de rejet chronique chez le rat F344 sur LEW, Joosten et al ont mis en évidence une réponse anticorps dirigée contre les antigènes de la membrane basale glomérulaire mais aussi la présence de dépôts d'anticorps sur les cellules mésangiales (70). Cette observation est faite par ailleurs en transplantation rénale chez l'homme. En effet, une étude récente montre que 11 patients sur 16 présentant une glomérulopathie d'allogreffe et 3 patients contrôles sur 16 avec NCT sans glomérulopathie d'allogreffe (GA) ont des anticorps anti-membrane basale dont des anti protéoglycanes héparane sulfate et spécifiquement des anti agrin chez 44%. De plus, la présence de ces anticorps est associée avec le nombre d'épisodes de rejet aigu avant le diagnostic de glomérulopathie d'allogreffe (42). Une autre protéine, la vimentine, est une candidate antigénique potentielle de réponse humorale non HLA. En effet cette protéine située dans les cellules endothéliales est exposée au système immunitaire après lésions de l'endothélium (71).

3.a.4. La re-transplantation

La re-transplantation est devenue une des principales causes d'insuffisance rénale chronique et on peut considérer qu'environ 25 à 30% des patients en attente de transplantation ont déjà reçu une greffe antérieure. Les patients re-transplantés représentent une population unique immunologiquement puisqu'ils ont déjà été exposés à des allo-antigènes d'un greffon antérieur. Ces patients présentent ainsi fréquemment une immunisation anti HLA importante. La re-transplantation est historiquement associée à une moins bonne survie des greffons que la transplantation de novo (72) et les facteurs de risques identifiés sont essentiellement le pourcentage élevé d'immunisation contre le Panel (PRA) et le délai de survie de la première greffe court (moins de 6 mois) (73). Cependant, l'amélioration des techniques d'identification des molécules du CMH, ainsi que des crossmatches combinés à ceux des protocoles d'immunosuppression conduisent à une survie actuelle des deuxièmes transplantations équivalente à celle des premières (74), ce qui n'est pas le cas des troisièmes greffes dont la survie est très nettement inférieure malgré une excellente compatibilité HLA (M. Hourmant, soumis AJT décembre 2006). Une étude récente de notre groupe a montré, sur

une série de 233 secondes greffes de reins réalisées entre 1985 et 1998, une équivalence de survie des greffons comparés aux 1^{ères} transplantations sur la même période de temps et l'importance de l'incompatibilité HLA et notamment DR (DR>B>A), mais aussi des épisodes de rejets aigus et de la fonction rénale à un an comme facteurs prédictifs de mauvaise survie du greffon à long terme. Un travail plus récent, portant sur la même cohorte de patient re-transplantés a étudié l'effet de la présence du premier greffon non fonctionnel toujours en place au moment de la re-transplantation parallèlement à un modèle animal chez le rat. Tant chez l'homme que chez l'animal, il n'a pas été montré d'effet bénéfique du premier greffon sur la seconde transplantation (75).

3.a.5 .L'implication des deux voies d'alloreconnaissance dans la pathogénie de la NCT avec rejet chronique.

3.a.5.1. L'Alloreconnaissance indirecte

Il s'agit de la reconnaissance indirecte des peptides CMH du donneur présentés par les cellules présentatrices du receveur aux lymphocytes T du receveur restreinte au CMH du soi. Quelques semaines après la transplantation, les cellules présentatrices du donneur sont rapidement éliminées du greffon et du receveur, écartant ainsi la possibilité d'une présentation directe, non restreinte au soi, des Ag du donneur aux cellules T du receveur. L'implication de la voie indirecte dans la survenue du rejet chronique est maintenant bien documentée. Sur une cohorte de 22 receveurs, ceux qui développent un NCT présentent une fréquence plus élevée in vitro de lymphocytes T indirectement activés par des lysats de cellules du donneur par rapport aux patients qui ne présentent pas de NCT. Ceci a aussi été montré en utilisant des peptides HLA dérivés du donneur (76) (77).

3.a.5.2. L'Alloreconnaissance directe

Bien qu'il existe des arguments forts en faveur de l'implication de la réponse indirecte dans l'alloreconnaissance dans le rejet chronique, le rôle de la voie directe n'est pas pour autant exclu. Les lymphocytes T non spécifiques du donneur qui cross-réagissent avec les cellules effectrices mémoires, peuvent être impliqués dans le rejet chronique puisque les patients qui présentent un rejet chronique ont une fréquence de cellules activées contre un individu tiers plus élevée que les patients qui ont une greffe stable. (78) Ceci suggère que les cellules effectrices mémoires activées avant la greffe peuvent réagir de façon croisée avec le CMH du donneur durant le processus de rejet chronique. Le nombre de cellules CD8+ CD28 – perf +,

granz +, est augmenté dans le sang de patients présentant un rejet chronique comparé à des patients opérationnellement tolérants sans traitement immunosuppresseur (79). Une des hypothèses qui pourrait expliquer leur implication dans le rejet chronique serait que ces cellules CD8+ dirigées contre des virus et des pathogènes pourraient réagir de façon croisée avec le greffon et conduire au rejet chronique.

3.a.6. L'implication de la fonction de régulation

Les mécanismes par lesquels un rein transplanté ne développe pas de lésion de rejet chronique ne sont pas clairement définis et ne sont probablement pas liés uniquement au degré d'immunosuppression, à la compatibilité HLA, ou à des profils de gènes particuliers (80). Ils peuvent aussi impliquer des mécanismes de régulations. Les lymphocytes T CD4+CD25+ exprimant le facteur FOXP3 sont connus pour avoir un effet immunomodulateur puissant en périphérie pour contrôler les maladies auto-immunes et la réponse allogénique dans de nombreux modèles expérimentaux (81). Ces cellules peuvent agir par contact cellulaire direct ou par l'intermédiaire de cytokines (TGF β et IL 10) in vitro et in vivo (82). Les CD4+CD25+ T suppressives thymiques semblent être sélectionnées par le thymus pour leur reconnaissance des Ag du soi et malgré leur haute affinité elles ne sont pas détruites (82). Les cellules régulatrices peuvent supprimer l'alloréactivité en périphérie en réagissant de façon croisée avec les allopeptides dans le contexte de la présentation restreinte aux antigènes du soi. Cependant, de plus en plus de données récentes montrent que les cellules régulatrices CD4+CD25+ peuvent aussi être générées en périphérie à partir du pool de CD4+CD25+ ou à partir de cellules CD4+CD25- et peuvent reconnaître divers antigènes (83). Récemment Salama et al ont montré que la diminution de la régulation des cellules régulatrices conduisait à l'augmentation de la reconnaissance des déterminants antigéniques du donneur et que cela pouvait participer à la pathogénie du rejet chronique. Cette hypothèse est renforcée par l'étude de S Louis et al portant sur l'analyse phénotypique lymphocytaire d'une population de patients transplantés et qui montre que le rejet chronique est associé à une diminution du nombre de cellules régulatrices CD4+CD25+ FOXP3 par rapport à des individus sains ou tolérants leur greffon. (84).

3.a.7. La Non compliance / Sous immunosuppression

La non compliance au traitement immunosuppresseur, fait partie des causes majeures de perte des greffons par sous immunosuppression. Le nombre de patients non compliant en post transplantation a été évalué à 22.4% dans une étude multicentrique américaine portant sur 2500 patients dans 56 centres de transplantation. Trois profils de patients non-compliance ont été dressés : les non-compliance « accidentels », « invulnérables », et « volontaires » (85). Une étude plus récente portant sur 286 patients d'un seul centre de transplantation incluant des patients adultes entre 5 et 231 mois de greffe (moyenne 76.7 mois) retrouve 24.5% de patients non compliance dont 7.7% ont une non compliance mineure et 16.8% majeure. La période post greffe, le jeune âge, le bas niveau d'éducation et de classe socio-économique ainsi que l'addiction et les désordres psychiatriques ont été identifiés comme facteurs de risque de non compliance. Les patients présentant une non compliance majeure, ont un risque de rejet aigu et de dysfonction chronique du greffon très significativement supérieur aux contrôles (86).

Dans de très rares cas, probablement cependant sous évalués, la non compliance s'accompagne d'un état de tolérance clinique opérationnelle. Nous avons récemment étudié une série de 10 patients greffés rénaux qui n'avaient plus de médicaments immunosuppresseurs depuis en moyenne 9.4 ans et dont le greffon avait une bonne fonction rénale, stable sans protéinurie. Nous avons remarqué que la plupart des patients avaient arrêté leur immunosuppression sur de longue période de temps, que l'âge des donneurs était plus jeune que la population transplantée contrôle, conférant une bonne qualité au greffon et qu'ils présentaient un faible niveau d'immunisation post transfusionnel. Sur cette série 2 patients présentaient des anticorps anti donneurs post greffe sans conséquence immédiate sur la fonction rénale. Finalement 2 patients dégradèrent leur fonction rénale et retournaient en dialyse après 9 et 13 ans de greffe fonctionnelle sans traitement. L'un pour NCT grade 3 a et l'autre pour rejet chronique vrai (87). Les principaux mécanismes associés aux modèles expérimentaux de tolérance en allotransplantation sont la délétion clonale, le chimérisme, l'anergie et la régulation (8). Sur notre série de patient opérationnellement tolérant, nous avons montré que les cellules T sont caractérisées par un faible niveau de transcripts cytokiniques en comparaison avec une population contrôle de patients en rejet chronique (88). Nous avons aussi montré que le phénotype lymphocytaire de ces patients ne diffèrent pas celui de sujets témoins sains, mais qu'ils présentent significativement plus de cellules CD4+ CD25+^{hi} (cellules régulatrices) que des sujets contrôles présentant un rejet chronique (79).

3.a.8. L'âge du donneur

Chez l'homme, l'âge du donneur semble augmenter l'immunogénicité du greffon et être à l'origine de l'incidence accrue d'épisode de rejets aigus chez les receveurs de vieux reins. Il s'agit essentiellement de rejet interstitiel de bas grade histologique (grade 1) survenant dans des délais semblables à ceux survenant sur des greffons plus jeunes. Ces rejets seraient cependant plus délétères sur la survie du greffon probablement en raison de la moins bonne capacité de ces vieux tissus à réparer les lésions dues au rejet (89).(90). Une étude récente sur un modèle de greffe allogénique chez le rat F344 sur Lewis montre que le ratio des modifications structurales est doublé dans les greffons âgés et que leur fonction rénale est 5 fois inférieure à celle des reins jeunes. Cette étude montre aussi que les vieux reins présentent des modifications immunologiques. En effet, le nombre de cellules T et B (splénocytes et cellules périphériques circulantes) et de cellules alloreactives (Elispot, IFN gamma) augmentent dans les 6 premiers mois suivant la greffe significativement plus chez les receveurs de vieux reins (91), suggérant que la greffe de reins âgés engendre une plus forte réponse immune dans les 6 premiers mois de la transplantation.

3.a.9. L'âge du receveur

Le nombre de patients présentant une insuffisance rénale chronique terminale augmente régulièrement, essentiellement en raison de l'afflux croissant de sujets de plus de 65 ans sur les listes d'attente de greffe rénale. En Europe, le pourcentage de sujets âgés de plus de 65 ans est passé de 1.5% durant la période 1985-1989 à 17% de 2000 à 2004 (92). Malgré une mortalité initiale accrue qui entoure la période péri-opératoire, les receveurs de plus de 65 ans qui reçoivent des reins de donneurs dits « limites » vivent en moyenne 3.8 ans de plus que les patients équivalents en attente sur les listes de transplantation (93). Environ 50% des pertes de greffons chez les receveurs âgés sont en rapport avec le décès du patient avec un rein fonctionnel comparé à 15% chez les receveurs plus jeunes (94). Cependant, l'âge du receveur est en soi (indépendamment de l'âge du donneur, du décès, de la récurrence de la maladie initiale, de la thrombose, du rejet aigu, des infections ou des échecs techniques) un facteur de risque de perte de greffon par NCT (95) (96) et ce malgré une incidence du rejet aigu chez les patients de plus de 60 ans généralement diminuée par rapport aux populations plus jeunes de receveurs (97) (98) (99). Ces deux dernières observations sont cependant controversées (100) (101). (102). Une des explications possibles de l'effet délétère de l'âge du receveur indépendamment des autres facteurs de perte de greffon (dont l'âge du donneur) pourrait être lié à des lésions vasculaires avancées retrouvées chez les vieux receveurs. En effet, la maladie

vasculaire du receveur serait être à l'origine d'hypoxie et de lésions ischémiques du greffon favorisant le retard au démarrage du greffon puis les lésions de NCT (103). De plus, si l'on considère que la plupart des équipes de transplantation respectent autant que possible une concordance d'âge entre le donneur et le receveur et donc attribuent généralement des reins limites à des receveurs âgés et vasculaires, on observe une synergie d'effet de l'âge sur la dysfonction chronique des greffons (96). Enfin, de façon intéressante il a aussi été montré, sur des modèles animaux que l'âge du receveur était associé à des altérations de la réponse immune et avait pour conséquence une diminution de la survie des greffons. L'augmentation de l'âge du receveur résulte dans une diminution de la fonction rénale associée à des lésions histologiques chroniques et un infiltrat cellulaire marqué dans le greffon. De plus, in vitro, les splénocytes des rats receveurs âgés produisent significativement plus d'IFN gamma, d'IL-2 d'IL4 de TNF alpha. Les cellules T mémoires produisant de l' IFN gamma sont par ailleurs plus nombreuses chez les vieux rats ainsi que les cellules allo-réactives dirigées contre le donneur F344 (104).

3.b. Les causes non immunologiques

3.b.1. La qualité du greffon

C'est vraisemblablement la pierre angulaire des causes non immunologiques de NCT. En effet, c'est grâce à l'étude de Terasaki et al publiée dans le journal transplantation en 1999 que la qualité du greffon a été mis au premier plan des facteurs de risque de perte des greffons. Dans cette étude, la survie à 3 ans des greffes entre époux est supérieure à celle des greffes de cadavre en général et similaire à celle des greffes de cadavre HLA identique avec démarrage immédiat du greffon et à celle de greffes apparentées. Cette meilleure survie des greffons de donneur vivants non apparentés ne peut donc pas être expliquée par la compatibilité HLA qui est pauvre entre époux (ni pas l'âge du donneur, ou l'ischémie froide) mais par la qualité du greffon et l'absence de dommage du greffon attribuable à la mort encéphalique et au prélèvement (figure 11) (105).

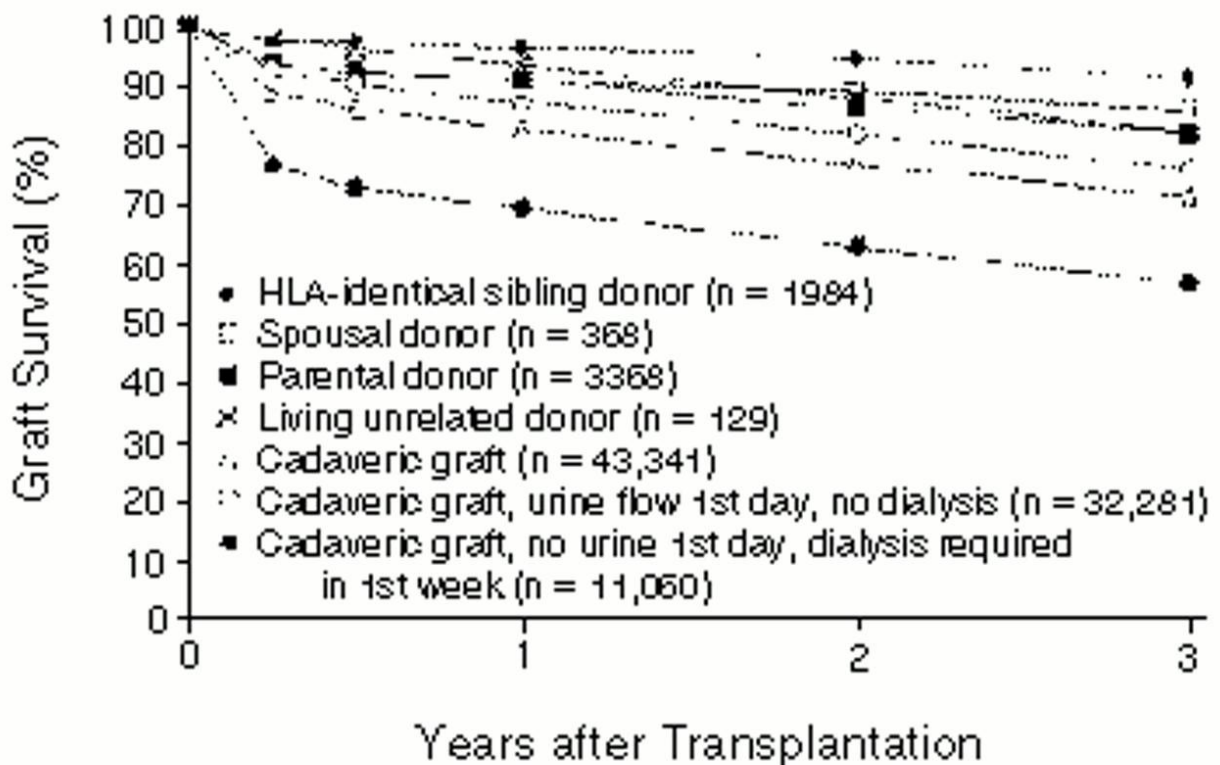
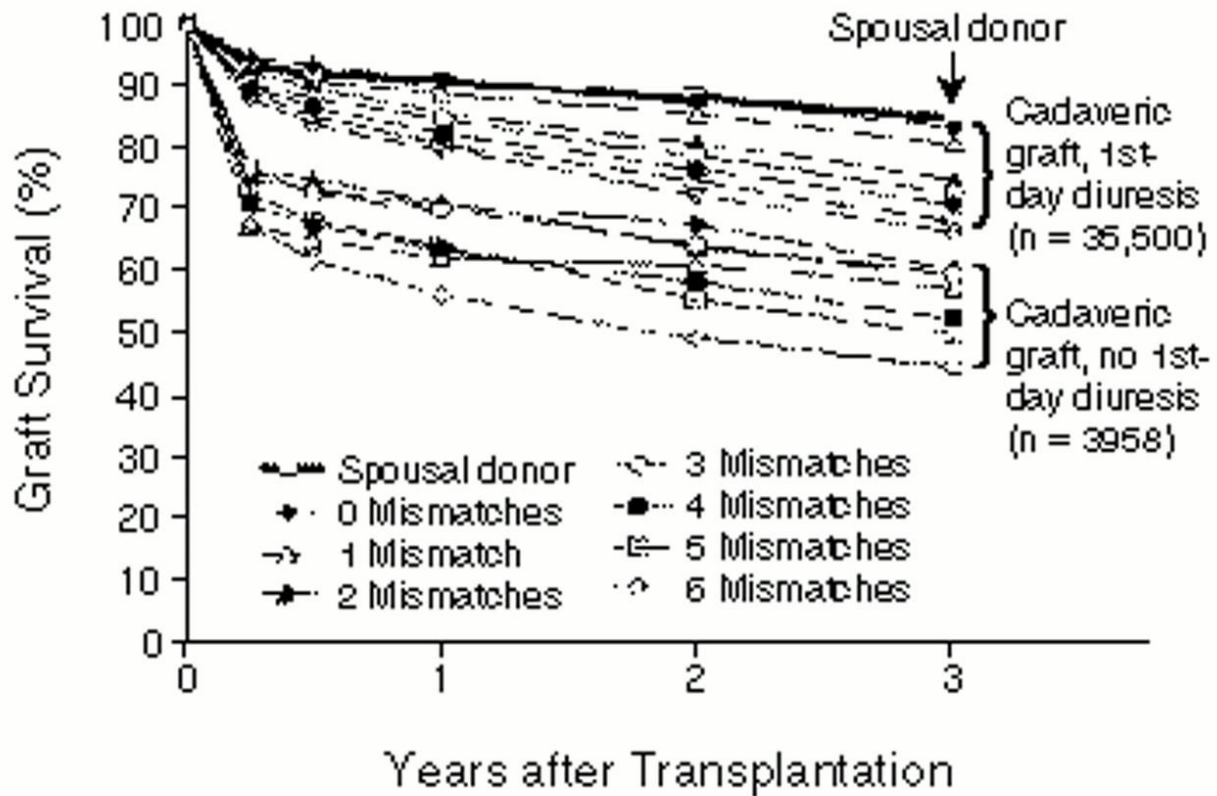


Figure 11 : Les greffes entre époux ont une survie similaire à celle des greffes entre apparentés HLA identiques et à celles des greffes de cadavre HLA identique avec démarrage immédiat du greffon . Issue de Terasaki PI et al, N Engl J Med 1995; 333 (6): 333.

3.b.1. 1. Les lésions du donneur

Elles n'entrent pas en soit dans la définition de la NCT, cependant elles l'influencent car elles jouent un rôle dès l'implantation du greffon, sur la structure initiale du rein, puis sur sa fonction et ses réponses aux agressions. Ainsi, l'importance initiale de la fibrose interstitielle dans la survie des greffons est démontrée et doit être prise en compte dans NCT même si elle n'en est pas à l'origine. Remuzzi et al a montré récemment (106) que les caractéristiques histologiques du greffon avant l'implantation pouvaient influencer favorablement la survie du transplant même s'il s'agissait de rein de donneur de plus de 60 ans. Cette étude porte sur le devenir des greffons de 62 receveurs ayant reçu un ou deux greffons évalués histologiquement selon un score histologique de gravité touchant les vaisseaux, les glomérules, les tubules et le tissu interstitiel. Le score est évalué de 0 à 3 en fonction des changements observés sur chaque entité histologique: ie qu'un score de 3 est attribué si 50% des glomérules sont scléreux, si l'épaisseur de la paroi vasculaire est supérieure au diamètre du vaisseau ou si il est occlus, si plus de 50 % des tubules sont atrophiques et si 50% du parenchyme rénal est remplacé par de la fibrose. La somme de ces scores définit le score global du rein de 0 à 12. La figure 12 illustre les scores de gravité différents chez des donneurs du même âge. Les résultats sont en très faveur de l'analyse systématique des greffons âgés de plus de 60 ans et montrent que la survie à long terme de greffons attribués sur la base de l'histologie, est augmentée de 21% par rapport aux greffons attribués sur la base des critères de jugement clinique habituels.

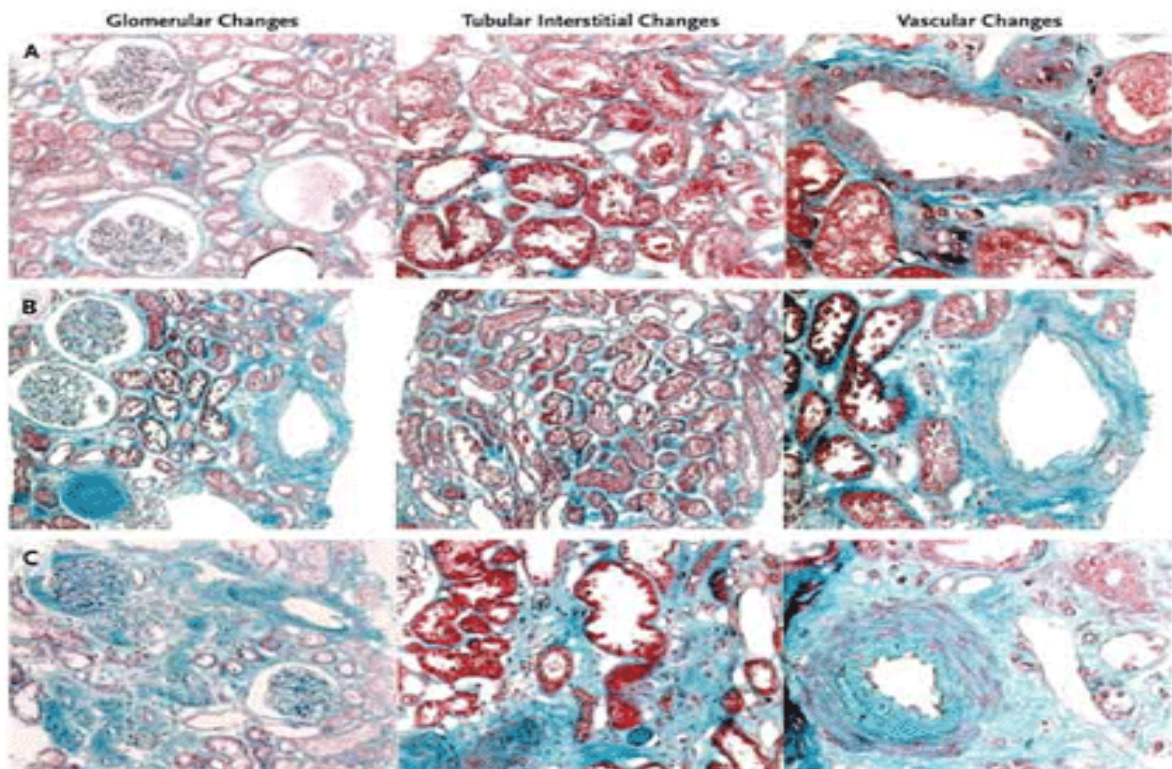


Figure 12 : Cette figure illustre l'importance des lésions du donneur en dehors de toute NCT . Le panel A montre 3 sections d'un rein d'un donneur de 65 ans (score global à 2). Le panel B montre 3 sections d'un rein d'un donneur de 64 ans (score global à 5). Le panel C montre 3 sections d'un rein d'un donneur de 65 ans (score global à 7). A gauche : les glomérules, au centre le tissu interstitiel et les tubules, à droite les vaisseaux. Issu de Remuzzi et al, NEJM 2006 354 (4) : 343

3.b.1. 2. La mort encéphalique

Le syndrome de mort encéphalique est défini par la présence de changements tensionnels brutaux, d'une coagulopathie, d'une hypothermie, de la nécessité d'une assistance ventilatoire et d'aberrations électrolytiques diverses. Il existe plusieurs phases de modifications hémodynamiques. Une première phase hypertensive qui arrive très rapidement au début de la mort encéphalique suivie d'une phase normotensive puis d'une phase d'hypotension. Après une augmentation initiale du tonus parasympathique souvent traduit par des passages en bradycardie, arrive un "orage sympathique" avec libération massive de cathécolamines pouvant altérer la perfusion des organes en raison de l'élévation des résistances vasculaires, modifier les systèmes enzymatiques et produire les radicaux oxygènes libres délétères pour les cellules. La seconde phase qui est la conséquence d'une perte du tonus autonome se traduit par une diminution de l'oxygénation des tissus pouvant causer des dommages ischémiques sévères dans les organes du donneur. La survenue d'un diabète insipide neurogénique serait quant à elle la conséquence d'une interruption de l'axe hypothalamo –hypophysaire et serait accompagnée d'une diminution du taux d'hormones thyroïdiennes et de cortisol circulant, probablement à l'origine de la dysfonction mitochondriale observée à l'échelon cellulaire, chez l'animal mais plus controversée chez l'homme. Ces désordres hémodynamiques et endocriniens pourraient être à l'origine des changements histopathologiques observés dans le rein et notamment l'hyperémie glomérulaire, puis le développement d'une glomérulite et d'une prolifération endothéliale (107). Finalement, la mort encéphalique s'accompagnerait aussi d'une élévation de l'IL6 circulante (108), du TNF alpha et d'une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et des MHC II sur les vaisseaux et les tubules (109) des différents organes. L'effet des différents chocs subis par le greffon durant la phase de mort encéphalique est ensuite aggravé par la phase de prélèvement, de conservation puis de remise en perfusion de l'organe qui conduit au syndrome d'ischémie reperfusion conditionnant entre autre le retard au démarrage des greffons (110).

La prise en charge thérapeutique du sujet en état de mort encéphalique est aussi incriminée dans la genèse des lésions du greffon. En effet, l'utilisation de remplissage vasculaire par des macromolécules de la famille des hydroxethylstarch serait impliquée dans le retard au démarrage des greffons en créant des lésions de type "néphrose lipidique" dans le rein aggravant la tubulopathie (111). D'autres substances par contre, comme la desmopressine utilisée lors de la survenue d'un diabète insipide n'a montré aucun effet délétère sur le greffon en terme de fonction (112). Quant à l'effet des cathécolamines lors de la réanimation du

donneur, il est plus débattu et dépend du type employé. P Schnuelle et al ont montré sur une population de 2415 patients ayant reçu les greffons de 1489 donneurs en état de mort encéphalique que l'utilisation de drogues vasopressives est significativement corrélée à la cause du décès par traumatisme crânien, aux périodes hypotensives durant la réanimation et à la survenue d'un diabète insipide. L'utilisation de cathécolamines chez le donneur serait un facteur protecteur et serait associé à une augmentation de la survie des greffons à 4 ans alors même que la fonction initiale du greffon serait altérée (notamment avec la norépinephrine) (113). Dans un travail plus récent, le même Schnuelle montre cette fois sur une population unicentrique de 254 receveurs de rein de cadavre que l'utilisation de dopamine durant la réanimation du donneur s'accompagnerait en fait d'une meilleure fonction initiale des greffons et corrèlerait aussi avec une meilleure survie à long terme des greffons (114). La "down regulation" des molécules d'adhésion sur les vaisseaux et les tubules (115) et l'augmentation de l'expression de la heme oxygénase par les cellules endothéliales et tubulaires proximales de manière dose dépendante (montré in vitro) (116) feraient partie des hypothèses pour expliquer l'effet protecteurs de l'utilisation de la dopamine sur le rejet et la NCT (117) (118).

3.b.2. Le DGF/Ischemie froide

La fréquence du retard au démarrage des greffons varie considérablement d'un registre à l'autre en raison essentiellement de l'ambiguïté de sa définition allant de l'anurie complète, au démarrage progressif voire à la fonction immédiate ou complète du greffon. Une définition maintenant communément admise est le recours à au moins une séance de dialyse durant la première semaine post transplantation (119). Cette définition exclut les patients qui présentent une nécrose tubulaire aigue non oligurique et qui ne nécessitent pas forcément de séances de dialyse ou les patients dont le greffon démarre mais qui doivent être dialysés pour une surcharge hydrosodée ou une hyperkaliémie. D'autres définitions comme le volume d'urine, ou la valeur de la créatinémie après 10 jours de greffe ont été aussi avancées. Nous avons proposé dans une étude portant sur une population de 843 patients transplantés à l'ITERT entre 1986 et 1995, une définition du retard au démarrage du greffon en fonction du nombre de jours nécessaires pour qu'il atteigne une clairance calculée selon la formule de Cockcroft supérieure ou égale à 10 ml/min au moins 48 heures après la dernière séance de dialyse. Nous avons montré que cette définition nous permettait de quantifier un seuil de DGF délétère pour la survie des greffons au delà de 6 jours alors qu'avant 6 jours quelques soit le délai de DGF il n'y avait pas de différence d'impact sur la survie. Enfin, nous pensons que cette définition

permet d'être plus précis sur le DGF que celle qui est basée sur l'existence d'au moins une dialyse dans la première semaine post greffe. En effet dans notre série 10% des patients ayant un DGF \leq 6 jours (non à risque sur la survie des greffons) étaient dialysés au moins une fois pour hyperkaliémie ou hyperhydratation, tandis que 12.5% des patients n'étaient pas dialysés alors que leur DGF était supérieur à 6 jours et que la survie de leur greffon était similaire à celle des patients dialysés avec un DGF $>$ 6 jours (120).

La traduction histologique du syndrome clinique qu'est le retard au démarrage du greffon est la nécrose tubulaire aiguë. Dans son histoire naturel de la NTC, Nankivell rapporte que la nécrose tubulaire aiguë est présente dans 22.7% des biopsies faites avant l'implantation du greffon et est associée statistiquement avec la NCT à 1 mois (55% des greffons avec nécrose tubulaire versus 28% sans nécrose tubulaire, $p < 0.001$). Il distingue ainsi deux phases de progression de la NCT. Une phase précoce dans laquelle les lésions tubulo-interstitielles ischémiques, les rejets aigus et infracliniques conditionnent les lésions de NCT modérée à 1 an et sont présentes chez 94% des patients. La seconde phase survient après 1 an et touche la microvascularisation avec apparition d'une hyalinose artériolaire et des capillaires péri-tubulaires ainsi que les glomérules et l'interstitium qui deviennent scléreux. La néphrotoxicité des anticalcineurines et les rejets infracliniques semblent majoritairement à l'origine de cette seconde phase plus tardive de la NCT (21).

Les explications physiopathologiques du retard au démarrage des greffons sont essentiellement issues d'études expérimentales et principalement rapportées au syndrome d'ischémie reperfusion. Schématiquement, le syndrome d'ischémie-reperfusion est responsable de l'augmentation de la production d'interféron gamma, d'interleukine 10, de TGF β , de GM-CSF associée à l'augmentation de l'expression des molécules de classe I et II du CMH sur les cellules présentatrices d'antigènes du greffon. Ceci ayant pour conséquence d'augmenter l'immunogénicité des greffons et le risque de rejet aigu puis de néphropathie chronique du transplant (NCT). De plus les lésions de l'épithélium tubulaires conduisent à une augmentation de l'expression de molécules dites de la « réparation » (insulin-like growth factor, epidermal growth factor) qui génèrent de la fibrose, substratum de la NCT (voir revue de G Remuzzi Lancet 2004). Le complément, médiateur majeur de l'immunité innée anti infectieuse et inflammatoire, est aussi impliqué dans la genèse des lésions d'ischémie-reperfusion. L'activation du complément survient précocement en cas d'ischémie-reperfusion et concerne essentiellement la voie alterne, conduisant à la libération d'anaphylatoxines et de facteur 3a et 5a puis au complexe d'attaque membranaire (C5b-9). Des modèles expérimentaux récents ont montré que les lésions d'ischémie-reperfusion dans différents type

d'organes conduisaient à l'activation des trois voies du complément ((121), ((122), (123). Enfin des arguments indirects ont permis de montrer l'implication de la voie classique du complément. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la C1 esterase (qui bloque la voie classique du complément) s'est avérée efficace dans la diminution de l'activation du complément et des lésions d'ischémie reperfusion dans le foie ((124) et le myocarde ((125). Il a été montré dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le chat que l'utilisation de C1 inhibiteur diminuait de 65% la taille de la zone infarctée par rapport à l'utilisation d'un placebo ((126), probablement en rapport avec la diminution de l'infiltrat de neutrophiles.

Les facteurs explicatifs de la survenue d'un retard au démarrage des greffons sont maintenant assez bien connus comme l'utilisation d'inotrope chez le donneur (en dehors de la dopamine (114)), l'hypovolémie du receveur, l'immunisation anti HLA et la re-transplantation, les facteurs prothrombotiques (127) et essentiellement la durée de l'ischémie froide comme le montre Herrero-Fresneda et al dans une combinaison de rat Lewis recevant soit des reins allogéniques Fisher soit des reins syngéniques Lewis transplantés après 5 heures d'ischémie froide. Dans ce modèle, il apparaît clairement que les lésions structurelles chez les rats ischémiques sont interstitielles de type NCT avec augmentation de l'infiltrat macrophagique et de l'expression de TGFβ1, que la combinaison soit allogénique ou syngénique tandis que les lésions de vasculopathie et de glomérulosclérose touchent préférentiellement les greffons allogéniques. L'association de lésions ischémiques et allogéniques accélèrent considérablement la progression expérimentale de la NCT (128).

3.b.3. L'Effet du sexe du donneur et du receveur

Les premières études qui rapportent l'effet du sexe sur la survie des greffons remontent aux années 1990 et montrent une moins bonne survie des greffons à court et à long terme quand un rein de donneur femme est transplanté chez un receveur homme (129). Ces observations sont confirmées ultérieurement sur de plus larges séries qui confirment que la survie des premières transplantations est significativement moins bonne quand le rein provient d'un donneur féminin quelque soit le sexe du receveur et voire qu'elle est pire lorsque le receveur est de sexe masculin (130). L'explication la plus répandue de cet effet du sexe du donneur sur la survie des greffons concerne l'inadéquation entre la "dose de néphrons" et la masse du receveur (131) (132) (133). En effet, les études anatomiques sur les reins de femmes montrent qu'ils sont moins gros et ont moins de néphrons que les reins d'homme mais cette observation n'est plus valable lorsque la taille du rein est corrigée par la surface corporelle chez l'homme (pas chez l'animal) (134) ((135). Cependant l'inadéquation entre la taille du rein et la masse

du receveur, ne semble pas être le seul facteur explicatif de l'effet du sexe du donneur sur la survie du greffon. En effet, quelques études montrent que l'incidence du rejet aigu est plus élevée chez les receveurs masculins qui ont reçu un rein de femme (136) (130) Une hypothèse issue de modèles animaux suggère que les reins de femelles expriment plus d'Ag HLA et seraient ainsi plus antigéniques que les reins de mâles (137).

L'effet du sexe est aussi retrouvé chez le receveur indépendamment du donneur comme le montre l'étude de Meier Kriesche portant sur 73477 patients où les receveurs masculins sont plus à risques de dysfonction chronique des greffons que les receveurs femmes (138). Cet effet a été récemment confirmé sur une population de 512 premières greffes de reins dans un seul centre où il est montré que la perte des greffons due à une NCT est corrélée à la créatinémie, à la présence d'anticorps anti HLA de classe II, au rejet aigu, et au sexe masculin du receveur (RR = 3.6) (64). Une hypothèse hormonale pourrait être à l'origine, au moins en partie de cette observation. En effet, dans un modèle animal de rats mâles Lewis castrés, des reins de rats Fisher mâles et femelles sont transplantés orthotopiquement. Les receveurs reçoivent soit de la testostérone, soit de l'oestradiol, soit un tampon. Les rats traités par testostérone présentent une protéinurie et une glomérulosclérose, ainsi qu'une sur-expression dans le greffon de TGF β 1 et du PDGF A et B significativement augmentés par rapport aux témoins traités par oestradiol et tampon indépendamment du sexe du donneur. C'est la dihydrotestostérone qui serait le médiateur délétère pour le greffon, son inhibition augmentant la survie du greffon (139). Ces résultats chez l'animal suggèrent que l'effet des hormones sexuelles du receveur serait plus à l'origine de la NCT que l'effet propre du sexe du donneur (140).

3.c. Les facteurs de progression

3.c.1. La protéinurie facteur de progression de la NCT

La protéinurie rencontrée dans la dysfonction chronique des greffons serait due à une altération de la perméabilité des glomérules. Lorsque la protéinurie est inférieure à 1 gramme par jour, les épreuves de filtration des molécules de dextran (sélectivité de taille) et de dextransulfate anionique (sélectivité de charge) semblent en faveur d'un défaut isolé de la sélectivité de charge des glomérules. Les protéinuries d'un niveau néphrotique (rencontrées dans la glomérulopathie d'allogreffe) seraient dues à un défaut de sélectivité de charge mais aussi de taille des protéines. Cette séquence est similaire à celle observée sur rein natif dans la glomérulopathie diabétique par exemple (141). L'existence d'une protéinurie 1 an post greffe

serait corrélée avec la perte des greffons mais aussi avec le décès (142). Dans une étude récente de Fernandez-Fresnedo et al, portant sur 3365 patients, la protéinurie à 1 an post greffe a été analysée en fonction du seuil (<0.5, 0.5- 1 g, > 1 g/ jour). Les résultats montrent qu'à 1 an, 15.3% des transplantés présentent une protéinurie. La survie des greffons est corrélée à la présence mais aussi au degré de la protéinurie (143). Même des protéinuries précoces (avant 3 mois) et de faibles taux (0.1g/24h) seraient prédictives de perte accrue des greffons (144). La protéinurie est maintenant clairement identifiée comme un des principal facteur de progression de l'insuffisance rénale chronique (même en dehors du cadre de la néphropathie diabétique). Cette observation est étayée par l'effet des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (ACE) qui semblent être le principal facteur prédictif du ralentissement de la progression de l'insuffisance rénale chronique (145) (146, 147). In vitro, le dépôt de protéines sur une monocouche de cellules tubulaires proximales induit la synthèse de peptide vasoconstricteur comme l'endothéline 1 (ET1) mais aussi de médiateurs de l'inflammation et de la fibrose. Parmi ces molécules ont été identifiés comme étant suréxprimées dans les cellules tubulaires proximales MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (148) et RANTES. L'albumine elle même surrégule par ailleurs l'expression et la production d'IL8 (149), puissant chimioattractant des neutrophiles et des lymphocytes. De plus, la dysfonction de la perméabilité glomérulaire permet aux facteurs du complément (dont la fraction C3 qui est par ailleurs aussi synthétisée par les cellules tubulaires rénales) d'être ultrafiltrée et d'arriver dans l'espace urinaire et le tubule proximal. L'excès d'ultrafiltration de C3 combiné à sa synthèse excessive par les cellules tubulaires proximales (notamment en présence de transferrine) pourraient être à l'origine des lésions inflammatoires médiées par l'infiltration interstitielle de cellules mononuclées. En effet les gènes du TGF β 1 et du collagène serait surrégulé in vitro par le C3a. De plus, l'activation des fractions C5b9 entraine la surrégulation des protéines de la matrice extracellulaire (collagène IV et fibronectine). Enfin, Il a récemment été montré que l'expression de certains allèles C3 par les cellules du donneur pouvaient être associés à une moins bonne survie des greffons (150) (151). Finalement, l'attraction des macrophages par les cellules tubulaires et leur relargage de TGF β 1, PDGF, ET1 serait probablement à l'origine des mécanismes de la fibrose intertistielle. En effet, le TGF β stimule la transformation des cellules épithéliales en cellules myofibroblastes (EMT) (confere chapitre 2 a 6) (voir revue M. Abbate JASN 2006) (152).

3.c.2. L'hypertension artérielle du receveur

L'hypertension artérielle a un impact négatif sur le survie des greffons (153) Cet effet est dépendant du niveau de gravité de l'hypertension (154) mais aussi de la prise en charge comme le montre G.Opelz et al dans une étude portant sur 24 404 patients greffés entre 1987 et 2000 où il apparaît qu'une diminution de la tension artérielle même plusieurs années après la transplantation est associée à une augmentation de la survie des greffons et des patients (155). Au niveau du greffon, l'hypertension artérielle est associée à une augmentation des index de resistances (156), eux mêmes utilisés pour diagnostiquer la NCT (157). La mesure des index de resistances du greffon étudiés sur 601 patients au moins 3 mois après la greffe montre qu'ils ont une corrélation directe essentiellement avec la pression artérielle systolique. En effet, issue de la même étude, l'analyse histologique des greffons montre qu'il existe une corrélation directe entre l'index de resistance, le degré de NCT et le score de l'artéropathie chronique du greffon mais pas, par contre avec le score de glomérulosclérose (rejet chronique vrai) (158). Il a été montré par ailleurs que le niveau de pression artérielle peut être utilisé pour identifier les patients à risque de rejet aigu durant la première année de greffe. En effet, l'analyse hebdomadaire de la tension artérielle après la greffe indiquerait que l'élévation de la TA précède l'apparition du rejet aigu d'au moins 3 semaines, suggérant que la TA peut être un facteur prédictif d'apparition du rejet aigu et n'en est pas une conséquence. Deux hypothèses sont proposées par les auteurs pour expliquer la corrélation entre l'HTA et rejet aigu. La première découlerait des lésions acquises du greffon conséquence du syndrome d'ischémie reperfusion qui serait à l'origine de l'élévation tensionnelle et de l'immunogénicité du greffon connue pour augmenter risque de rejet aigu et de NCT. La seconde hypothèse qui n'est pas étayée serait que la pression artérielle élevée serait en soi un facteur de risque de rejet aigu. Un argument allant dans ce sens serait la réduction de l'incidence des rejets aigus chez les patients traités par antihypertenseurs comparée au patients non traités (159) Des études récentes montrent de plus que le polymorphisme génétique du système renine angiotensine (variant DD de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) est associée avec un risque accru de développer une NCT (160). Un modèle récent de transplantation chez le rat montre que le blocage du récepteur de l'angiotensine II de type 1 par candesartan peut retarder la progression de la NCT (protéinurie, grade histologique, cellules apoptotiques) significativement plus qu'un inhibiteur calcique ou qu'un inhibiteur de type 2 (161). Finalement, il est montré que d'autres facteurs de progression indépendant de l'HTA sont impliqués dans la NCT. C'est le cas de l'apport salé comme le montre ce modèle chez le rat transplanté où l'augmentation de l'apport salé de 8% (Fisher sur lewis) comparé à

1% (apport normaux) augmente l'excrétion d'albumine, diminue la fonction rénale à six semaines et augmente les lésions histologiques à 16 semaines (glomérulosclérose, lésions de NCT) indépendamment de la tension artérielle qui est équivalente dans les deux groupes (162).

3.c.3. La dyslipidémie

L'hyperlipidémie est une complication fréquente de la transplantation. Les facteurs de risque de survenue d'une hyperlipidémie après la transplantation sont essentiellement l'âge du receveur, le sexe masculin, le diabète, le traitement par corticoïdes, les inhibiteurs des calcineurine avec en tête la ciclosporine, le sirolimus, l'obésité, la mauvaise fonction rénale et les traitements anti hypertenseurs (163) (164). En transplantation cardiaque, chez les patients qui survivent à plus de 2 ans de greffe, les désordres lipidiques sont les principaux facteurs de risque de développement et de progression de la maladie coronaire du transplant. En transplantation rénale, le rôle de l'hypercholestérolémie dans la perte des greffons est encore actuellement débattu. Une étude évaluant le rôle du taux de cholestérol à un an sur une population de 676 receveurs de rein a été publiée en 2000 et montre que le taux de cholestérol est un facteur de risque indépendant de la survie des greffons et des patients (165). Pour d'autres auteurs l'hypercholestérolémie serait un facteur de risque indépendant de rejet chronique mais restreint au receveur masculin et ayant fait un épisode de rejet aigu antérieur ((166). Cependant, ces études sont contrebalancées par l'étude ALERT, vaste étude interventionnelle, prospective et randomisée qui étudie le devenir cardiovasculaire et rénale de transplantés traités par Lescol (fluvastatine) versus un placebo. Les résultats de cette étude qui porte sur plus de 2000 patients montrent que le traitement par fluvastatine influence significativement le taux de cholestérol LDL (-32% par rapport au placebo) et réduit aussi le risque d'événements cardiovasculaires mais n'a aucune incidence sur la survie du greffon, la fonction rénale et le décès du patient. Cette absence d'effet du traitement par fluvastatine sur le devenir des greffons rénaux était inattendu compte tenu des résultats obtenus en greffe cardiaque et des mécanismes proches entre l'athérosclérose et la NCT. Cependant l'effet des statines que l'on observe en greffe cardiaque pourrait être expliqué par leur introduction précoce après la greffe et leur possible rôle immunosupresseur (ce qui n'est pas le cas de l'étude ALERT où le Lescol est débuté en moyenne à 88 mois post greffe). En effet, il a été montré que les statines possèdent une activité immunomodulatrice en empêchant d'une part, l'induction de l'expression des molécules de classe II du CMH par l'interféron gamma de

manière doses dépendantes (167), d' autre part en bloquant spécifiquement les molécules de LFA1 (leukocyte function antigen 1), costimulateur des lymphocytes T exprimés à la surface des leucocytes et dont le ligand est l'ICAM 1. Les statines en se fixant sur les molécules LFA1 bloqueraient ainsi la costimulation (168) (169).

3.c.4. L'obésité

Plusieurs explications sont intriquées pour expliquer l'effet péjoratif de l'obésité sur la survie des greffons. La difficulté d'ajuster les taux circulants d'immunosuppresseurs du fait du volume de distribution pourrait prédisposer à des sous dosages en traitement et à l'apparition plus fréquente des rejets aigus. Les habitudes alimentaires perturbées et excessives joueraient un rôle dans la progression de la NCT (excès de sel, excès de protéines, hyperlipidémie, hyperinsulinisme, diabète, hypertension). L'effet de la leptine, hormone sécrétée par les adipocytes et corrélée au stock de graisse corporelle est responsable de la stimulation du TGF β 1 dans le rein conduisant à augmenter les dépôts de collagène et la prolifération mésangiale (171). Il a été montré que des injections de leptine chez le rat conduisaient à l'apparition d'une protéinurie et à la progression de la glomérulosclérose. De plus le TGF β mais aussi le TNF alpha sont directement sécrétés par les adipocytes et contribuent à l'inflammation chronique dans le greffon. Enfin l'angiotensine II et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 sécrétés par les adipocytes induisent des lésions endothéliales conduisant à l'artériosclérose et à la glomérulosclérose (172) (173) (174). Enfin l'hyperfiltration du greffon chez le receveur obèse par inadéquation entre la masse du greffon et la masse du receveur contribuerait à la progression des lésions de NCT (175).

3.c.5. Le tabac

Une étude récente montre que 24 % des receveurs de rein fument au moment de la transplantation et continue de fumer pour 90% d'entre eux. Le risque relatif de perte des greffons chez les fumeurs, en dehors des décès, est de 2.3. L'hypothèse physiopathogénique serait une diminution du flux plasmatique rénal du à une probable augmentation de la synthèse de vasoconstricteurs comme l'endotheline et à la diminution de nitric oxyde vasodilatateur. (176) (177)

3.c.6. Le diabète

Le diabète n'est pas une complication rare après la transplantation. En France un diabète post transplantation apparaît chez 25% des transplantés rénaux, mais seuls 7% conservent un diabète permanent. Une étude observationnelle multicentrique française (DIAPASON) portant sur 527 patients non diabétiques avant la greffe, révèle qu'un diabète est apparu chez 7% des patients et met en évidence principalement 4 facteurs de risque qui sont : - un indice de masse corporelle avant la greffe ≥ 25 kg/m², - une hyperglycémie modérée à jeun (critères ADA/OMS) avant greffe, - une sérologie HCV positive, - et un traitement immunosuppresseur d'entretien par tacrolimus (178). L'analyse du registre américains (USRDS) comportant 11659 patients ayant reçu une première transplantation rénale entre 1996-2000 a montré que le risque relatif de perte des greffons chez les patients qui présentent un diabète post transplantation augmente de 46% et de 87% concernant le risque de mortalité (179). Le risque du diabète en post transplantation est essentiellement vasculaire comme le montre une étude française portant sur 357 greffés rénaux chez lesquels 11% ont développé un diabète de novo après la greffe et 34% présentent des événements d'origine athéromateuse (180). Le diabète de novo post transplantation est rapproché du diabète de type 2 dont l'IL6 et la C réactive protéine (CRP) sont maintenant connus pour jouer un rôle majeur dans sa pathogénie. Récemment le polymorphisme du promoteur de l'IL6 (en position 174 (G>C)) a été associé à l'insulinorésistance (181). Le polymorphisme du promoteur de l'IL6 semble aussi impliqué dans la survenue d'un diabète de novo post transplantation comme le montre Jamal Bamoulid et al sur une cohorte de 217 patients rétrospectivement et 132 patients en prospectif. Les résultats de cette étude suggèrent notamment que la capacité de production d'IL6 influence le développement d'un diabète post transplantation (182). Qu'il s'agisse d'un diabète pré existant avant la transplantation ou d'un diabète de novo, il s'agit d'un facteur de progression non négligeable (compte tenu de la fréquence) de la NCT. En effet, les conséquences du diabète touchent les glomérules avec expansion mésangiale et épaissement de la membrane basale associée à une artériosclérose des artéioles afférentes et efférentes. A un stade plus avancée, la protéinurie apparaît et contribue à aggraver les lésions préexistantes (confer chapitre 3.c.3) (183).

3.c.7. L'hyperparathyroïdie

L'hyperparathyroïdie secondaire qui se développe au cours de l'insuffisance rénale chronique est la conséquence de l'incapacité du rein à maintenir une homéostasie entre la parathormone, le calcium, le phosphate et la vitamine D. L'hyperparathyroïdie est associée à des troubles du squelette mais aussi des complications cardiovasculaires, des dépôts calciques dans les tissus mous, des calciphylaxis, une anémie et des anomalies endocrininiennes et immunologiques. En transplantation rénale, l'hyperparathyroïdie est associée à un risque accru de perte de greffon (quand les décès sont censurés). A un niveau de PTH de 90 pmol/L, le risque de perte du greffon est doublé par rapport à un niveau de PTH de 7 pmol/L. Soit les calcifications préexistantes des vaisseaux du receveur et les difficultés anastomotiques du greffon, soit un rôle direct de la PTH sur la paroi des vaisseaux du greffon pourraient être à l'origine de l'excès de risque notamment ischémique. De plus, la parathormone elle même a été montré responsable de la stimulation d'IL6 et de TNF alpha (probablement pour promouvoir la résorption osseuse) pouvant créer un contexte inflammatoire dans le greffon et faciliter la progression de la NCT (184).

3.c.8. L'inflammation chronique et le stress oxydatif

Le rôle de l'inflammation chronique dans la genèse de l'athérosclérose, elle même largement impliquée dans la pathogénie de la NCT est maintenant communément admis. L'étude du taux de CRP (C reactive protéine) comme marqueur de l'inflammation en pré transplantation ou dans le suivi de la transplantation, apparaît significativement corrélé avec la NCT indépendamment des épisodes de rejets aigus (185) (186) (187). Par ailleurs un taux d'IL-6 soluble élevé chez le receveur en prétransplantation serait associée avec un risque accru de nécrose tubulaire aigu suggérant que l' inflammation du receveur pourrait augmenter ce risque et donc en conséquence celui de la NCT.

Le nitric oxyde (NO) est produit par la NO synthétase (NOS) et peut interagir avec les ROS (reactive oxygen species) pour former du peroxy-nitrite qui induit la dégradation des protéines par la formation de nitrotyrosine. ROS a été récemment incriminée dans la physiopathogénie de la NCT. En effet, la présence de NO synthétase induite (iNOS) et endothéliale (eNOS), de nitrotyrosine, et de ROS dans le tissu rénal de 10 patients transplantés rénaux avec perte chronique du transplant a été comparé à 10 patients contrôles. Les résultats de cette étude montrent une augmentation marquée de l'expression de iNOS de ROS et des cellules

nitrotyrosine-positives dans l'interstitium chez les patients transplantés avec perte chronique du greffon (188). La heat shock protéine 27 (HSP) qui jouent quand à elle un rôle antioxydant, antiapoptotique et stabilisateur de l'actine durant les stress oxydatifs serait aussi impliquée dans la pathogénie de la NCT. Une étude récente dans un modèle de NCT chez le rat (fisher 344-Lewis) montre qu'à 6 mois les transplants présentant toutes les caractéristiques cliniques et histologiques de NCT ont une expression protéique de HSP 27 diminuée de 85% par rapport aux contrôles sans NCT. En immunohistochimie, il existe un "shift" de la HSP 27 de la médullaire vers la corticale, représentant probablement une réponse du greffon à l'hypoxie et au stress oxydatif (189).

3.c.9. L'hyperfiltration

La réduction néphronique aiguë expérimentale de la masse rénale chez l'animal ou chez l'homme est responsable d'un mécanisme de compensation morphologique et fonctionnelle dans les néphrons restants (190). Ces changements ont pour but de préserver la fonction rénale et sont caractérisés par une augmentation du flux sanguin glomérulaire et par l'hypertrophie (chez l'adulte) des glomérules et des tubes proximaux dans les minutes qui suivent l'ablation (191), (192)). Après néphrectomie éléargie, certains facteurs contrôlant l'hypertrophie compensatrice du rein restant ont été décrits parmi lesquels, l'hormone de croissance, l'ADH, l'hormone thyroïdienne, les hormones surrénaliennes et parathyroïdiennes, les androgènes, l'angiotensine II, des prostaglandines, l'insuline growth factor-like, le PDGF et l'EGF (193) (194) (195, 196) (197). Dans la réduction néphronique massive (11/12ème) chez le rat, les modifications de l'hémodynamique rénale se traduisent par une hyperperfusion, une hypertension et une hyperfiltration glomérulaire et s'accompagne d'une hypertension artérielle systémique. L'hyperfiltration serait à l'origine de modifications de la perméabilité glomérulaire responsable d'une fuite protéique et d'une glomérulosclérose. Les modèles de réduction importante de la masse rénale entraîne donc une hypertension artérielle et une insuffisance rénale par glomérulosclérose (Hostetter TH AM jour of physiolo 1981). Chez l'homme l'hypertrophie compensatrice avec "hyperfonction" glomérulaire est observée dans les réductions acquises comme la néphrectomie ou dans les oligoméganéphronies ou les agénésies rénales unilatérales (198). L'adaptation du rein restant se traduit par une augmentation de débit de filtration glomérulaire (DGF) atteignant 60-70% du DFG avant réduction dans la semaine qui suit l'ablation. Il existe une augmentation de l'incidence de la protéinurie et de la glomérulosclérose 5 à 20 ans après une néphrectomie. Par contre,

l'insuffisance rénale progressive n'est rencontrée que chez les patients ayant une amputation de plus de 75% de la masse rénale et après plus de 10 ans d'évolution (198) (199, 200) (Hakim, 1984 #203, 201).

La greffe d'un rein unique de cadavre pourrait correspondre à un modèle expérimental de réduction néphronique chez l'homme et conduire par des mécanismes d'hyperfiltration et de protéinurie à la glomérulosclérose et à la progression de la NCT. Il existe des modèles expérimentaux chez le rat qui ont permis de mettre en évidence le rôle propre de la quantité de masse rénale dans les modifications moléculaires et cellulaires complexes qui impliquent des mécanismes immunologiques et non immunologiques qui conduisent à la NCT. N. Tilney et al ont réalisé des iso et des allogreffes dans différentes conformations : Groupe 1/3 N (rat uninephrectomisés + ablation du 1/3 du rein restant). Groupe 1/3 A (rat binephrectomisés + ablation du 1/3 allogreffe restante), Groupe 1A (rat binephrectomisé et transplantés d'une allogreffe ou d'une isogreffe). Groupe 2A (Lew recevant 2 greffons F344). Groupe A+N (une allogreffe + rein droit natif durant toute l'étude, ou groupe A-8 ablation du rein droit natif à 8 semaines de greffe). Il montre que: 1) la réduction de la masse néphronique est significativement associée à l'apparition d'une protéinurie indépendamment de l'immunogénicité du greffon, 2) que le poids du greffon d'une allogreffe unique ou d'une isogreffe chez des rats binephrectomisés augmente graduellement dans le temps, 3) que la glomérulosclérose apparaît très tôt et touche plus de 60% des glomérules après 32 semaines d'allogreffe unique (groupe 1A) associée à des lésions artérielles de type épaissement fibro intimal et prolifération des cellules musculaires lisses comparés aux lésions observées dans le groupe de rats qui reçoivent 2 allogreffes ou une allogreffe mais qui conservent un rein natif (groupe 2A ou A+N), 4) que l'apparition de ces lésions est accélérée en cas de réduction néphronique majeure (groupe 1/3 A ou 1/3 N), 5) qu'il existe une augmentation de l'expression des molécules ICAM- 1 et des molécules de classes II du HLA dans le groupe A vers 6 semaines et associés à une infiltration de macrophages localisés dans les glomérules et en périvasculaires entre 12 et 16 semaines essentiellement. 6) Durant cette même période l'expression de TNF alpha, de TGFβ et de PDGF dans les glomérules et sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux augmente aussi significativement. Les mêmes observations en plus accélérées sont observées dans les groupes 1/3A et 1/3 N. 7) finalement l'analyse par RT-PCR montre que les molécules RANTES et endothéline sont exprimées entre 2 et 4 semaines, que MCP-1 précède l'infiltration macrophagique et que l'expression d'IL1, IL6, iNOS, TNF alpha et TGFβ augmente aussi mais plus tardivement. Ces travaux corroborent l'hypothèse du rôle de l'hyperfiltration dans la progression de la NCT en impliquant des

mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont modulés par la masse rénale. Si elle est insuffisante les mécanismes sont accélérés, si elle est adéquate les mécanismes sont moindres et retardés mais finissent par arrivés dans le greffon (202).

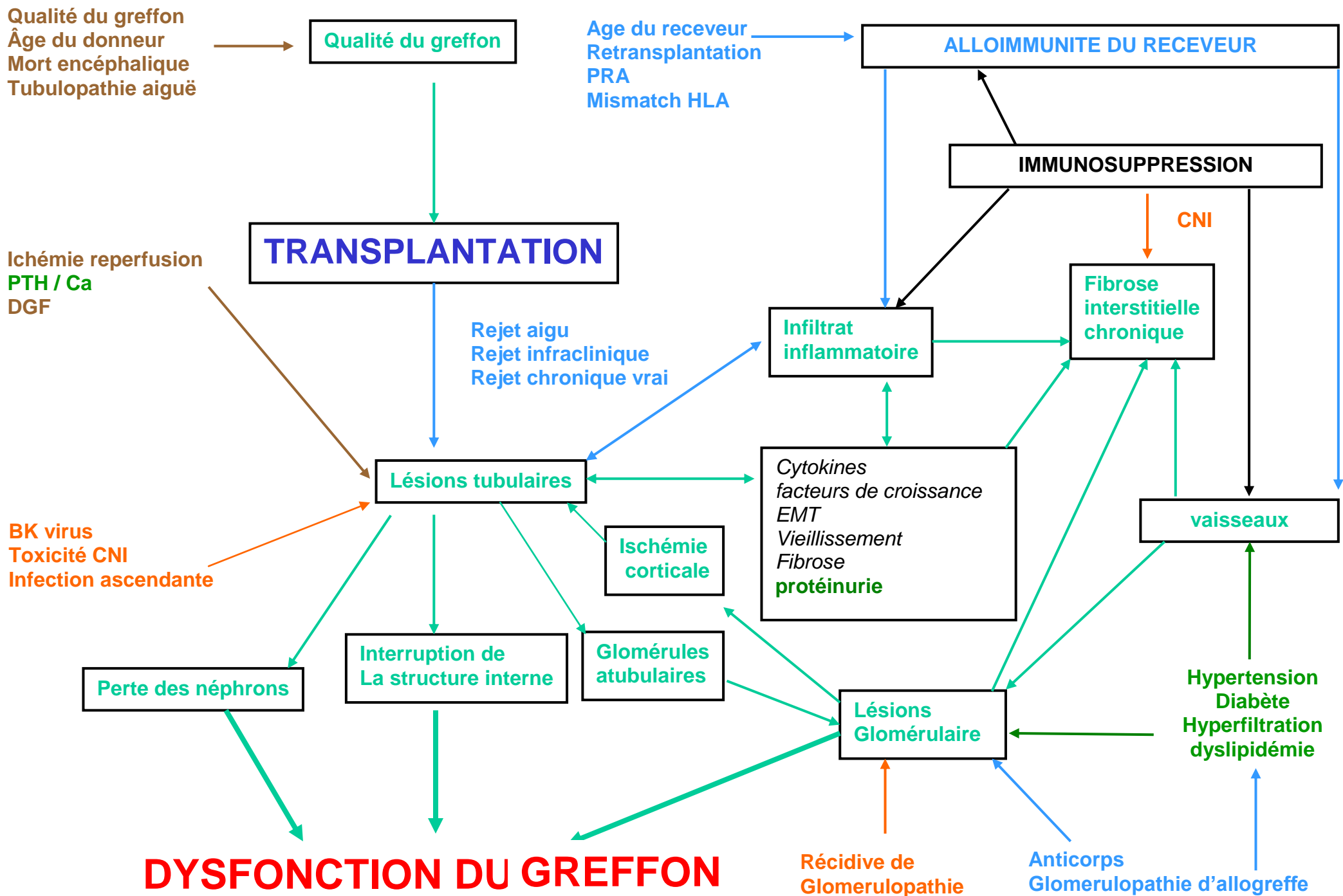


Figure 13 : Schéma récapitulatif de la physiopathogénie de la NCT d'après BJ Nankivell et J. Chapman, *Transplantation* 2006, 81: 643-654

II. Les causes spécifiques de dysfonction chronique des greffons :

1. L'infections à BK virus

Le BK virus est un polyomavirus ayant une haute prévalence mais une faible morbidité chez les individus immunocompétants. Après une première phase d'infestation par le virus, le virus demeure latent dans le tractus urogénital; et l'ADN viral peut être retrouvé dans près de 50% des reins humains mais aussi dans l'épithélium de la vessie, la prostate, le col et la vulve. En post transplantation rénale, le BK virus infecte entre 10 et 70% des patients. L'infection apparaît généralement entre le 3ème et le 12ème mois après la transplantation, est liée à la puissance du traitement immunosuppresseur et conduit à la néphropathie chronique dans environ 1 à 10% des cas (203) (204) (205) . Le virus réplique dans les cellules tubulaires conduisant au détachement, à l'apoptose ou à la nécrose des cellules épithéliales. Ces lésions génèrent un environnement inflammatoire impliquant des monocytes, des polynucléaires, et des cellules plasmacytoides avec effet cytopathogène dont le diagnostic différentiel est le rejet aigu que l'on élimine sur l'hybridation in situ du virus, l'immunohistochimie ou la microscopie électronique. L'évolution de l'atteinte tubulaire se fait vers une atrophie tubulaire avec microcalcification qui se surajoute aux lésions de NCT .

2. La toxicité aux inhibiteurs des calcineurines

La néphrotoxicité des inhibiteurs des calcineurines (ICN) que ce soit la ciclosporine ou le tacrolimus sans distinction se traduit typiquement par une hyalinose artériolaire et de la fibrose interstitielle en bande associée à des microcalcifications se traduisant à terme par un épaissement des petits vaisseaux et une glomérulosclérose ischémique qui reste irréversible même après minimisation des traitements par ICN. Les lésions de néphrotoxicité aux ICN sont quasi universelles après 10 ans de traitement et représente probablement la cause principale de lésions chroniques du transplant (21, 22, 25) .

3. La récurrence de la maladie initiale et la glomérulopathie de novo

La glomérulopathie de novo et la récurrence de la néphropathie initiale représente moins de 10% de perte chronique des greffons à 10 ans. En fonction du type de néphropathie le taux de récurrence est plus ou moins élevé comme c'est le cas de la Hyalinose segmentaire et focale qui récurrence dans 20 à 50% des cas ou de la GNPP dans 30 à 50%. Par contre certaines néphropathies comme le lupus ou quelques vascularites sont quand à elles contrôlées par

l'immunosuppression à viser anti rejet post transplantation. Finalement d'autre néphropathie comme la maladie de berger (néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA) récidivent fréquemment, mais avec une traduction clinique souvent triviale et peu marquée.

La récurrence de la maladie initiale ou la glomérulopathie de novo sont des causes de dysfonctions chroniques des greffons, et sont des diagnostics différentiels de la NCT (206).

5. Le reflux vésico-urétéral.

La fréquence et le retentissement du reflux vésico urétéral sont peu évalués en post transplantation. Les rares études publiées portent essentiellement sur des populations pédiatriques et peuvent montrer des fréquences de reflux vesico urétraux chez plus de 50% des enfants transplantés. Le reflux est associé au risque de survenue d'épisode de pyélonéphrite aiguë (PNA) et à un risque accru de perte des greffons en dehors des épisodes de PNA (207). Il n'est pas exclu que les lésions de néphropathie de reflux que l'on observe sur les reins propres se retrouvent sur les greffons et se surajoutent aux lésions de la néphropathie chronique du transplant. En effet, microscopiquement l'atteinte tubulaire est importante avec atrophie, dilatation, cylindres colloïdes réalisant les images en "tubes pseudothyroïdiens". La fibrose du tissu interstitielle est extensive avec quelques infiltrats de cellules lymphocytaires, surtout dans la médullaire. Dans les zones d'atrophie, les vaisseaux sont le siège d'une endartérite oblitérante et les glomérules sont scléreux. Ces lésions sont la résultante d'infection du parenchyme rénal à répétition mais aussi, peut être de l'hyperpression rétrograde qui à elle seule (en dehors de toute infection) pourrait être responsable de cicatrices corticales.

6. La pyélonéphrite aiguë

Les infections du tractus urinaires représentent la plus fréquente infection bactérienne en post transplantation parmi lesquelles les pyélonéphrites aiguës qui touchent entre 10 et 15 % des patients. L'impact des épisodes de pyélonéphrites aiguës sur le devenir des greffon est controversé (208) (209). Nous avons conduit une étude portant sur 1387 patients transplantés de rein entre 1987 et 1999 dans le but d'étudier les facteurs de risque de survenue d'une pyélonéphrite en post greffe et ses conséquences sur la survie des greffons. Nous présenterons les résultats de cette étude dans la partie résultat et discuterons du possible rôle des épisodes de pyélonéphrites aiguës dans la dysfonction chronique des greffons et dans l'activation du système immunitaire.

B. La base de données D.I.V.A.T. (Données Informatisées et Validées en Transplantation)

Les travaux de recherche épidémiologiques présentés dans cet ouvrage ont été menés sur la base de données en réseau DIVAT dans son ensemble ou partiellement. Les chapitres suivants exposent brièvement la méthodologie de la base DIVAT et son fonctionnement.

1. Historique

La banque de données DIVAT et l'informatisation complète du dossier médical des patients ont été initiées à l'ITERT (L'institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation en 1996. DIVAT, à partir des données sources (dossier médical), permet le recueil en temps réel, de plus de 250 paramètres biologiques et médicaux des patients greffés de rein et de pancréas depuis 1990. Le logiciel original a été dans un premier temps développé sur une application « visual fox pro » avec connexion de tous les postes de l'ITERT sur un serveur « métaframe », l'accès extérieur au serveur ne pouvant se faire que par l'intermédiaire d'un réseau de téléphonie.

Récemment, nous avons re développé le logiciel DIVAT sur un mode Internet permettant, sous réserve d'un accès nécessitant un mot de passe (les données sont cryptées selon le mode https), de pouvoir se connecter à la base DIVAT de n'importe quel poste de travail de travail. A partir de cet outil DIVAT, nous avons ainsi pu organiser un réseau unique en Europe, avec les CHU de Paris Necker, Nancy, Montpellier et Toulouse, Bruxelles et prochainement Lyon (E. Hériot) et le soutien d'IDBC/A2com (société co-fondée par l'ITERT). Ces grands centres de transplantation (plus de 100 greffes de reins par an) mettent en commun cet outil épidémiologique coordonné à Nantes pour créer une base de données unique fonctionnant en réseau, en temps réel via Internet (déclarée à la CNIL, N°10.16.618) et selon la même méthodologie. Dans chaque centre, les données sont saisies en temps réel par des assistants de recherche clinique qui informatisent selon un thesaurus unique plus de 250 items de données médicales, biologiques, thérapeutiques et du suivi des patients greffés de reins et/ou de pancréas.

La qualité des données de la banque DIVAT est validée par la pratique annuelle d'un audit des données informatiques par rapport aux données source. Il s'agit de cross audit mené entre les centres participants à DIVAT (ie : Nancy audite les données de Nantes ; Montpellier audit

les données de toulouse etc...). Le réseau DIVAT est financièrement soutenu par le laboratoire Roche^R dans le cadre d'un contrat de partenariat (montant 100Keuros/an).

2. Projets collaboratifs avec les partenaires du réseau :

Le mode de fonctionnement en réseau du groupe DIVAT permet de développer des projets collaboratifs avec un ou plusieurs centres participants permettant d'augmenter la puissance statistique des études et d'en réduire la durée:

- Le projet Genhomme / PHRC national « évaluation d'un test prédictif de la tolérance chez les greffés de reins à fonction stables » (PI Magali Giral) a été obtenu en 2003 en collaboration avec le centre de DIVAT Necker.
- Le projet « DPRC array » PHRC national 2005 (PI Jean Paul Souillou) a débuté en mai 2006 en collaboration avec l'ensemble des partenaires du groupe DIVAT (Nancy, Necker, Toulouse, Montpellier et Nantes).
- Analyse de survie et facteurs prédictifs des troisièmes greffes rénales (P.I. Maryvonne Hourmant, manuscrit en préparation).
- Analyse du risque pronostic et d'acutisation de gammopathies monoclonales bénignes avant greffe (A. Meurette, P.I. J. Dantal), entre autres

3. Cellule de Biostatistique du réseau DIVAT

La base de donnée DIVAT, est couplée à un outil de statistiques descriptives qui nous permet de connaître de façon approfondie notre population de greffés et d'initier des travaux de recherche sur le devenir des patients et des greffons. Cependant, un abord statistique plus performant mettant en jeu des statisticiens spécifiquement affectés à l'analyse de données de la banque, nous est apparu indispensable pour la réalisation de modèles statistiques complexes voire novateurs dans le domaine de la transplantation. C'est pourquoi nous avons créé une cellule statistique constituée de l'informaticien créateur du logiciel DIVAT, d'un étudiant en 2^{ème} année de thèse de biostatistique encadré conjointement par le Pr JP. Daurès (Laboratoire Epidémiologie et Biostatistique de l'IURC de Montpellier), d'un ARC et de moi même, dévolu exclusivement à l'informatisation des données sur la base DIVAT et des cliniciens ou chercheurs qui souhaitent initier des travaux épidémiologiques dans le cadre de la base DIVAT. Cette cellule accueille par ailleurs des étudiants en Master de biostatistique de

l'université de Vannes pour des stages de 6 mois et maintenant des étudiants médecins ou chercheurs en Master de recherche clinique de l'université de Nantes dans le cadre du CIC biothérapie (branche transplantation rénale).

4. Production scientifique du réseau :

Actuellement les bases de données DIVAT localisées dans chaque centre du réseau permettent aux chercheurs et médecins-chercheurs d'avoir une connaissance précise de l'épidémiologie de leur population de patients transplantés. De plus, le fonctionnement des bases épidémiologiques DIVAT en réseau regroupent les données cliniques et biologiques de plus de 8000 patients et permet d'initier des travaux épidémiologiques sur les facteurs de risques de la dysfonction chronique des greffons sur des paramètres précis et exhaustifs. (M. Giral # J. Am. Soc. Nephrol. 2001, M. Giral # Kidney Int. 2002, S. Coupel # Kidney Int. 2003, G. Karam # Transplantation 2004, M. Giral # J. Am. Soc. Nephrol. 2005, G. Karam # Am. J. Transplant, N. Pallet # Am J. Transplant 2005, Roussey G Am.J.Transplant 2006, M. Giral # en révision à Transplantation août 2006, K. Harzallah (Communication orale, SFT). Y Foucher. # Communication orale Congrès de la Société Française de Statistiques, Pau, Juin 2005. Y Foucher, # Communication orale, 23th International Biometric Conference. Montréal, Juillet 2006. Y Foucher # Communication orale, 27th Annual Conference of the International Society for Clinical Biostatistics. Genève, Aout 2006, V Rousseau # Communication orale, 27th Annual Conference of the International Society for Clinical Biostatistics. Genève, Aout 2006.

RESULTATS

RESULTATS

Les résultats qui figurent dans cette thèse ont fait l'objet de publication d'articles originaux pour deux d'entre eux. Le premier sur l'impacts des épisodes des pyélonéphrites aigus dans est paru dans le journal *Kidney International* (2002) 61, 1880–1886; doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00323. Le second sur le rôle de l'inadéquation entre la masse du greffon et celle du receveur sur la fonction des greffons a été publié dans la revue *JASN* (2005) 16, 261-268. Enfin, le troisième travail présenté dans cette thèse qui porte sur les conséquences de paramètres de réanimation des donneurs sur le retard au démarrage des greffons est actuellement *in press* à *Transplantation*.

Cinquante pourcent des greffons sont perdus de dysfonction chronique. Les causes sont multiples parmi lesquelles la néphropathie chronique du transplant représente l'entité la plus fréquente et la mieux individualisée bien qu'elle même est multifactorielle de cause immunologique et non immunologique et qu'elle est aggravée par les lésions du donneur et par les facteurs de progression vasculaire et métabolique indépendant de la greffe elle même. En nous appuyant sur les données rentrée prospectivement sur la base de données DIVAT - présentée au chapitre 3-, nous avons conduit les trois travaux présentés ici. Le but de ces études est d'apporter des éclairages nouveaux, à partir de populations larges de receveurs de reins de cadavre, sur rôle de certains paramètres dans la dysfonction chronique des greffons en utilisant des méthodes statistiques plus élaborées (études poids des reins et paramètres de réanimation des comas) que le modèle de cox classique.

Nous avons montré sur une population monocentrique de près de 1400 receveurs de greffons rénaux que la pyélonéphrite aiguë est une des complications les plus fréquentes en post transplantation puisqu'elle touche au moins 13 % des patients, préférentiellement les femmes et est essentiellement due à *E.Coli*. L'hypothèse de l'étude était d'analyser si la pyélonéphrite est un déclencheur du "signal de danger dans le greffon" dont les conséquences seraient l'apparition plus fréquente d'épisodes de rejet aigus comme cela a été montré après les épisodes d'infection à cytomégalovirus (210). Nous avons montré sur notre série que non seulement les pyélonéphrites n'étaient pas liés statistiquement à la présence de rejets aigus mais plutôt qu'elles survenaient dans plus de 80% des cas après le rejet aigu et qu'elles étaient corrélées avec l'infection à cytomégalovirus traduisant plutôt un état "d'over

immunosuppression” que de “danger”. Nous avons aussi montré que pris dans leur ensemble les 160 épisodes de pyélonéphrites n’avaient pas de retentissement sur la survie des greffons sauf pour les plus précoces d’entre eux, celles qui surviennent durant les 3 premiers mois post greffe. Enfin, les pyélonéphrites récidivantes seraient plutôt le fait des infections des greffons par le germe E.Coli.

La seconde étude, nous est apparue importante car basée sur un paramètre simple : le poids du greffon rénale et son rôle dans le devenir des greffons en fonction de son inadéquation avec la masse du receveur. En effet, le greffon subit de nombreux traumatismes, durant la réanimation du donneur, puis au cours du prélèvement et enfin lors de la remise en tension vasculaire. C’est un organe fragilisé qui de plus en plus souvent provient de donneur âgé ou polyvasculaire (greffons dits “limites”) et qui va devoir s’adapter à un nouvel organisme pour lequel il n’est pas forcément adéquate par la fonction. La plupart des études qui ont été publiées sur le sujet rapportent des petites séries dans le cadre de donneur vivant. Cette dernière restriction modifie la donne de départ, puisque le rein ne subit pas toutes les contraintes que subit un rein de donneur cadavérique et est sélectionné pour son excellente qualité. En revanche, le rein de cadavre est lui d’emblée en conditions de réduction néphronique en raison de sa qualité de départ. C’est dans ces conditions que le rôle de l’inadéquation entre la masse du rein et celle de son receveur donc des phénomènes d’hyperfiltration majeure apparaissent comme importants à étudier comme facteurs de progression de la NCT. L’hypothèse de l’étude était d’analyser si, dans le cadre de la greffe de donneur cadavérique, on assiste à une réduction néphronique proche de celle obtenue expérimentalement, du fait des multiples chocs que subissent les reins avant l’implantation. Le but de l’étude était d’évaluer les conséquences de l’inadéquation entre la masse du rein et la masse du receveur et les conséquences de l’hyperfiltration des reins sur la fonction précoce et sur la survie des greffons. Nous avons montré que tous les reins greffés augmentent leur filtration dès les premiers mois post greffe et que ce sont essentiellement les petits reins greffés qui hyperfiltrent le plus pour s’adapter à des receveurs de masse corporelle inadéquate. Le manque de recul de l’étude ne nous a cependant pas permis de montrer que cette hyperfiltration des petits reins avait des conséquences sur la survie des greffons, mais qu’il existait une protéinurie très significativement plus marquée dans cette population laissant présager un effet délétère sur le long terme des greffons car traduisant les prémisses de la glomérulosclérose, facteur de progression de la NCT.

Finallement, la dernière étude porte sur le rôle des paramètres de réanimation des donneurs en état de mort encéphalique sur la dysfonction précoce des greffons traduit par le retard au démarrage de l'organe. Quelques études ont été publiées sur le sujet portant sur des paramètres précis (liquide de remplissage, drogue vasoactive) ou sur de petites séries de donneur. Nous avons mené une première étude publiée en 1998 dans la revue *Kidney International* (120), sur l'étude des facteurs de risques de démarrage des greffons sur une population de près de 1000 patients. Cette première étude nous a permis de proposer un critère de jugement du DGF différent de ceux jusqu'alors utilisés comme par exemple le volume de diurèse ou le recours à des séances de dialyse durant la première semaine post greffe. Nous avons montré que notre critère, qui est basé sur une définition fonctionnelle (nombre de jour pour que le greffon atteigne une clearance calculée supérieur à 10 ml/min au moins 48 après la dernière séance de dialyse), permettait de "doser" le DGF. En effet, quelque soit le nombre de jours de retard au démarrage des greffons avant 6 jours, il n'y avait pas d'effet de celui ci sur la survie des greffons. Par contre il existait clairement un cut off à 6 jours, date au delà de laquelle il apparaissait un risque significatif de perte des greffons. De plus ce critères permettait d'être plus précis que le critère "dialyse en post greffe" qui dans près de 10% des cas est réalisée pour hyperhydratation ou hyperkaliémie alors que le greffon est fonctionnel, ou à contrario chez 12% des patients qui ne sont pas dialysés alors qu'ils n'ont aucune fonction du greffon mais qui ont une diurèse conservée donc pas de nécessité immédiate de dialyse. Quelques facteurs de risques ont été corrélés à la survenue d'un DGF prolongé au delà de 6 jours : l'immunisation prè-transplantation et la durée de l'ischémie froide essentiellement. Cependant, l'ensemble des covariables testées n'expliquaient que 8% du modèle. L'hypothèse était que les variables non expliquées par le modèle étaient en fait des paramètres qui se situaient en amon de celles testées, c'est à dire des paramètres retrouvés chez le donneur durant la phase de réanimation ou de prélèvement. Nous avons donc étudié 260 dossiers de réanimation de donneur en état de mort encéphalique en recueillant les paramètres de chocs hypo ou hypertensifs, les drogues vasopressives utilisées, les produits de remplissages utilisés et leur volume en plus des paramètres propres du donneur (âge, sexe, antécédants etc.). Nous avons testé ces paramètres en utilisant un modèle logistique original dit "de fragilité". Puisque notre critère de jugement principal : le DGF n'a pas une définition classiquement admise et par soucis de le valider, nous avons réalisé le modèle selon notre propre critère (DGF en jour avec un cut off à 6 jours) et selon une défintion du DFG de référence (en fonction de la nécessité de dialyser les patients durant la première semaine post greffe). Nous avons montré qu'il existe effectivement des paramètres de réanimation chez les

donneurs qui corrèlent avec le retard au démarrage des greffons qui sont essentiellement, l'utilisation d'adrénaline, le remplissage avec des molécules de la famille des Hydroxyéthylamidons pour des volumes de plus de 1500 ml. Nous avons aussi mis en évidence un seuil d'ischémie froide à 16 heures, beaucoup plus court que celui communément admis. Enfin, l'âge du receveur de plus de 55 ans plutôt que l'âge du donneur est un facteur de risque de survenue d'un DGF. Nous avons aussi montré que notre critère de jugement utilisant le DGF ≥ 6 jours est valide puisqu'il retrouve les mêmes paramètres que dans le modèle utilisant le DGF selon la dialyse post greffe (sous réserve cependant de cut off sensiblement différents et sans que le modèle puisse dire si cette différence est statistiquement significative), mais qu'il est plus précis car il permet d'identifier plus de facteurs de risque, Ce travail est actuellement en révision à la revue Transplantation.

Les résultats sont présentés ci-après et discutés brièvement.

A. Impacts des épisodes de Pyélonéphrites sur la dysfonction des greffons

Kidney International (2002) **61**, 1880–1886; doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00323.x

Acute graft pyelonephritis and long-term kidney allograft outcome

Magali Giral¹, Giovanni Pascuariello¹, Georges Karam, Maryvonne Hourmant, Diego Cantarovich, Jacques Dantal, Gilles Blancho, Stephanie Coupel, Regis Josien, Pascal Daguin, Sandra Méchineau and Jean Paul Soulillou

Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT), Inserm U437 (Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantation), and Service d'urologie, Place Alexis Ricordeau, Nantes, France

Correspondence: Jean Paul Soulillou, M.D., ITERT and Inserm U437, Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantation, 30 bd Jean Monnet, 44093, Nantes, France. E-mail: jps@nantes.inserm.fr

¹Both authors contributed equally to this study and are listed in alphabetical order.

Received 1 August 2001; Revised 7 November 2001; Accepted 17 December 2001.

Abstract

Acute graft pyelonephritis and long-term kidney allograft outcome.

Background

Long-term graft function is the result of multiple parameters, including both immune and non-immune components, which have a beneficial or detrimental potential. Among these, despite its frequency and theoretical interest (expression of "danger signals" in the graft itself), the effects of acute graft pyelonephritis (AGPN) on immediate and long-term outcome have not been studied in a large series. This article reviews a cohort of 1387 consecutive primary renal transplant recipients.

Methods

The objective of the study was to define the risk factor for AGPN, the risk profile for recurrence, and the impact of AGPN on long-term graft survival. According to a higher risk for AGPN in females during their follow-up, statistical analyses (Cox model, and multiple regression analysis) were performed by recipient sex strata.

Results

Multivariate analysis showed that CMV infection was the only risk factor for AGPN occurrence. AGPN occurred in 13% of the graft recipients during their follow-up. Taken as a whole, AGPN was not associated with a significantly poor long-term outcome. However, when assessed in more detail, the outcome of this population was found to be more complex and to depend on several factors. Early AGPN (during the first 3 months) was significantly detrimental for graft outcome, independently of acute rejection episodes. Moreover, *E. coli* involvement in a first episode was linked to an increased AGPN recurrence.

Conclusion

This analysis did not support the concept that with current immunosuppression, strong "danger signals" such as those derived from bacteria within an allograft, are instrumental in initiating acute or chronic rejection.

Keywords

Risk factors, chronic kidney rejection, acute rejection, immunosuppression, transplantation, bacterial infection

INTRODUCTION

The main cause of kidney graft loss is chronic dysfunction, a multifactorial event in which an immunological component¹ and a combination of physiological overload or initial poor quality of the transplant², metabolic disorders (such as hyperlipidemia)³, high blood pressure⁴, and chronic exposure to nephrotoxic drugs have been shown to play a role. Association of independent factors such as delayed graft function (DGF) and the presence of acute rejection episodes further reduces long-term outcome⁵. Identifying the exact respective role of immunological and non-immunological factors is often not clinically possible. A significant proportion of long-term chronically "rejected" kidneys do not harbor activated lymphocytes, even in the absence of immunosuppressive drug administration⁶, suggesting that the immune component of allograft dysfunction may be overestimated. Viral infection, such as cytomegalovirus (CMV), also has been associated with poor long-term outcome although its impact recently was shown to be affected by antiviral prophylaxis⁷ and by the combination of mycophenolate mofetil (MMF) with antiviral drugs⁸.

Another complication that could potentially affect long-term function is urinary tract infection complicated by acute graft pyelonephritis (AGPN), events that are usual following transplantation. Indeed, AGPN can result in interstitial scars with a subsequent reduction in the functional nephron mass. Furthermore, its occurrence represents a theoretical risk of providing strong "danger signals"⁹, associated with bacterial products¹⁰ directly within the graft, thus leading to (re)activation of the host immune system against donor determinants and contributing to subsequent acute or chronic rejection. Due to the lack of studies concerning the impact of AGPN on early and long-term kidney graft outcome in the current literature, we analyzed among a cohort of 1387 consecutive recipients of first kidney grafts, 180 patients who presented one or several episodes of AGPN.

Our current report shows that the risk of AGPN correlates with CMV infection. Taken as a whole, AGPN was not associated with a poor long-term graft survival, however, early AGPN was linked to a decreased graft survival. Additionally, AGPN was not found to be associated with acute rejection episodes, a finding that does not support the commonly held view that under current immunosuppression therapies, strong danger signals can enhance host immune responses.

METHODS

Patients

The aim for our study was to define which pre- and post-graft parameters are risk factors for AGPN occurrence, to evaluate the consequence of AGPN episodes on long-term graft survival, and to investigate whether different types of AGPN have differing effects on graft outcome. A population of 1387 consecutive kidney graft recipients at our center from January 1987 to December 1999 was included in the study. All patients with functioning grafts had a minimal follow-up of one year. Patients were divided into two groups according to the presence (AGPN group) or the absence (no AGPN group) of at least one episode of AGPN. The AGPN group consisted of 180 patients and the 1207 remaining patients were allocated to the no AGPN group. All clinical and biological data were recorded according to a standardized "DIVAT network" (Données Informatisées et VALidées en Transplantation) procedure. A specialized clinical research assistant, who was independent of the medical team, computerized the pre- and post-graft parameters of each patient transplanted in our

center. Recorded data were submitted to an annual medical audit with a level of error remaining below 1%.

Studied parameters

The pre-graft parameters analyzed were: (1) donor and (2) recipient age (≤ 55 vs. > 55 years old), (3) gender, (4) cadaveric or living related donor, (5) number of kidney transplantations (≤ 2 vs. > 2), (6) recipient initial disease (that is, urological malformations were pooled and compared with all other diseases), (7) HLA-A-B-DR incompatibilities (≤ 1 incompatibility vs. > 1), (8) panel reactive anti-T antibodies (PRA; < 25 vs. $\geq 25\%$) and (9) cold ischemia time (CIT; ≤ 36 vs. > 36 hours). Medical events that occurred throughout the follow-up, designated post-graft parameters, were: (1) induction therapy with either ATG, ALG or OKT3; (2) occurrence of one or more acute rejection episodes (defined later in this article); and (3) occurrence of a CMV infection (defined later in this article). Finally, other parameters were studied in the AGPN population including those specifically linked to the AGPN: (1) time of the first AGPN (< 3 vs. ≥ 3 months), (2) type of bacteria implicated in the first AGPN (*E. coli* vs. all other types of bacteria), (3) recurrence of AGPN episodes, and (4) presence of a vesicoureteral reflux (VUR).

Immunosuppressive regimens

Since the study period spans more than a decade, several protocols for induction and maintenance immunosuppression were used. Sixty-three percent of the patients were treated from day one after surgery with a sequential induction [that is, delayed cyclosporine (CsA) introduction] combining polyclonal antithymocyte globulins (rabbit ATG or horse ALG; IMTIX-Sangstat, Lyon, France) or OKT3 (Orthoclone[®] OKT3; $N = 9$; Janssen Cilag), azathioprine (2 mg/kg), or, since 1996, mycophenolate mofetyl (MMF) 2 g/day. Corticosteroids 1 mg/kg/day were given to all patients and doses were decreased by 10 mg every five days down to a dose of 10 mg/day, and withdrawn after three months of follow-up. CsA was introduced on day 10.7 ± 5.7 (range 1 to 42), starting at a dose of 8 mg/kg/day and then adjusted to achieve blood trough levels between 150 and 250 ng/mL as measured by monoclonal radioimmunoassay¹¹. Since 1995, this ATG induction therapy was restricted to patients considered to be at high immunological risk or have DGF (that is, with anti-T PRA $\geq 25\%$, CIT ≥ 36 hours, or recipients of multiple grafts). Azathioprine and MMF doses were adapted according to white blood cell counts. Thirty-five percent of the patients ($N = 493$) received either a sequential induction with monoclonal antibodies against CD4¹², interleukin-2 receptor (IL-2R)¹³, leukocyte function associated antigen-1 (LFA1)¹⁴, or a triple regimen of cyclosporine A, steroids and either azathioprine or MMF without induction. Among them, 50 patients received a peptide derived from the HLA-B2702 (Allotrap[®])¹⁵ during the first ten days following transplantation. Finally, 15 patients (1%) received a deoxyspergualin analog (LF08[®]) for seven days. All patients were treated with an antibioprohylaxis with Bactrim[®] (Trimethoprim-Cotrimoxazol) during the first three months for the prevention of the *Pneumocystis carinii*.

Definition of acute graft pyelonephritis

Acute graft pyelonephritis was defined by the association of fever with one or more of the following clinical symptoms or biological abnormalities: painful graft, chills, cystitis, dysuria, leukocyturia, pyuria, bacteriuria and increased creatinemia. If bacteriuria was not proved due to technical reasons, patients who were treated and responded to an antibiotic therapy course

were included in the study as "intended-to-treat" patients. An association of two antimicrobial agents was used according to antimicrobial susceptibility, first, intravenously until afebrile, then orally for at least three weeks. In the case of recurrent episodes of AGPN, a local consensus recommended urological exploration looking for a vesicoureteral reflux (VUR) but not for a single episode. The immunosuppressive regimen was not modified in the case of one AGPN or recurrence.

Surgical procedures

A ureteral stent was not systematically used during graft surgery, except in the case of poor quality of the ureter or the bladder.

Definition of acute rejection episodes

Acute rejection episodes (AREs) were diagnosed on the grounds at least of clinical symptoms and were confirmed by graft biopsy examination. In a few cases, biopsy sampling was not technically possible and "intended-to-treat" episodes that responded to the treatment also were taken into account. AREs treatment consisted of intravenous corticosteroid (Solumedrol[®]; Upjohn, Paris, France) boluses for five consecutive days, followed by ATG in the event of corticosteroid resistance (that is, stable or increased blood creatinine after the last bolus and the absence of histological improvement).

Definition of CMV infection

Cytomegalovirus infection was defined as the association of fever with one or more of the following clinical symptoms or biological abnormalities: leukopenia, gastrointestinal disease, pancreatitis, hepatitis, pneumonitis, nephritis and/or myalgia/arthralgia. Virological proof of CMV infection was obtained in all patients by rapid viremia (\pm viruria), seroconversion, qualitative DNA polymerase chain reaction (PCR) testing, or histological evidence of endothelial cell inclusion of viral particles. Eighty percent of patients were treated with Gancyclovir[®]. No CMV prophylaxis was administered in this cohort.

Statistical method

Several questions were addressed in this study. (1) What are the risk factors for AGPN? (2) What is the risk profile in patients with recurrent AGPN? (3) Is AGPN a risk factor for graft loss? (4) Do some AGPN characteristics (time of occurrence of the first episode, type of bacteria, recurrence) have a specific impact on long-term graft outcome? When necessary the Cox proportional hazard regression was used to estimate relevant risk factors. Kaplan-Meier analyses were performed in order to obtain additional descriptive curves and univariate log-rank statistics. A logistic regression was performed to assess the risk profile of AGPN recurrence. In addition, because of a strong bias of recipient sex ratio in patients with AGPN and those without AGPN, we performed these analyses by "recipient sex strata." Patients who died during the study period were considered as transplant failure. All tests and confidence limits were performed at an alpha risk of 5%.

RESULTS

Female recipients are at a higher risk of AGPN

Thirteen percent of recipients experienced at least one AGPN episode during their follow-up. The incidence of AGPN did not change over time during the study period: 12.8% (1987–1991), 13.7% (1992–1995), and 12.2% (1996–1999). There was no difference in the demographic characteristics between the AGPN group ($N = 180$) and the no AGPN group ($N = 1207$) as shown in [Table 1](#), except for gender: 65% of females in the AGPN group and 38% in the no AGPN group ($P < 0.0001$). Accordingly, we tested the pre- and post-graft parameters in the Cox model by "recipient sex" strata, to define which independent variables could be associated with the occurrence of a first AGPN episode.

Table 1 - Demographic characteristics according to the presence or the absence of AGPN.

	AGPN (N = 180)	No AGPN (N = 1207)	P value
Recipient age <i>years</i> (range)	43.3±14 (15–71)	44.9±13 (15–73)	NS
Donor age <i>years</i> (range)	36.2±15 (1–66)	37±15 (1–70)	NS
Male donors	119 (66.1%)	846 (70.1%)	NS
Male recipients	69 (38.3%)	785 (65.0%)	0.0001
Recipient age ≤55 years	136 (75.6%)	892 (73.9%)	NS
Donor age ≤ 55 years	160 (88.9%)	1050 (87.0%)	NS
Cadaver donor	172 (95.6%)	1158 (95.9%)	NS
Number of grafts ≥2	172 (95.6%)	1164 (96.4%)	NS
Initial disease ^a	31 (17.2%)	171 (14.2%)	NS
anti T PRA ≥25%	70 (38.9%)	458 (37.9%)	NS
HLA-A-B-DR inc. ≥1	29 (16.1%)	157 (13.0%)	NS
CIT ≥36 h	70 (38.9%)	506 (41.9%)	NS
ATG/ALG/OKT3 induction	112 (62.2%)	801 (66.4%)	NS
Acute rejection episodes >0	55 (30.6%)	340 (28.2%)	NS
CMV infection	53 (29.4%)	285 (23.6%)	NS

Abbreviations are: AGPN, acute graft pyelonephritis; PRA, panel reactive antibodies; HLA, human leukocytes antigen; CIT, cold ischemia time; ATG/ALG/OKT3, polyclonal antithymocyte globulins/or anti CD3 monoclonal antibody; CMV, cytomegalovirus.

^a Urological diseases versus others

Risk profile

Patients who experienced a CMV infection ($P < 0.02$) had an increased risk of AGPN [Table 2](#). Fifty-three patients (3.8%) presented both CMV infection and AGPN. In the majority of cases (67%) AGPN occurred after CMV infection, whereas it occurred before CMV in 25% and at the same time in 8%. [Figure 1](#) shows the time sequence of the occurrence of the first AGPN episode as compared to CMV infection episodes.

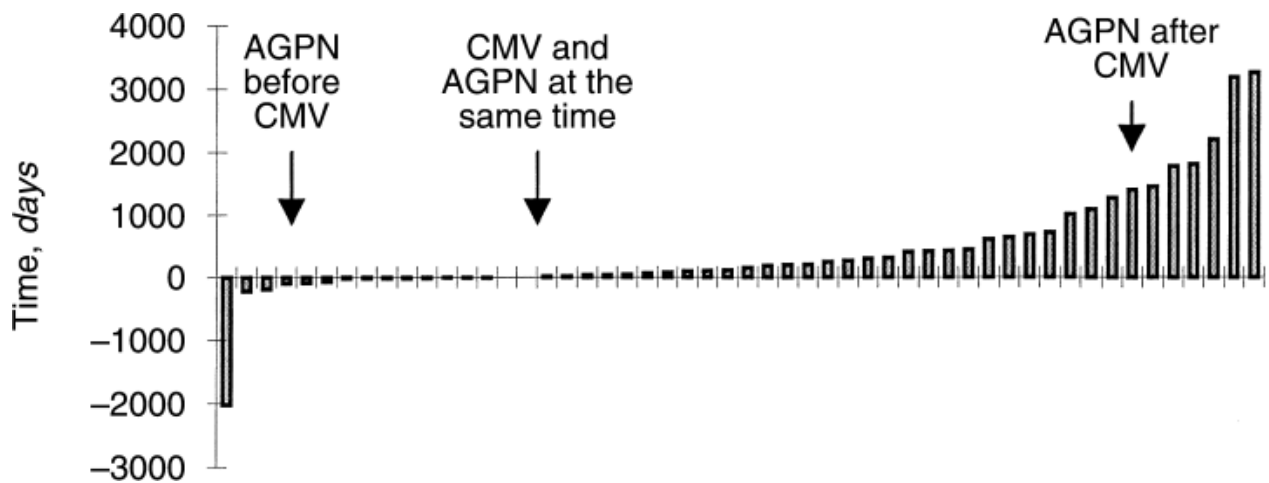


Figure 1 Timing of the first acute graft pyelonephritis (AGPN) episode compared to the first cytomegalovirus (CMV) infection during the follow-up. Sixty-seven percent of AGPN occurred after CMV infection and only 33% before or at the same time. Each bar represents a patient with a first AGPN and CMV infection.

Parameters	Risk ratio	P value	95% Confidence limits	
			Lower	Upper
CMV infection	1.497	0.02	1.072	2.089
ATG/ALG/OKT3 induction	0.725	NS	0.523	1.007
Initial disease ^a	1.128	NS	0.756	1.682
anti T PRA \geq 25%	0.911	NS	0.657	1.262
Acute rejection episodes $>$ 0	1.028	NS	0.732	1.442
CIT \geq 36 h	1.116	NS	0.806	1.547
DGF $<$ 10 days	0.976	NS	0.688	1.384
HLA-A-B-DR inc. \geq 1	0.788	NS	0.506	1.226
Donor relationship	1.382	NS	0.618	3.092
Number of grafts \geq 2	0.942	NS	0.398	2.231
Donor sex	1.214	NS	0.877	1.679
Donor age \geq 55 years	1.001	NS	0.611	1.639
Recipient age \geq 55 years	0.824	NS	0.570	1.193

Table 2 Cox model analysis : risk factor for a first AGPN episode

CMV infection is an independent risk factor for the occurrence of AGPN.

^a Urological diseases versus other

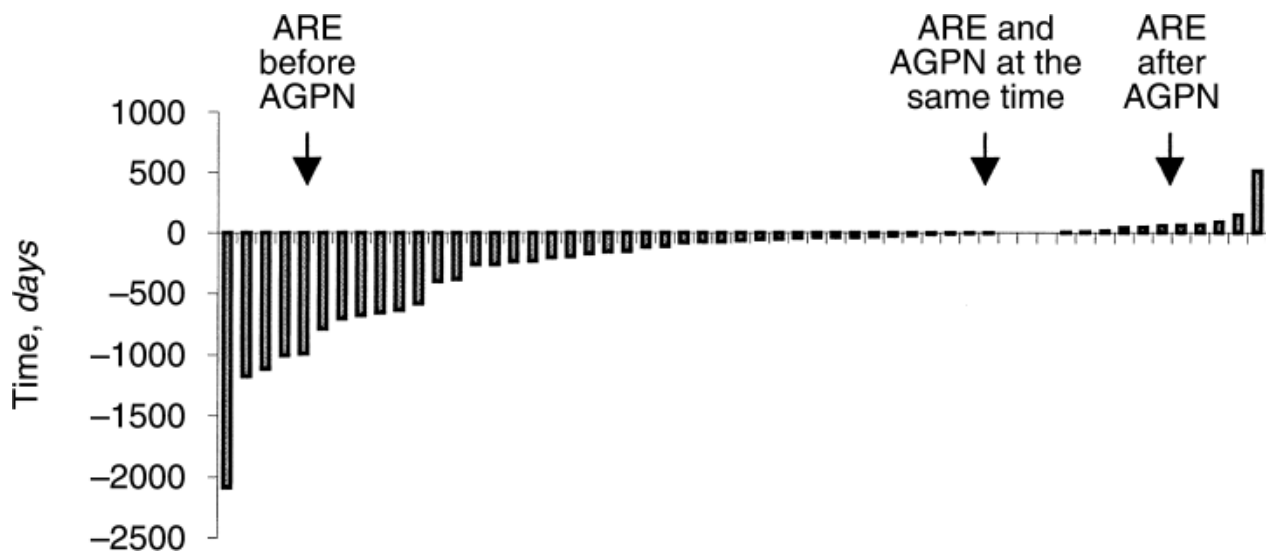


Figure 2 : Timing of the first acute rejection episode (ARE) occurrence as compared to that of the onset of AGPN episodes (in days) during the follow-up. Eighty percent of the first AGPN episodes occurred after the first ARE. Each bar represents a patient with a first AGPN and an acute rejection episode.

The incidence of acute rejection (AREs) did not differ between the two groups: 27% of acute rejection episodes were observed in the AGPN group and 28% in the no AGPN group. When both events (that is, AREs and AGPN) occurred in a patient, AGPN occurred after the ARE episode in 80% of the cases [Figure 2](#). These results suggest that the risk of AGPN may be linked to an over-immunosuppression and do not support the hypothesis that AGPN triggers CMV infection or ARE.

Recurrence of AGPN

One third of patients ($N = 57$) had more than one episode of AGPN. To define the risk factors of AGPN recurrence, we performed a logistic regression in patients who experienced at least one AGPN episode. Given the relatively small size of the patient sample, only tests and confidence limits at an alpha risk of 1% were considered significant. We compared pre- and post-graft parameters according to the occurrence of only one AGPN or more than one (which defined the recurrence). As shown in [Table 3](#), the type of bacteria involved in the first episode was significantly and independently correlated with AGPN recurrence. Indeed, first AGPN episodes were less often linked to *Escherichia coli* in patients with only one AGPN episode (53%) than in patients with recurrence of AGPN (84%; $P < 0.0001$). The other bacteria involved in the first episodes of AGPN in the cases of recurrence were ($N = 1$) Klebsiella, (1) Serratia, (2) pyocyanics, (2) streptococcus, and (3) unidentified. However, recurrent AGPN appeared significantly more often in females (72% recurrent AGPN vs. 57% single episode; $P < 0.05$). Although urological surgical complications (ureteral stenosis or necrosis) occurred in 10.8% of the whole population, the recurrence of AGPN was nevertheless not significantly higher in patients who presented early urological complications after surgery (hematoma,

ureteral necrosis or stenosis; 19%) than in patients who had no recurrence (14%; $P = NS$). Moreover, vesicoureteral reflux (VUR) was radiologically proven in 47% of patients with recurrent AGPN. However, this cannot be compared with its frequency in patients with only one AGPN because a local consensus does not recommend this type of investigation for VUR for a single AGPN.

Variables	Parameter estimate	P value	Standardized estimate	Odds ratio
Recipient age	0.5735	NS	0.134835	1.774
Recipient sex	-0.4199	NS	-0.112775	0.657
Time to 1st AGPN	0.2567	NS	0.122322	1.293
1st AGPN with <i>E. coli</i>	-1.9724	0.0001	-0.526523	0.139
Induction treatment	0.9458	NS	0.253281	2.575
Initial disease ^a	0.7741	NS	0.164149	2.169
Anti-T PRA level	-0.0809	NS	-0.021798	0.922
CMV infection	0.3945	NS	0.100006	1.484
Acute rejection episodes	-0.9236	NS	-0.235422	0.397
Cold ischemia time	-0.3570	NS	-0.096151	0.700
HLA incompatibilities	-0.4400	NS	-0.088287	0.644
Number of grafts	-0.6855	NS	-0.069349	0.504
Donor age	0.00961	NS	0.079141	1.010
Donor sex	-0.0354	NS	-0.009241	0.965
Donor relationship	-1.0922	NS	-0.118999	0.335

Table 3 Logistic regression: Risk factors for AGPN recurrence (comparison of risk factors for one AGPN vs. more than one)

The type of bacteria involved in the first episode of AGPN other than *E. coli* was an independent risk factor linked significantly linked to multiple episodes of AGPN.

^a Urological diseases versus others

Impact of AGPN on long-term graft survival

The ten-year Kaplan-Meier graft survival of the whole population was 60% when death was censored and 72% without death. Due to the high frequency of AGPN in female recipients (see above), all parameters were then tested in the Cox model by "recipient sex strata." Several independent expected parameters were significantly associated with graft loss: multiple grafts >2 (RR = 0.537, CI 0.3–0.9, $P < 0.01$); HLA-A-B-DR incompatibilities >1 (RR = 0.734, CI 0.5–1, $P < 0.05$); donor age >55 years (RR = 1.451, CI 1–1.9, $P < 0.01$); recipient age >55 years (RR = 1.813, CI 1.4–2.3, $P < 0.0001$); occurrence of one or more acute rejection episodes (RR = 2.340, CI 1.9–2.9, $P < 0.0001$), and patients who experienced a CMV infection (RR = 1.399, CI 1.1–1.8, $P < 0.005$). Interestingly, AGPN did not appear to be a significant independent factor influencing graft survival in the whole population [Figure 3](#).

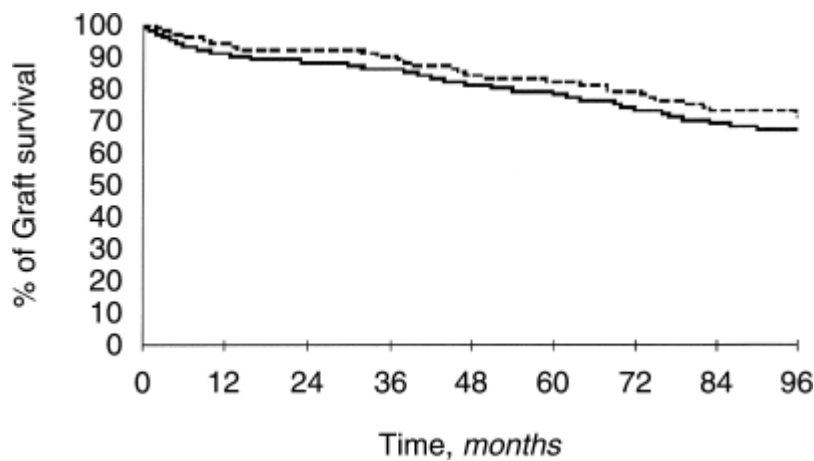
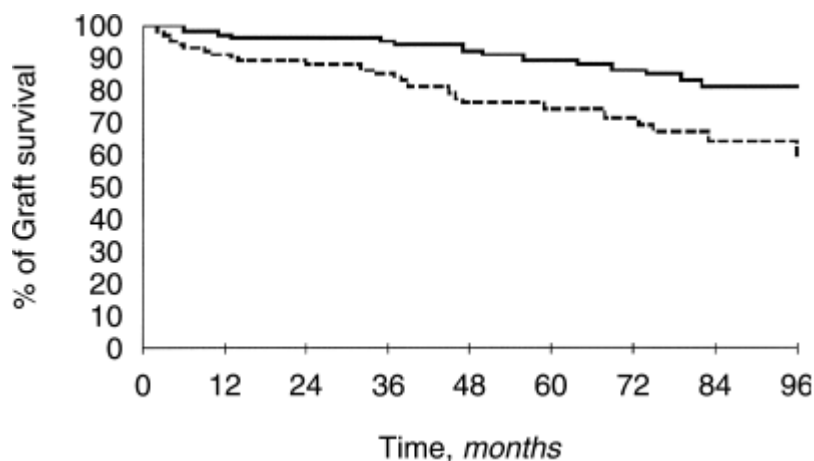


Figure 3 : Kaplan Meier analysis of graft survival according to the presence of at least one AGPN episode (dashed line; $N = 180$) or no AGPN (solid line; $N = 1207$). AGPN is not a significant risk factor for graft loss.

All AGPN have not the same impact on long-term graft survival

A Cox model analysis was performed in patients who presented one AGPN episode to determine whether some types of AGPN could have an impact on graft survival. In this model, all described variables were tested by "recipient sex" strata. As expected, acute rejection episodes (RR = 6.7, CI 2.5–8.5, $P < 0.0002$) was a major risk factor for graft loss as well as induction treatment with either ATG/ALG/OKT3 (RR = 3.7, CI 1.4–9.7, $P < 0.008$) specifically used since 1996 in "at risk patients or in patients presenting a DGF" (**Patients** section in the **Methods**). However, besides the classical variables, interestingly, occurrence of the first AGPN episode during the first three months (30.5%) was also a highly significant independent risk factor for graft loss (RR = 3.6, CI 1.4 – 9.2, $P < 0.007$). [Figure 4](#) also shows the Kaplan-Meier graft survival according to the onset of the first AGPN episode.



Kaplan-Meier analysis of graft survival according to the time of occurrence of the first AGPN episode, before (dashed line; $N = 92$) or after (solid line; $N = 88$) three months. Early AGPN is a risk factor for graft loss and confirmed to be independent of other tested parameters when tested in the Cox model analysis.

DISCUSSION

This report shows that on the whole, AGPN is not associated with poor long-term outcome. However, the population in this study was heterogeneous and several risk and prognostic factors were identified. Long-term graft dysfunction is the primary cause of graft loss¹⁶. If it is well established that the incidence of urinary tract infections is a frequent event (>30%) in the first three months after transplantation with a high risk of pyelonephritis^{17,18}, this incidence may increase further in the future with the strength of immunosuppression. However, to date no study has been specifically devoted to the impact of graft pyelonephritis on graft outcome, in large kidney graft recipient cohorts. AGPN is a fairly frequent complication of kidney transplantation, affecting 13% of the entire transplanted population, and reaches an incidence of 21% in women. Thus, AGPN in women is approximately as frequent as CMV infection (19.6%) or even acute rejection (29.6% in the same female cohort). This strong gender bias was the rationale for focusing our multivariate Cox analysis on the female cohort of graft recipients.

Our study demonstrates that AGPN appears to represent several clinical entities associated with different prognoses according to parameters such as the time of AGPN occurrence and the bacteria involved. Interestingly, when the associated parameters were tested in a Cox model, AGPN episodes appeared to occur more often in patients who experienced CMV infection. This suggests that AGPN could be linked to an over-immunosuppression rather than that it triggers CMV activation¹⁹. Active reflux has long been reported as being significantly associated with poor graft outcome²⁰. However, we could not assess the frequency of VUR in all of the patients because cystography was restricted to only those who presented at least two episodes of AGPN during their follow-up.

Therefore, despite the finding that the analysis of the impact of AGPN performed on the entire recipient cohort does not appear to be significantly detrimental, more detailed studies show that a complex pattern of clinical presentation exists and readily identify pejorative associations that require special clinical attention. Among these and in agreement with some recently published data is the suggestion that low virulent *E. coli* strains may cause urinary tract infection (UTI) more frequently in immunocompromised patients²¹, possibly because of a lower prevalence of G adhesin genes and expression of M adhesin. Accordingly, an efficient prevention of urinary infection during the first three months following transplantation¹⁷ could be recommended as well as early catheter removal²², systematic examination for reflux at the first AGPN, and prevention of recurrent infections by long-term antimicrobial prophylaxis¹⁹.

Special attention must be paid if the first AGPN is due to *E. coli* or if the first episode of AGPN occurs early after surgery. However, the opposite and potentially pejorative effect of selecting multi-resistant antibacterial drugs makes a firm recommendation for this therapy difficult.

Another unexpected finding of this study was that the occurrence of AGPN was not associated with an increased incidence of acute rejection (or chronic rejection onset) in the multivariate analysis and did not initiate graft rejections. In fact, the impact of AGPN on long-term function appeared to be related more to the direct deleterious effect of bacteria, possibly linked to the urological prosthesis and/or nosocomial infection during the early post-transplantation period. However, interestingly, in our case-by-case study on the 180 AGPN patients, only very rare acute rejections were observed following the acute bacterial infection

episodes. This suggests that "danger" signals could not be as important (in the current immunosuppression conditions) as previously thought or that some regulatory mechanisms that take place following transplantation²³, are efficient. Finally, the fact that AGPN episodes that do not occur in the context of the specific risk factors identified (CMV, strong induction) are associated with a remarkable long-term graft outcome also suggests the possibility that they occur in patients with a "low responder phenotype" responsible for both the occurrence of urinary tract infection and the decreased incidence of chronic rejection. However, the facts that these patients did not show a significantly better outcome, did not exhibit a significantly low incidence of panel reactive antibodies, and did not present an increase in other infectious episodes, contradicts this hypothesis.

In summary, AGPN is a frequent event after renal transplantation, especially in women, but generally does not appear to be deleterious for long-term graft survival. Our analysis reveals a diversity of situations and shows that their impact on graft outcome is complex and depends on several parameters. Taken together, our data suggest that AGPN is a consequence of an over-immunosuppression of the patients, which probably explains why they do not initiate rejection.

References

References

1. Massy Z, Guijarro C & Wiederkehr M *et al.* Immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int* 1996; **49**: 518–524. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
2. Karpinski J, Lajoie G & Cotran D *et al.* Outcome of kidney transplantation from high-risk donors is determined by both structure and function. *Transplantation* 1999; **67**: 1162–1167. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
3. Wissing K, Abramowicz D & Broeders N *et al.* Hypercholesterolemia is associated with increased kidney graft loss caused by chronic rejection in male patients with previous acute rejection. *Transplantation* 2000; **70**: 464–472. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
4. Opelz G, Wucjiack A & Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. *Kidney Int* 1998; **53**: 217–222 [10.1046/j.1523-1755.1998.00744.x](https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00744.x). | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
5. Giral M, Hourmant M & Cantarovich D *et al.* Delayed graft function of more than 6 days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Int* 1998; **54**: 972–978. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) |
6. Gagne K, Brouard S & Giral M *et al.* Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 2000; **164**: 1553–1563. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
7. Lowance D, Neumayer H & Legendre C *et al.* Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1462–1469. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
8. Giral M, Nguyen J & Daguin P *et al.* Mycophenolate mofetil does the incidence of CMV disease following kidney transplantation but prevents CMV induced chronic graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1758–1763. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
9. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 991–1045. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
10. Janeway CJ. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from non infectious self. *Immunol Today* 1992; **1**: 11–16.
11. Dantal J, Hourmant M & Cantarovich D *et al.* Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipient on cancer incidence: Randomized comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998; **351**: 623–628. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
12. Dantal J, Ninin E & Hourmant M *et al.* Anti-CD4 MoAb therapy in kidney transplantation—a pilot study in early prophylaxis of rejection. *Transplantation* 1996; **62**: 1502–1506. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
13. Souillou JP, Cantarovich D & Le Mauff B *et al.* Randomized controlled trial of a monoclonal antibody against the interleukin-2 receptor (33B3.1) as compared with rabbit antithymocyte globulin for prophylaxis

- against rejection of renal allografts. *N Engl J Med* 1990; **322**: 1175–1182. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
14. Hourmant M, Le Mauff B & Le Meur Y *et al.* Administration of an anti-CD11a monoclonal antibody in recipients of kidney transplantation. A pilot study. *Transplantation* 1994; **58**: 377–380. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
 15. Giral M, Cuturi MC & Nguyen JM *et al.* Decreased cytotoxic activity of natural killer cells in kidney allograft recipients treated with human HLA-derived peptide. *Transplantation* 1997; **63**: 1004–1011. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
 16. Suthanthiran M & Strom T. Medical progress: Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994; **331**: 365–376. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
 17. Tolkoff-Rubin N & Rubin R. Urinary tract infection in the immunocompromised host. Lessons from kidney transplantation and the AIDS epidemic. *Infect Dis Clin North Am* 1997; **11**: 707–717. | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
 18. Takai K, Tollemar J & Wilczek H *et al.* Urinary tract infections following renal transplantation. *Clin Transplant* 1998; **12**: 19–23. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
 19. Reinke P, Prosch S & Kern F *et al.* Mechanism of human cytomegalovirus (HCMV) (re) activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis* 1999; **1**: 157–164. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ChemPort](#) |
 20. Mathew T, Kincaid-Smith P & Vikraman P. Risks of vesicoureteric reflux in the transplanted kidney. *N Engl J Med* 1977; **8**: 414–418.
 21. Karkkainen U, Ikaheimo R & Katila M *et al.* Low virulence of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in renal disease patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**: 254–259. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
 22. Rabkin D, Stifelman M & Birkhoff J *et al.* Early catheter removal decreases incidence of urinary tract infections in renal transplants recipients. *Transplant Proc* 1998; **30**: 4314–4316. | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |
 23. VanBurkirk A, Burlingham W & Jankowska-Gan E *et al.* Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000; **106**: 145–155. | [PubMed](#) | [ISI](#) | [ChemPort](#) |

[Top of page](#)

Acknowledgments

We thank Mr. Philippe Richardot (Adclin, 350 rue Lecourbe, 75015 Paris, France) for auditing the statistical calculation supported by Novartis Pharmaceutical Company.

DISCUSSION

La pyélonéphrite (PNA) est la plus fréquente infection bactérienne sévère rencontrée en post transplantation (entre 10 et 20%). Une hypothèse communément admise serait que la PNA, infection du parenchyme rénal par des agents pathogènes bactériens pourrait être à l'origine d'un risque théorique de "signal de danger" et donc déclencher les conditions nécessaires à la survenue d'un épisode de rejet aigu. Très peu d'études cependant ont montré, sur de grandes séries de patients, l'épidémiologie des PNA permettant de vérifier cette hypothèse en établissant une corrélation entre les épisodes de PNA et les épisodes de rejets aigus.

Le but de notre travail était de vérifier cette hypothèse. Nous avons donc réalisé une étude portant sur 1387 greffes de reins consécutives entre 1987 et 1999 dans le but d'analyser quels sont les facteurs de risque de présenter soit un premier épisode de PNA, soit des épisodes récidivants et quelles sont les conséquences des épisodes de PNA sur la survenue d'épisodes de rejets aigus et le long terme des greffons. Nos résultats qui figurent dans la publication jointe (208) montrent que le risque de PNA corrèle avec l'infection à CMV et apparaît dans plus de 2/3 des cas après celle-ci. Par ailleurs, 1/3 des patients présentent des épisodes de PNA récidivants et sont essentiellement des femmes, avec la présence de E.Coli significativement plus fréquemment retrouvée à l'origine de ces épisodes. Nous n'avons pas vérifié l'hypothèse selon laquelle les épisodes de PNA seraient à l'origine du déclenchement des épisodes de rejet aigu. En effet, nous avons montré que dans notre série de 160 épisodes de PNA (soit 13% de la population étudiée), 80% des épisodes de PNA survenaient après les épisodes de rejets aigus suggérant plutôt un excès d'immunosuppression après le traitement du rejet aigu à l'origine de la survenue des épisodes de PNA (211).

Nos résultats sont cependant controversés. En effet une étude récente de Kamath et al (209) montre sur une population de 1022 patients transplantés consécutivement avec une greffe rénale sur une période de 10 ans que la PNA est statistiquement corrélée avec l'apparition d'un épisode de rejet aigu (OR= 1.5) mais aussi à la maladie à CMV. Dans l'étude de Audard et al publiée en 2005 (211), l'auteur étudie 41 PNA dont 9 ont bénéficiées d'une PBR dans le mois qui a suivi l'infection et montre que 2 des biopsies présentent des signes patents de rejet aigu.

La relation entre les épisodes infectieux et notamment à CMV et l'augmentation du risque de rejet aigu en post transplantation est déjà documentée (212): 764 (213) (210). Concernant les infections bactériennes, l'hypothèse plus récente du signal de danger déclenché dans le greffon passerait par la voie des Tol-like récepteurs.

Durant la PNA, les bactéries sont localisées dans le greffon. Les cellules tubulaires et les macrophages présents dans l'interstitium ainsi que les cellules dendritiques s'activent rapidement en fixant la paroi bactérienne via la voie des Tol-like récepteurs (214). En effet, les Tol-like récepteurs (TLR) représentent une famille de récepteurs qui reconnaissent les molécules d'agents pathogènes et favorisent l'activation des leucocytes et des cellules du tissu rénal. Les ligands des TLR comprennent des composants microbiens exogènes, comme le LPS pour le TLR4, des lipoprotéines et des peptidoglycanes pour les TLR 1, 2, 6 ; des ARN viraux pour le TLR3, des CpG-DNA pour le TLR9 et des molécules endogènes comme les heat-shock protein et les molécules de la matrice extracellulaire. Après stimulation, l'activation des TLR est à l'origine de l'expression de cytokines de l'inflammation ou des molécules de la costimulation via la voie de signalisation My D88-dépendante et indépendante (TLR3) qu'ils partagent avec le récepteur de l'IL1. Les TLR sont exprimés à la surface des sous populations leucocytaires et des cellules non immunes et semblent réguler des phases importantes des réponses adaptatives et innées. Les cellules tubulaires épithéliales expriment TLR1, 2, 4, et 6, ce qui suggère que le TLR pourrait contribuer à l'activation de la réponse immune en cas d'agression des cellules tubulo interstitielles comme c'est le cas dans les pyélonéphrites par exemple (215).

La réponse immune innée a longtemps été suspecte d'être impliquée dans la pathogénie du rejet aigu (216) (217). C'est le cas par exemple du syndrome d'ischémie reperfusion qui apparaît comme un puissant déclencheur du rejet aigu. L'hypothèse serait que les ligands endogènes du TLR comme les HSP dérivées des cellules nécrotiques signaleraient le danger et agiraient en déclenchant le rejet aigu d'allogreffe. Un modèle expérimental chez la souris illustre cette hypothèse. Des souris déficientes pour la molécule adaptatrice MyD88 ne sont pas capables de rejeter un greffon de peau incompatible pour les gènes mineurs d'histocompatibilité 5HY en raison probablement d'un nombre diminué de cellules dendritiques matures dans les ganglions lymphatique drainant, empêchant ainsi la génération de cellules T allospécifiques et de l'immunité Th1 (218). Ce qui est en faveur du rôle des TLR dans la genèse du rejet aigu même en dehors d'un agent pathogène infectieux. Ainsi, des mécanismes similaires comme des infections systémiques ou locales (PNA) pourraient déclencher des rejets aigus. En effet, durant un épisode de PNA, les produits bactériens sont directement localisés dans le greffon. Il a été montré que les cellules tubulaires épithéliales rénales forment une barrière entre les microbes ascendants le long du tractus urinaire et l'hôte grâce à la production de α défensine (substance antibactérienne) par ces mêmes cellules (219). Cependant, Biragyn et al ont aussi montré (220) que chez les souris, la $\alpha 2$ défensine

agissait directement sur les cellules dendritiques immatures comme un ligand endogène pour le TLR4 entraînant une surrégulation des molécules de costimulation et une maturation des cellules dendritiques. Ainsi les ligands endogènes et exogènes du TLR4 pourrait agir comme de puissant signaux de danger et entraîner une réactivation des cellules T alloréactives.

Finallement, certaines cytokines (IL8) et chémokines (CXCR2) sont impliquées dans le recrutement des neutrophiles vers le compartiment urinaire au cours des épisodes infectieux (PNA), grâce à leur propriété chimiotactique. Il a été montré que les lymphocytes T activés exprimaient les récepteurs pour l'IL8 et le CXCR2 et pourraient être recrutés dans le greffon infecté par chimiotactisme (221), (222).

Il existerait donc quelques arguments en faveur de l'activation d'un signal de danger après une PNA dans le greffon pouvant conduire au déclenchement d'un rejet aigu. Notre étude cependant, ne va pas dans ce sens puisque nous montrons que plus de 80 % des rejets aigus surviennent avant les épisodes de PNA. Nous n'avons cependant pas réalisé d'analyse histologique systématique des épisodes de PNA dont la récupération n'est pas rapidement complète sous antibiothérapie adaptée, sous estimant probablement l'incidence des rejets aigus concomitant de la PNA. Par ailleurs, un traitement antibactérien efficace et précocement instauré au diagnostic pourrait éviter l'installation incontrôlée des mécanismes inflammatoires dans le greffon ou au contraire la mise en place de mécanismes de régulation comme le suggère Vanburkik A et al dans J clin invest en 2000 (223)

Finallement, les résultats des épisodes de PNA sur le long terme des greffons (tous types confondus) serait plutôt en faveur d'un état d'over-immunosuppression des patients puisqu'ils corrèlent statistiquement avec la fréquence des épisodes d'infection à CMV et à l'absence d'effet délétère sur la survie à long terme. C'est peut être cet état d'over-immunosuppression qui est à l'origine de l'absence de déclenchement du signal de danger dans le greffon protégeant ainsi les patients de la survenue d'épisodes de rejet aigu.

Au total, notre études montre que les épisodes de pyélonéphrites aiguës pris dans leur ensemble ne contribueraient pas à la dysfonction chronique des greffons en dehors des épisodes précoces qui font peut être le lit de rejet infraclinique et qui nécessiteraient une biopsie en fin de traitement antibiotique de façon systématique.

B. Rôle de l'inadéquation entre la masse du greffon rénal et la masse du receveur

Impact of Graft Mass on the Clinical Outcome of Kidney Transplants

Magali Giral,* Jean Michel Nguyen,[†] Georges Karam,[‡] Michelle Kessler,[§]
Bruno Hurault de Ligny,^{||} Mattias Buchler,[¶] François Bayle,[#] Carole Meyer,^{**}
Yohann Foucher,[†] Marie Laure Martin,[†] Pascal Daguin,^{*} and Jean Paul Souillou^{*}

*Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation and INSERM U437 (Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantation), Nantes; [†]Service de Biostatistique, Pôle d'Information Médicale d'Evaluation et de Santé Publique, Saint Jacques Hospital, Nantes University Hospital, Nantes; [‡]Service d'urologie, Place Alexis Ricordeau, Nantes; [§]Service de néphrologie, CHU, Nancy; ^{||}Service de néphrologie, Caen; [¶]Service de néphrologie, Tours; [#]Service de néphrologie, Grenoble; and ^{**}Service de néphrologie, Strasbourg, France

The effect of nephronic mass reduction of kidney transplants has not been analyzed specifically in a large cohort. Transplant injuries in cadaver kidney graft may have led to an underestimation of the magnitude of this factor. The aim of this study was to analyze the consequences of kidney mass reduction on transplantation outcome. The weights of 1142 kidney grafts were collected prospectively immediately before grafting. Donors and recipients <15 yr of age, simultaneous kidney/pancreas grafts, and technical failures before day 7 were excluded from the analysis. The analysis was performed on Cockcroft-calculated creatinine clearance and proteinuria in 964 patients for whom all of the necessary information was available. This study reports that the smallest kidneys transplanted into the largest recipients (donor kidney weight/recipient body weight [DKW/RBW] <2 g/kg, *n* = 88) increased their clearance by 2.38 ml/min every month for 6 mo (*P* < 0.0001) and by 0.27 ml/min thereafter (*P* < 0.0001). Conversely, creatinine clearance did not change for the largest kidneys transplanted into the smallest recipients (DKW/RBW ratios \geq 4 g/kg). Next, using a Cox model analysis, it was shown that the risk of having a proteinuria >0.5 g/kg was significantly increased for the low DKW/RBW ratios <2 g/kg with 50% of patients having a proteinuria, compared with DKW/RBW ratios \geq 4 g/kg (*P* < 0.001). In cadaver transplant recipients, graft mass has a rapid impact on graft filtration rate and proteinuria. Avoiding major kidney/recipient inadequacy should have a significant influence on long-term transplant function.

J Am Soc Nephrol 16: 261–268, 2005. doi: 10.1681/ASN.2004030209

Kidney transplantation is the method of choice for the treatment of ESRD (1). Long-term kidney graft function depends on multiple influences, among which the host *versus* graft immune response represents a major component. Nevertheless, with the increasing life span of transplants, nonimmune factors that affect graft function, including high blood pressure (2) and metabolic disorders (high blood sugar, hyperlipidemia, and chronic nephrotoxicity of immunosuppressive drugs), also have been well identified (3,4). The major influence of nonimmune factors is indicated by the fact that the rate of graft loss is poorly influenced by the strength of the immunosuppressive regimen only after 1 year (2,5).

Another factor that may affect the long-term function and survival of a kidney transplant is the functional mass of the graft at the time of transplantation. Pioneered by Brenner (6), it is known that experimental acute reduction in kidney mass

results in compensatory mechanisms that affect both the size of the remaining tissue and its function (7–10). However, hyperfiltration that occurs in the remaining nephrons has also been suggested as causing albuminuria and glomerulonephrosclerosis (11,12). More pertinent to the transplantation situation is the seemingly moderate mass reduction that prevails after donor uninephrectomy and also results in an adaptive response of the remaining kidney and hyperfiltration (13–15). Several studies have shown that the remaining kidney may present proteinuria after several decades (16–18). In addition, because kidneys that are used for transplantation have sustained insults stemming from donor trauma, in particular as a result of brain death (19) and the harvesting procedure, and because transplantation leads to new conditions of function in a new recipient environment (*e.g.*, mismatch between graft and recipient masses), the actual nephronic reduction of a transplant that is harvested from a cadaver donor is most likely underestimated (18,20).

In this article, we report on the first study of the effects of the allocation of a kidney graft mass (*i.e.*, kidney weight) on the long-term outcome of cadaveric kidney transplantation in a large cohort (1142 recipients). We show that the graft/recipient mass ratio has a significant impact on filtration rate and proteinuria. This last effect is noticeable even after a short interval,

Received March 18, 2004. Accepted September 17, 2004.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Address correspondence to: Dr. Jean Paul Souillou, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation and Inserm U437 (Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantation), 30 bd Jean Monnet, 44093, Nantes, France. Phone: 33-2-40-08-74-10; Fax: 33-2-40-08-74-11; E-mail: jps@nantes.inserm.fr

Copyright © 2005 by the American Society of Nephrology

ISSN: 1046-6673/1601-0261

particularly when the adaptive response of the graft to the recipient mass is expected to be considerable. The effect of this parameter, alone or in combination with other immune or nonimmune factors that are known to influence graft success rate, is discussed.

Materials and Methods

Patients

Between April 1995 and June 2001, the weight of 1142 kidney grafts was collected prospectively and consecutively immediately before grafting. Our institution in Nantes and six other French transplantation centers (Nancy, Caen, Grenoble, Paris Bicêtre, Tours, and Strasbourg) participated in the study. Donors ($n = 40$) and recipients ($n = 15$) who were younger than 15 yr were excluded from the study, according to the growth-related changes in kidney and recipient size after transplantation. In addition, because some participating centers used bladder drainage for simultaneous kidney and pancreas grafts, we did not include these patients ($n = 103$) because their proteinuria measurements were uninterpretable. Patients in whom technical failure occurred, as defined as a definitive return to dialysis during the first 7 d after surgery, were also excluded ($n = 8$). Finally, data from one center (Paris Bicêtre) that initially participated in the weighing protocol but failed to provide patient follow-up were also excluded from the study ($n = 12$). Analysis thus was performed in the 964 remaining patients (including 7 living related donors) for whom all information was available. The mean follow-up period was 32 mo with a maximum of 94 mo. All patients received anticalcineurin inhibitors for maintenance therapy.

Kidney Weight

All participating centers were provided with the same electronic weighing scales (Maul; Gilbert Fourniture, France) with an accuracy of 1 g. The scales were located in the operating room. According to common procedure recommendations, kidney grafts were prepared first then weighed by the surgeon.

Parameters Studied

Clinical and biologic data concerning donors and recipients were obtained prospectively at the time of inclusion and centralized in the anonymous and coded study data bank located at Nantes University Hospital, in accordance with the local ethical committee requirements. Donor data include age, gender, creatinemia ($\mu\text{mol/L}$), and kidney weight (donor kidney weight [DKW] in g). Recipient data at the time of inclusion concerned age, gender, weight (recipient body weight [RBW] in kg), the ratio between DKW and RBW (DKW/RBW; in g/kg), the number of grafts, HLA-A-B-DR incompatibilities, anti-T panel reactive antibodies (%), and cold ischemia time (min). Moreover, at the time of each follow-up (3, 6, and 12 mo, and then every 12 mo until 48 mo), the following data were collected from recipients: Weight, creatinemia ($\mu\text{mol/L}$), creatinine clearance calculated according to the Cockcroft formula $[(140 - \text{age}) \times \text{weight (kg)}] / \text{creatinemia } \mu\text{mol/L} \times 1.04$ for female or 1.23 for male recipient (ml/min) and daily proteinuria (g/24 h). Also recorded were the occurrence of delayed graft function (as defined by the time interval, in days, to reach a Cockcroft-calculated creatinine clearance >10 ml/min) (5), the occurrence of acute rejection episodes, and the time of death or definitive graft failure with return to chronic dialysis.

Statistical Analyses

The first objective of the study was to assess the effect of kidney and recipient mass at the allocation, defined by the DKW/RBW ratio, on

graft function (Cockcroft-calculated creatinine clearance [cCrCl]). To take into account interindividual variability, we first used a linear mixed-effect model (21). In this model, the effect of the DKW/RBW ratio was adjusted on all historical cofactors. As a preliminary study showed that the relationship between the cCrCl and the time interval from transplantation was linear with a break point at 6 mo, we then modeled the relation between the time and the clearance according to the two different slope before and after 6 mo. On the basis of biologic observations (change of mean of cCrCl at each data collected point), it was possible to identify three groups of patients according to three classes of ratio: DKW/RBW ratio (g/kg) <2 , between 2 and 4, and ≥ 4 . To allow for different cCrCl evolution in the three classes, we considered in the linear mixed-effect model an interaction between the time interval from transplantation and the DKW/RBW ratio.

The second aim was to assess the consequences of changes in graft filtration rate on the occurrence of kidney injury defined as a proteinuria. We built a Cox proportional-hazards model to determine which covariates and particularly DKW/RBW ratios were risk factors for the first occurrence of a proteinuria above a threshold of 0.5 g/24 h. Patients who died or underwent graft failure were censored. Finally, to study the impact and the rank of the DKW/RBW ratio on graft survival, we built a second Cox model whereby graft loss was defined as death or a definitive return in dialysis. For all tests, any variable that reached a $P < 0.20$ in the univariate analysis was introduced to the multivariate analysis. The Wald test was used to prove the effect of the variables. All data that were collected prospectively at the time of inclusion and during the follow-up were tested in each statistical model previously described. Finally, because a multicentric study implies that some clinical practice procedures and patient characteristics can vary between each center, each Cox proportional-hazards model was stratified on centers. The Software used was S-Plus 6.0 Professional.

Results

Demographic Characteristics

Among the 964 patients included in the study, 88.7% were recipients of a first graft. Sixty-two percent were male recipients, and 68% received a kidney from a male donor. The mean HLA incompatibility was 3 ± 1.3 , with only 12% of patients having 5 or fewer incompatibilities. Pregraft anti-T cell immunization was observed in 23% of patients. The mean delayed graft function was 5.4 d after surgery. Finally, 20% of patients developed an acute rejection episode during their follow-up period. The population characteristics are given in Table 1.

Kidney Weight Distribution According to Donor Gender and Age

The mean kidney weight \pm SD of the whole population was of 202 ± 56 g (range 76 to 460). As expected, male kidneys were heavier than female kidneys with a mean weight of 216 ± 56 g (range 76 to 460) and 173 ± 42 g (range 94 to 335), respectively ($P < 0.0001$). In effect, 76% of female kidneys weighed <200 g as compared with only 44% for male kidneys. DKW distribution according to donor gender is illustrated in Figure 1A. Moreover, kidney weight increased significantly with donor age from 15 to 45 yr, independent of gender. However, after 45 yr of age, kidney weight remained stable, as shown in Figure 1B. Similarly, the mean recipient weight, which was used for the calculation of the DKW/RBW ratio, also increased with age (Figure 1C).

Table 1.^a Demographic characteristics

Recipient age (yr)	45.2 ± 13 (range 15–75)
Recipient gender (male)	62%
Recipient weight (kg)	65.4 ± 13 (range 26–165)
First graft	88.74%
HLA-A-B-DR incompatibility	3 ± 1.3 (range 0–6)
HLA incompatibility ≤1	12% (n = 116)
HLA incompatibility ≥5	12% (n = 116)
Anti-T PRA >0%	23% (n = 224)
Anti-T PRA >80%	3.5% (n = 34)
Cold ischemia time (h)	24.4 ± 9.6 (range 1–50)
Delayed graft function (d)	5.37 ± 6 (range 1–50)
Acute graft rejection ≥1	20% (n = 197)
Donor age (yr)	40.3 ± 14 (range 15–74)
Donor gender (male)	68% (n = 653)
Last donor creatinemia (μmol/L)	100 ± 60 (range 5–890)
Kidney weight (g)	202 ± 56 (range 76–460)

^aPRA, panel reactive antibodies.

Effect of DKW/RBW Ratio on Graft Function

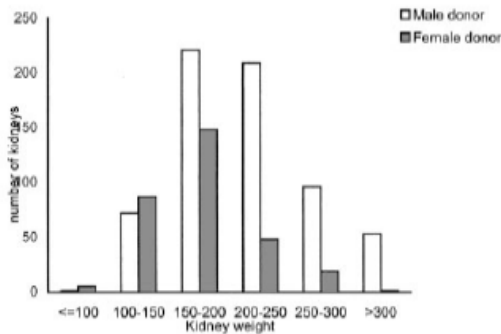
Because body and kidney masses varied significantly between women and men as well as with age (Table 2), we took the option to analyze the effect of gender and the DKW/RBW ratio separately. On the one hand, despite a similar DKW/RBW ratio for male kidneys transplanted to male recipients (3.2 ± 1.2 g/kg; range 0.9 to 8.0) and for female kidneys transplanted to female recipients (3.1 ± 1 g/kg; range 1.2 to 6.9; NS), the 1-yr cCrCl was 20% higher for the first combination (cCrCl 63 ml/min) than for the second combination (52 ml/min; $P < 0.0001$). On the other hand, although the DKW/RBW ratio was highly different when male kidneys were given to female recipients (3.7 ± 1.3 g/kg; range 1.5 to 8.4) compared with female kidneys given to male recipients (2.6 ± 0.9 g/kg; range 1 to 5.6; $P < 0.0001$), the 1-yr graft function was similar for both with a cCrCl of 58.7 ± 23 ml/min (range 16 to 149) and 58 ± 19 ml/min (range 11 to 140), respectively, indicating that small female kidneys donated to large male recipients (*i.e.*, a small DKW/RBW ratio) increased their filtration rate to fit their new body mass (Table 2). In contrast, large male kidneys that were donated to small female recipients (*i.e.*, a high DKW/RBW ratio) were not associated with an increased function. Next, the effects of DKW/RBW ratios were studied, irrespective of donor and recipient gender. The mean 1-yr cCrCl was 54 ± 18 ml/min (range 15 to 108) for high DKW/RBW ratios ≥ 4 g/kg ($n = 205$; largest kidneys/smallest recipients) and increased by 10% for ratios between 2 and 4 g/kg (60 ± 20 ml/min; range 7 to 134; $P < 0.02$) and by 20% for small ratios < 2 g/kg ($n = 88$; smallest kidneys/largest recipients; 69 ± 24 ml/min; range 25 to 149; $P < 0.001$). Moreover, a significantly higher mean cCrCl was observed at each follow-up interval (3, 6, 12, 24, and 36 mo), which continuously increased after 3 mo for the small ratios < 2 g/kg and ratios between 2 and 4 but not for ratios ≥ 4 g/kg (Figure 2). The highest cCrCl observed for small ratios cannot be explained by an increase in weight of the patients of this group during the follow-up. In effect, only patients in a high

DKW/RBW ratio group (≥ 4 g/kg) had a significant increase of weight after the graft ($P < 0.001$). In summary, whatever the recipient and donor gender, small kidneys that were donated to large recipients could adapt to the recipient body mass by increasing their function.

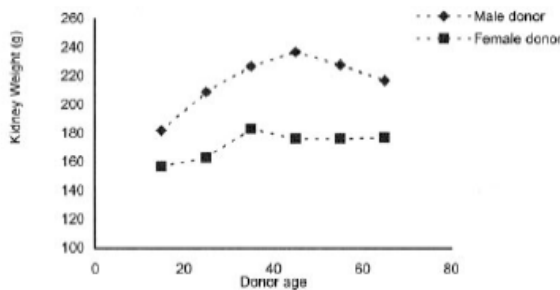
Patients with a Low DKW/RBW Ratio Dramatically Increase Their Filtration Rate

This analysis was performed on a specific population that excluded patients with graft failure or those who died ($n = 780$). To test the hypothesis of graft filtration rate adaptation in conditions of small DKW/RBW ratios, we constructed a linear mixed-effect model. We showed that creatinine clearance evolved differently in the time before and after 6 mo according to the DKW/RBW ratios. As shown in Table 3, for DKW/RBW ratios < 2 g/kg (smallest kidneys in largest recipients), creatinine clearance increased significantly by 2.38 ml/min every month until 6 mo ($P < 0.0001$) and by 0.27 ml/min thereafter ($P < 0.0001$). For DKW/RBW ratios between 2 and 4, cCrCl increased significantly by 1.14 ml/min every month for the first 6 mo ($P < 0.0001$) and by 0.11 ml/min per mo thereafter ($P < 0.0001$). However, for DKW/RBW ratios ≥ 4 g/kg, creatinine clearance did not change with time. Other covariates that were found to influence cCrCl in time after transplantation were donor and recipient age, which had a similar impact on graft function ($P < 0.0001$), cold ischemia time ($P = 0.0093$), and delayed graft function ($P < 0.0001$). Finally, at 12 mo, female recipients had a cCrCl 11 ml/min less than male recipients who received a male kidney ($P < 0.0001$) when they received a female kidney and 5.86 ml/min when they received a male kidney ($P < 0.0001$). To summarize, cCrCl was affected by donor and recipient gender and age, cold ischemia time, delayed graft function, and DKW/RBW ratio in time.

a: Kidney weight distribution according to donor gender



b: Kidney weight distribution according to donor age



c: Distribution of recipient weight according to age

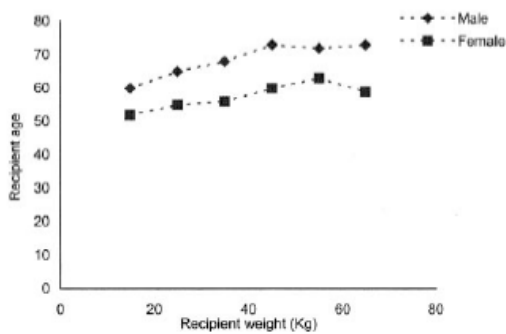


Figure 1. (A) Kidney weight distribution according to donor gender; 76% of female kidneys weighed <200 g. (B) Kidney weight distribution according to donor age. In both men and women, kidney weight increased with donor age until 45 yr of age and decreased thereafter. (C) Distribution of recipient weight according to age. Recipient body weight increased until 45 yr of age and remained stable thereafter.

Low DKW/RBW Ratios Are Associated with Proteinuria (n = 909)

We next investigated whether the highest filtration rate observed with low DKW/RBW ratios resulted in deleterious consequences in terms of graft function and particularly the occur-

rence of proteinuria, the first quantifiable usual parameters that correlate with kidney graft injuries after hyperfiltration. We observed that recipient gender interfered significantly with donor age ($P = 0.005$); the results then were calibrated for donor age at, for instance, 45 yr (Table 4). One third of patients presented a proteinuria >0.5 g/24 h during the follow-up. Patients with the lowest DKW/RBW ratio (<2 g/kg) presented the highest (50%) and earliest occurrence (10.43 mo) of proteinuria compared with 33% and 13.44 mo for DKW/RBW ratios between 2 and 4 g/kg and 23% and 14.33 mo for DKW/RBW ratios ≥ 4 g/kg. The probability of the proteinuria >0.5 g/24 h occurring for the first time during the follow-up correlated with the DKW/RBW ratio. In effect, the risk of proteinuria occurrence increased 1.4-fold for the low ratios <2 g/kg, compared with DKW/RBW ratios between 2 and 4 g/kg ($P = 0.03$) and 2-fold compared with DKW/RBW ratios ≥ 4 g/kg ($P < 0.001$). Delayed graft function and the recipient's being male were also found to be risk factors for the occurrence of proteinuria.

Graft Survival Analysis (n = 905)

Despite the effects of small DKW/RBW ratios on the filtration rate and proteinuria, no effect of DKW/RBW ratios *per se* on graft survival was observed according to Cox multivariate analysis at the end of the study survey (Figure 3). However, the risk of graft loss increased significantly with increasing donor age (in years; relative risk 1.02; 95% confidence interval 1.00 to 1.03; $P = 0.019$) and for six HLA incompatibilities (relative risk 3.10; 95% confidence interval 1.39 to 6.81 $P < 0.0053$). When the covariates that also were found to be significantly associated with proteinuria were tested for a possible synergistic effect with low DKW/RBW ratios (<2 g/kg; recipient gender and delayed graft function, see Table 4), no significant impact on graft survival was noted. Finally, no additional effect of other parameters classically associated with poor long-term graft survival (cold ischemia time, panel reactive antibodies, acute rejection episodes, and donor and recipient age) was observed.

Discussion

Graft/recipient mass ratio represents a potentially important parameter in terms of kidney graft outcome. However, this "simple" parameter has never been studied in a large cohort of kidney transplant recipients. In addition, in this study, we investigated the direct effect of kidney graft mass on transplant function in recipients of unrelated grafts. Given the multicentric nature of the study, to limit the risk of multiplication of data errors related to a more accurate formula (*e.g.*, Nankivell), we chose to use the most simple validated formula (Cockcroft and Gault) to assess graft function (22).

Several studies have explored the effect of graft mass on transplantation outcome via indirect estimation using parameters such as the donor body mass or body surface area (23-25). However, body surface area has been shown to correlate positively with glomerular volume but not with the number of glomeruli (26). In contrast, kidney mass is related to the number of glomeruli and to the adaptive capacity of a grafted organ to its new physiologic conditions after transplantation. Moreover, actual donor body weight is difficult to estimate in the

Table 2.^a Effect of the DKW/RBW ratio on graft function according to the kidney/recipient gender combination

Mean	Male Kidney/Male Recipient (n = 423)	Male Kidney/Female Recipient (n = 230)	Female Kidney/Male Recipient (n = 175)	Female Kidney/Female Recipient (n = 135)
Kidney weight (g)	218 ± 60 (76–128)	211 ± 50 (120–360)	175 ± 42 (94–335)	171 ± 42.8 (95–300)
Recipient weight (kg)	70 ± 12.6 (41–124)	59 ± 12.6 (26–107)	69 ± 12.4 (41–112)	57 ± 12 (30–100)
DKW/RBW ratio (g/kg)	3.22 ± 1.2 (0.9–8)	3.70 ± 1.3 (1.5–8.4)	2.64 ± 0.9 (1–5.6)	3.10 ± 1 (1.2–7)
Recipient age	45.6 ± 12 (18–73)	44.7 ± 12 (15–75)	44.5 ± 13.5 (15–69)	46 ± 13 (15–70)
Serum creatinine at 12 mo (μmol/L)	143 ± 49 (54–400)	119.5 ± 50 (54–400)	156 ± 56 (78–465)	124 ± 52 (60–453)
cCrCl at 12 mo (ml/min)	63.6 ± 20 (7.6–133)	58.7 ± 23 (16–149)	58 ± 19 (11–140)	52 ± 19 (10–124)
cCrCl at 48 mo (ml/min)	60 ± 25 (9–131)	57 ± 25 (13–148)	58 ± 21.5 (25–151)	53 ± 22 (22–139)

^aDKW/RBW, donor kidney weight, recipient body weight; cCrCl, Cockcroft-calculated creatinine clearance.

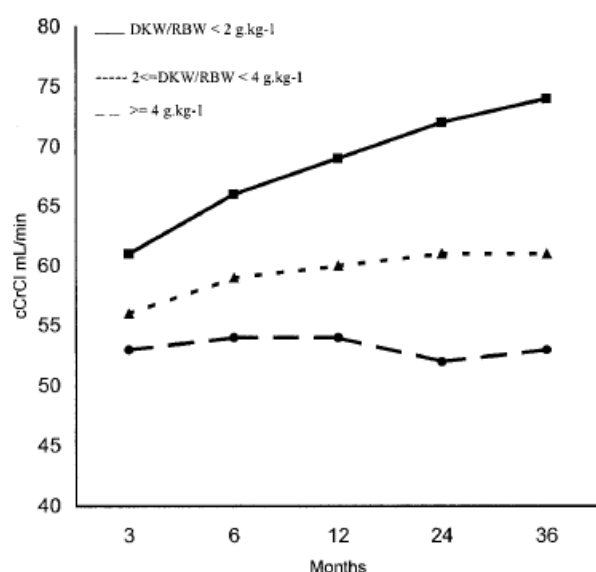


Figure 2. Kidney graft function in time according to the donor kidney weight/recipient body weight (DKW/RBW) ratio. The distribution of the mean Cockcroft-calculated creatinine clearance at 3, 6, 12, 24, and 36 mo in each class of DKW/RBW ratios is shown. Small ratios <math>< 2 \text{ g/kg}</math> result in an increase in cCrCl at each data time point. When transplantations were performed with a high DKW/RBW ratio (

case of cadaver donor transplantation, although a more precise measurement can be obtained in the case of living related donors. However, even in this latter situation, donor height and weight do not account for more than one third of kidney weight variability (27). Recent data that have revisited the relationship among kidney mass, glomerular volume, and glomerulus number (28,29) reinforce the need to analyze directly the DKW in this type of study.

Only two studies have explored the impact of DKW/RBW ratios but on a limited cohort of transplants (132 and 259, respectively) (30,31). In addition, these studies were restricted to living related donors, a situation in which functional graft

loss is minimal as a result of the selection of healthy donors and in which several factors that are known to aggravate nephron loss in cadaver grafts are absent (see reference (18) for review). Two other studies were based on the analysis of kidney size (32) or volume (33) in cadaver donors and showed discordant effect on graft survival. Insufficient precision of nephron mass estimation, together with limited cohort sizes and statistical power, may explain some divergent results concerning the impact of kidney mass on transplant survival rate and late outcome (see reference (34) for review).

Donor gender has a significant impact on graft survival; in particular, old kidneys that are from female donors and transplanted into male recipients have been shown to have the poorest outcome (35). Terasaki *et al.* (36) and Brenner and Milford (37) suggested that the gender effect may be explained by a mismatch between the functional demand of the recipient and an inadequate nephronic mass. However, although we found no difference in graft survival according to donor and recipient gender match (data not shown), we observed a gender effect on graft function that cannot be explained exclusively by the DKW/RBW ratio (Table 3).

Our study, based on a cohort of 964 kidney recipients, enabled the analysis of a significant number of transplantations performed in strongly mismatched donor/recipient combinations with a low DKW/RBW ratio (i.e., approximately 15 ml/mo for the first 6 mo) but continuously and significantly for the entire 4-yr survey period (Figure 2). Importantly, a large proportion (50%) of the kidney grafts that were transplanted in this situation developed proteinuria, a difference that was highly significant compared with the other combinations studied. The cohort then was reanalyzed retrospectively for antihypertensive medication in all centers, except one in Strasbourg ($n = 69$) for technical reasons. However, no difference in the percentage of patients on at least one antihypertensive drug was observed. The global 84% of patients who were taking antihypertensive medication was equally distributed in the three groups of ratio. Moreover, because a difference in the use of an angiotensin-

Table 3.^a Mixed linear model analysis of CrCl changes according to DKW/RBW ratios and parameters classically influencing graft function

	b	95% CI	T Test	P Value
Recipient age (yr)	-0.36	0.28 to 0.44	-9.00	0.0001
Donor age (yr)	-0.36	0.28 to 0.44	-9.00	0.0001
Gender ^b				
female kidney in female recipient	-11.03	-14.22 to -7.84	-6.77	0.0001
female kidney in male recipient	-6.06	-9.00 to -3.12	-4.04	0.0001
male kidney in female recipient	-5.86	-8.47 to -3.25	-4.41	0.0001
Cold ischemia time (h)	-0.15	-0.27 to -0.03	-2.50	0.0093
Delayed graft function (d)	-0.38	-0.56 to -0.20	-4.22	0.0001
Time interval from transplantation <6 mo				
DKW/RBW <2 g/kg	2.38	1.52 to 3.20	5.70	0.0001
DKW/RBW 2–4 g/kg	1.14	0.84 to 1.45	7.32	0.0001
DKW/RBW ≥4 g/kg	0.26	-0.29 to 0.82	0.92	0.3560
Time interval from transplantation ≥6 mo				
DKW/RBW <2 g/kg	0.27	0.19 to 0.35	6.42	0.0001
DKW/RBW 2–4 g/kg	0.11	0.07 to 0.14	6.63	0.0001
DKW/RBW ≥4 g/kg	-0.02	-0.08 to 0.04	-0.70	0.4861

^aCI, confidence interval;

^bReference class: Male donor kidney in male recipient.

Table 4.^a Cox model analysis of proteinuria occurrence

	b	s(b)	RR	95% CI (RR)	P Value
DKW/RBW (g/kg) ^b					
2.0 ≤ DKW/RBW < 4.0	-0.362	0.170	0.70	0.50 to 0.97	0.0340
DKW/RBW ≥4.0	-0.708	0.215	0.49	0.32 to 0.75	0.0010
Recipient gender ^c	0.309	0.126	1.36	1.06 to 1.74	0.0140
Delayed graft function (d)	0.022	0.007	1.02	1.0 to 1.04	0.0430

^aRR, relative risk.

^bReference class: DKW/RBW <2.0 g/kg.

^cReference class: Female recipient.

converting enzyme (ACE) and/or angiotensin II receptor antagonists (ARA) could have influenced the assessment of proteinuria, the cohort was also reanalyzed for ACE and ARA medication. No significant difference was observed in the distribution among the three groups of DKW/RBW ratios despite the highest percentage of patients on ACE or ARA medication in the lowest ratio group (40% compared with 38% and 32% in group 2 to 4 g/kg and ≥4 g/kg, respectively). This clearly rules out the possibility that, in the low ratio group, proteinuria was associated with a lower rate of ARA and ACE medication. Rather, this finding fits with an expected increase in such a prescription in proteinuric patients. Whereas an increase in glomerular filtration can be considered as a physiologic adaptation of the graft to its new conditions (38), the proteinuria onset that occurred during the first 4 yr of follow-up in the patients who received a graft with a low DKW/RBW ratio (<2) sharply contrasted with the delay of proteinuria onset reported in nephrectomized healthy individuals that usually exceeded 10 yr (see reference (13) for review). This early occurrence of

proteinuria validates the hypothesis that the cadaveric donor source of these transplants represents a situation that is of a different nature to that prevailing after nephrectomy in a healthy individual in terms of estimated reduction in nephron mass (harvesting trauma, cold ischemia time, and brain death; see reference (18) for review). That low DKW/RBW ratios were not found to result in an increase in proteinuria in a study that was limited to transplantation that was performed with living related kidney donors (31), whereas more severe kidney mass reduction (>50%) after nephrectomy as a result of kidney carcinoma resulted in proteinuria mimicking the situation of low DKW/RBW ratios, fits with this concept.

However, we did not find evidence that this adaptive response—even in the lowest DKW/RBW ratio group with proteinuria—affected graft survival at the end of the 4-yr survey period of our study. Moreover, we were unable to find a synergistic effect between low DKW/RBW ratios and the usual detrimental factors detected in our study or classically linked to late graft dysfunction such as donor or recipient age, cold

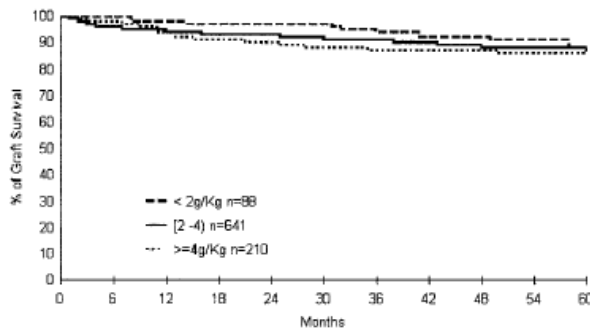


Figure 3. Kaplan-Meier graft survival according to the DKW/RBW ratio. The DKW/RBW ratios have no impact on graft survival at the end of the study survey. One and 4-yr graft survival was 98 and 89% for patients with small DKW/RBW ratios <2 g/kg, 94 and 88% for patients with ratios between 2 and 4 g/kg, and 94 and 85% for patients with ratios \geq 4 g/kg, respectively.

ischemia time, acute graft rejection, or delayed graft function. Nevertheless, in animals, hyperfiltration with proteinuria has been clearly identified as a major risk factor for renal failure (39,40). The eventuality that grafting with a low DKW/RBW ratio will not ultimately result in increased graft loss is also contradicted by the finding that in human nephronic mass, reduction exceeding 50% of the initial renal mass is associated with renal failure after 10 yr (11), a time lapse that is pertinent to the current expected graft function in cadaver transplantation. Taken together, our data suggest that kidney mass, a parameter that is simple to measure, should be taken into account during kidney attribution. Furthermore, our results suggest that grafting in the context of DKW/RBW ratios <2 g/kg, a condition that was closely linked with early occurrence of proteinuria, should be avoided.

References

- Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D: Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 342: 605–612, 2000
- Opelz G, Dohler B: Cyclosporine and long-term kidney graft survival. *Transplantation* 72: 1267–1273, 2001
- Suthanthiran M, Strom TB: Renal transplantation. *N Engl J Med* 331: 365–376, 1994
- Paul LC, Muralidharan J, Benediktsson H: Immunological and hemodynamic mechanisms in chronic renal allograft rejection. *Transpl Immunol* 4: 39–42, 1996
- Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blanco G, Dreno B, Souillou JP: Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: Randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 351: 623–628, 1998
- Brenner BM: Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol (Lond)* 249: F324–F337, 1985
- Malt RA: Humoral factors in regulation of compensatory renal hypertrophy. *Kidney Int* 23: 611–615, 1983
- Conti FG, Striker LJ, Lesniak MA, MacKay K, Roth J, Striker GE: Studies on binding and mitogenic effect of insulin and insulin-like growth factor I in glomerular mesangial cells. *Endocrinology* 122: 2788–2795, 1988
- Rennke HG, Klein PS: Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 13: 443–456, 1989
- Wesson LG: Compensatory growth and other growth responses of the kidney. *Nephron* 51: 149–184, 1989
- Novick AC, Gephardt G, Guz B, Steinmuller D, Tubbs RR: Long-term follow-up after partial removal of a solitary kidney. *N Engl J Med* 325: 1058–1062, 1991
- Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM: Hyperfiltration in remnant nephrons: A potentially adverse response to renal ablation. *J Am Soc Nephrol* 12: 1315–1325, 2001
- Fotino S: The solitary kidney: A model of chronic hyperfiltration in humans. *Am J Kidney Dis* 13: 88–98, 1989
- Velosa JA, Offord KP, Schroeder DR: Effect of age, sex, and glomerular filtration rate on renal function outcome of living kidney donors. *Transplantation* 60: 1618–1621, 1995
- Ramcharan T, Matas AJ: Long-term (20–37 years) follow-up of living kidney donors. *Am J Transplant* 2: 959–964, 2002
- Hakim RM, Goldszer RC, Brenner BM: Hypertension and proteinuria: Long-term sequelae of uninephrectomy in humans. *Kidney Int* 25: 930–936, 1984
- Kasiske BL, Ma JZ, Louis TA, Swan SK: Long-term effects of reduced renal mass in humans. *Kidney Int* 48: 814–819, 1995
- Taal M, Tilney N, Mackenzie H: Renal mass: An important determinant of late allograft outcome. *Transplant Rev* 12: 74–84, 1998
- Schnuelle P, Berger S, de Boer J, Persijn G, van der Woude FJ: Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation. *Transplantation* 72: 455–463, 2001
- Brenner BM, Cohen RA, Milford EL: In renal transplantation, one size may not fit all. *J Am Soc Nephrol* 3: 162–169, 1992
- Laird NM, Ware JH: Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics* 38: 963–974, 1982
- Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR: Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. *Transplantation* 59: 1683–1689, 1995
- Gaston RS, Hudson SL, Julian BA, Laskow DA, Deierhoi MH, Sanders CE, Phillips MG, Diethelm AG, Curtis JJ: Impact of donor/recipient size matching on outcomes in renal transplantation. *Transplantation* 61: 383–388, 1996
- Cho Y, Terasaki P, Cecka J: Should excessive height and weight differences between the kidney donor and recipient be avoided. *Transplant Proc* 29: 104–105, 1997
- Lee L, Auersvald L, Claus E: Body size mismatch between donor and recipient and the developments of chronic in renal transplantation. *Transplant Proc* 29: 111, 1992
- Nyengaard JR, Bendtsen TF: Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 232: 194–201, 1992
- Kasiske BL, Umen AJ: The influence of age, sex, race, and body habitus on kidney weight in humans. *Arch Pathol Lab Med* 110: 55–60, 1986

28. Jones SE, Nyengaard JR, Flyvbjerg A, Bilous RW, Marshall SM: Birth weight has no influence on glomerular number and volume. *Pediatr Nephrol* 16: 340–345, 2001
29. Neugarten J, Kasiske B, Silbiger SR, Nyengaard JR: Effects of sex on renal structure. *Nephron* 90: 139–144, 2002
30. Nishimura Y, Tomikawa S, Beck Y: Kidney graft weight as an important risk factor for long term graft survival. *Transplant Proc* 30: 107–110, 1998
31. Kim Y, Kim M, Han D: Evidence that the ratio of donor kidney weight to recipient body weight, donor age, and episodes of acute rejection correlate independently with live graft function. *Transplantation* 74: 280–283, 2002
32. Nicholson ML, Windmill DC, Horsburgh T, Harris KP: Influence of allograft size to recipient body-weight ratio on the long-term outcome of renal transplantation. *Br J Surg* 87: 314–319, 2000
33. Miles AM, Sumrani N, John S, Markell MS, Distant DA, Maursky V, Hong JH, Friedman EA, Sommer B: The effect of kidney size on cadaveric renal allograft outcome. *Transplantation* 61: 894–897, 1996
34. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D: Inadequate donor size in cadaver kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 13: 2152–2159, 2002
35. Neugarten J, Srinivas T, Tellis V, Silbiger S, Greenstein S: The effect of donor gender on renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 7: 318–324, 1996
36. Terasaki PI, Cecka JM, Takemoto S, Yuge J, Mickey MR, Park MS, Iwaki Y, Cicciarella J, Cho Y: Clinical transplants 1988. Overview. *Clin Transpl* 409–434, 1988
37. Brenner BM, Milford EL: Nephron underdosing: A programmed cause of chronic renal allograft failure. *Am J Kidney Dis* 21: 66–72, 1993
38. Terasaki PI, Koyama H, Cecka JM, Gjertson DW: The hyperfiltration hypothesis in human renal transplantation. *Transplantation* 57: 1450–1454, 1994
39. Praga M, Morales E: Renal damage associated with proteinuria. *Kidney Int Suppl* 82: 42–46, 2002
40. Reichel H, Zeier M, Ritz E: Proteinuria after renal transplantation: Pathogenesis and management. *Nephrol Dial Transplant* 19: 301–305, 2004

DISCUSSION

La greffe d'un rein unique de cadavre correspond à un modèle expérimental de réduction néphronique chez l'homme. Le tableau clinique, HTA, protéinurie, dégradation progressive de la fonction rénale que l'on observe dans la NCT rappellent les phénomènes induits par l'hyperfiltration que l'on observe chez l'homme en cas d'oligoméganéphronie ou d'agnésie rénale unilatérale (200, 224). L'inadéquation entre la masse rénale du greffon et la masse corporelle du receveur pourrait être à l'origine d'une hyperfiltration générant des lésions de glomérulosclérose et serait responsable en partie, de la perte chronique des greffons rénaux.

La réduction néphronique aiguë expérimentale de la masse rénale chez l'animal ou chez l'homme est responsable d'un mécanisme de compensation morphologique et fonctionnelle dans les néphrons restants (190) se traduisant par une hyperfiltration. Dans la réduction néphronique massive des 11/12ème chez le rat, l'hyperfiltration serait à l'origine de modifications de la perméabilité glomérulaire responsable d'une fuite protéique et d'une glomérulosclérose. Chez l'homme, l'adaptation du rein restant après néphrectomie se traduit par une augmentation de débit de filtration glomérulaire (DGF) atteignant 60-70% du DFG avant réduction dans la semaine qui suit l'ablation et une augmentation de l'incidence de la protéinurie et de la glomérulosclérose 5 à 20 ans après. Par contre, l'insuffisance rénale progressive n'est rencontrée que chez les patients ayant une amputation de plus de 75% de la masse rénale et après plus de 10 ans d'évolution (198) (199, 200) (225).

La greffe d'un rein unique de cadavre pourrait correspondre à un modèle expérimental de réduction néphronique chez l'homme et conduire par des mécanismes d'hyperfiltration et de protéinurie, à la glomérulosclérose et à la progression de la NCT. En effet le rein greffé est un organe fragilisé par la réanimation du coma, le prélèvement et le syndrome d'ischémie reperfusion. De plus la tendance actuelle de la transplantation autorise au prélèvement de plus en plus âgés avec d'emblée une réduction néphronique parfois importante (greffons dits "limites"). Enfin, le greffon va devoir s'adapter à un nouvel organisme pour lequel il n'est pas forcément adéquate pour la fonction. Les modèles expérimentaux chez le rat ont montré le rôle de l'hyperfiltration dans la progression de la NCT en impliquant des mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont modulés par la masse rénale (confere chapitre 3.c.1) (226). Si elle est insuffisante les mécanismes sont accélérés, si elle est adéquate les mécanismes sont moindres et retardés.

Chez l'homme, La plupart des études qui ont été publiées sur le sujet rapportent des petites séries portant essentiellement sur des donneurs vivants (227) (228). Cette dernière restriction modifie la donne de départ, puisque le rein ne subit pas toutes les contraintes que subit un rein de donneur cadavérique et est sélectionné pour son excellente qualité. Nous avons donc réalisé une étude dans le but de tester l'hypothèse du rôle de l'inadéquation entre la masse du rein et la masse du receveur sur la fonction précoce et sur la survie des greffons. Nous avons ainsi pesé près de mille greffons avant implantation dans le cadre de la greffe de donneur cadavérique, et étudié, la progression de la fonction rénale, la protéinurie et la survie des greffons en fonctions du ratio du poids du greffon sur le poids du receveur. Nous avons montré que la majorité des reins greffés hyperfiltrèrent dès les premiers mois post greffe jusqu'à 6 mois de façon très marquée puis plus lentement après en fonction du ratio entre la masse du rein et la masse du receveur. En effet, les ratios de poids des reins / poids des receveurs les plus petits ($< 2 \text{ g.Kg}^{-1}$) c'est à dire les plus inadéquates qui représentent 10% de la population étudiée (petits reins sur gros receveurs) s'adaptent à leur nouvel environnement en augmentant significativement leur clearance tous les mois essentiellement jusqu'à 6 mois mais même après. C'est aussi le cas pour la majorité des greffons pour des ratios intermédiaires (entre 2 et 4 g.Kg^{-1}) mais avec une augmentation moins marquée de la filtration glomérulaire. Par contre les reins qui ont des ratios $\geq 4 \text{ g.Kg}^{-1}$ (c'est à dire des gros reins sur des petits receveurs) n'améliorent pas leur fonction dans le temps comme si ils étaient d'emblée adaptés à la masse de leur receveur. Nous avons aussi montré que les reins inadéquates (petits ratios) étaient significativement plus exposés à développer une protéinurie (entre et 1.4 et 2 fois plus de risque que les reins de ratios plus élevés) et d'apparition plus précoce (10 mois après la greffe). Cependant, le manque de recul de l'étude (4 ans) ne nous a cependant pas permis de montrer que adaptation des petits reins avait des conséquences sur la survie des greffons mais de mettre en garde sur le risque potentiel de transplanter des greffons inadéquates au moins sur le risque de développer une protéinurie marqueur de glomérulosclérose et facteur de risque propre de progression de la NCT (voir chapitre 3c1). L'étude est actuellement relancée pour analyser, avec maintenant un recul de plus de 10 ans sur les premières inclusions, quand s'arrête l'adaptation du rein après la greffe et quand commence le déclin de fonction qui conduira à la perte du greffon.

C Rôle des paramètres de réanimation du donneur en état de mort encéphalique dans la reprise de fonction des greffons rénaux.

(transplantation janvier 2007 in press)

Effect of brain dead donor resuscitation on delayed graft function. Results of a monocentric analysis

Magali Giral[°], Jean Pierre Bertola⁺, Yohann Foucher[#], Daniel Villers⁺, Evelyne Bironneau⁺,
Yvonnick Blanloeil^{..}, Georges Karam^{*}, Pascal Daguin[°], Lydie Lerat[°], and Jean Paul
Soulillou[°]

[°] ITERT – Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation and Inserm U643
(Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantation), 30 bd Jean Monnet,
44093, Nantes, France.

[#] Institut Universitaire de Recherche Clinique - Unité de Biostatistique, 641 av du Doyen
Gaston Giraud, 34093 Montpellier, France.

⁺ Service de réanimation médicale du CHU de Nantes, Nantes 44093 France

^{*} Service d'urologie du CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau 44000 Nantes France

^{..} Service de réanimation neurochirurgicale du CHU de Nantes, Saint Herblain 44100 France

Correspondence: Jean Paul Soulillou

Phone: 33-2 40 08 74 10

Fax: 33-2 40 08 74 11

Email: jean-paul.Soulillou@univ-nantes.fr

Numbers of words : 3373

Keys words : brain death, kidney/renal, delayed graft function, ischemia reperfusion

Abstract

Background : We have previously shown that a dose of DGF longer than 6 days was a crucial threshold for long-term graft outcome. The aim of this study was to analyse the correlation of DGF \geq 6 days with brain-dead donor variables, including those related to resuscitation, in a population of 262 consecutive brain-dead donors from 1990 to 2003. Method : We used a marginal logistic model in which DGF was considered as a binary variable with a cut-off of 6 days. Results : monivariate analysis of donor parameters showed that male, age above 35 years, primary history of hypertension, hydroxyethylstarch (HES) fluid above 1500 mL or Epinephrine infusion during resuscitation were risk factors for prolonged DGF. The multivariate logistic regression model showed that Epinephrine use during donor resuscitation ($p < 0.001$, OR = 4.35), CIT \geq 16 hours ($p = 0.01$, OR = 2.16) and recipient age \geq 55 years ($p = 0.003$, OR = 2.75), were associated with a risk of prolonged DGF. A long stay (> 40 hours) in intensive care and a large volume of colloids (> 1250 mL, except HES) correlated with a lower risk of DGF. Conclusion : our study shows an impact for only a limited number of brain dead donor resuscitation parameters on DGF duration. We also show that CIT, has a much lower threshold (< 16 hours) for DGF risk than previously described. Importantly, we show that recipient age is clearly a major independent risk factor for prolonged DGF, whereas donor age seems to act mostly as a dependent risk factor.

Introduction

Kidney graft outcome is influenced by multiple parameters among which the host versus graft immune response represents a major component. Nevertheless, non-immune factors such as delayed graft function (DGF) (229), which is the commonest complication affecting kidney allografts in the immediate post transplant period, have also been shown to be deleterious for graft outcome (230, 231). Whereas experimental studies have shown the crucial role of ischemia reperfusion injury in the physiopathology of DGF (see Perico for review) (127), the relative contribution of donor or recipient-related factors to the development of DGF are still debated. Certain donor-related factors, (232) (233, 234), such as insults stemming from the brain death status and the retrieval procedure (110, 235, 236), have been shown to influence graft outcome. In addition, several studies have already shown that some drugs used during donor resuscitation, such as adrenergic agents (237), certain types of colloid plasma expanders (i.e. hydroxyethylstarch HES) (111, 238) or desmopressin (112), can be associated with poor subsequent graft outcome. However, to our knowledge, studies devoted to brain dead donor parameters are all based on relatively small donor cohorts (232) or have only analysed a restricted numbers of parameters (233) (239). In a previous study, we showed that a “dose” of DGF greater than 6 days (i.e. the number of days after the transplantation to reach a creatinine clearance above 10 mL/min) was a crucial threshold for long-term graft outcome (120). However, in this former study, few “explanatory” variables from the donor and recipient (donor age, cold ischemia time, anti T -PRA, calcineurin Inhibitor) were found to account for prolonged DGF. Based on the hypothesis that as yet unidentified donor parameters are risk factors for DGF, the aim of the present study was to explore whether, in addition to classical donor and recipient variables, brain-dead donor parameters including those related to resuscitation, correlate with a DGF \geq 6 days. The population under study

comprised 262 consecutive brain-dead donors harvested in our centre from 1990 to 2003 that enabled transplantation in 449 recipients. Using a statistical method taking into account the dependence of the two kidneys stemming from the same donor, we show that several parameters are significantly associated with poor initial graft function, including brain dead donor resuscitation parameters which influence DGF duration and probably reflect both donor hemodynamic instability and the level of management of the brain dead donor. Moreover, we show that the classical cold ischemia time parameter, which plays a crucial role in prolonged DGF, is much shorter than previously described in the literature (240-242), in agreement with data from the US Renal Data System Registry which indicated that DGF increases by 23% every 6 hours of CIT (229). Finally, and paradoxically, we show evidence that recipient age above 55 years is clearly an independent risk factor for prolonged DGF, whereas donor age seems to be only a dependent risk factor.

Patients and Methods

Study patients

1827 adult recipients received a kidney transplant in our center between 1990 and 2003. Since the main aim of the study was to assess the effect of brain dead donor resuscitation on prolonged DGF, to increase the homogeneity for the resuscitation and retrieval procedure only 449 recipients who received a graft from 262 brain dead donors *consecutively* harvested in the intensive care unit of our center were retained.

Donors - Donor-related resuscitation data were extracted from intensive care unit

observations from the time of the brain death diagnosis (first flat electroencephalography or cerebral tomodensitometry) to the retrieval procedure. For statistical analysis, resuscitation parameters included: type and volume of gelatin as a volume plasma expander

(hydroxyethylstarch colloid (HES) versus gelatins), number of blood transfusions, type of vasopressor employed (Dobutamine, Dopamine, Epinephrine, Norepinephrine), occurrence of

hypotensive shock due to high variations in blood pressure during intensive care stay, hypotensive shock criteria were retained as defined by at least one episode of systolic pressure below 80 mm Hg), cardiac arrest, duration in intensive care, creatinemia and uremia at retrieval procedure, and urine production. Other parameters were: donor age and gender, cause of death (vascular or traumatic), history of hypertension, diabetes, dyslipidemia, alcoholism, use of iodinated contrast-media, multiple organ retrieval procedure (liver, heart, lung, pancreas and kidney), and organ preservation fluid utilised (Celsior®, Wisconsin®, Collins®, PCH® and others).

Recipients- Only transplants performed in our centre were taken into consideration to minimise the “centre effect” and to take advantage of the prospective data retrieval of the D.I.V.A.T data bank (Données Informatisées et Validées en Transplantation) (see below). Kidneys were attributed to 449 local recipients of a kidney alone or a combined pancreas and kidney graft. Recipient data were extracted from the D.I.V.A.T. data bank (in which the biological and clinical data of our transplant patients have been prospectively recorded by a clinical research assistant independent of the medical team since 1990. The data are computerized in real time as well as at each transplant anniversary. The data are submitted to an annual audit on random patients according to the data sources. The quality of the D.I.V.A.T. data bank is guaranteed by only allowing an error of less than 1% . Effect of recipient age, gender, initial disease (glomerulopathy, hemolytic uremic syndrome and focal and segmental glomerular sclerosis versus others), history of hypertension, type of graft (kidney or combined kidney and pancreas), highest level of anti-class I panel reactive antibodies, HLA-A-B-DR incompatibilities, cold ischemia time, usage of Thymoglobulin® induction, type of calcineurin inhibitor (Sandimmun®, Neoral® or Prograf®), Cellcept® in the maintenance therapy and year of transplantation were tested in the model.. Fifty five percents of patients received ATG induction therapy relayed by a calcineurin inhibitor, 17.5%

received an anti IL2 R , , 11.5% received another inductions (anti LFA1, anti CD4, LF08) and 16.7% received no induction.

“Agence de Biomedecine” codes were used so as to assure donor and recipient anonymity. In addition, the D.I.V.A.T. data bank has received the approval of the “Comité National Informatique et Liberté”.

Statistical analysis

DGF study – In a previous study (120), we have defined the DGF by the number of days after the transplantation to reach a Cockcroft calculated creatinine clearance above 10 mL/min (the patients who would have spontaneously reached 10 ml/min of cCrCl at least 48h after the last day of dialysis). According to this definition, we had already identified that a DGF longer than 6 days was a strong predictive factor for graft loss. According to this first observation and given that this cut-off remained true when applied to the whole population included in the study period (1990 to 2003), (data not shown), we used the same binomial cut-off for DGF (< 6 days vs. \geq 6 days, definition in days of DGF) in order to investigate donor and recipient risk factors for prolonged DGF \geq 6 days. However, given that our definition is not yet routinely used to determine the DGF, we compared our results with a more “classical” definition which is the requirement of dialysis in the first week post transplantation (Dialysis definition) (127). To take into account the fact that two grafts are derived from the same donor (paired data), we used a Marginal logistic model with generalized least squares (GLS) (243). Assuming that DGF is binomial in distribution and that correlation was exchangeable, covariates were selected with a univariate strategy and a two-sided α level of 0.20. An α -level of 0.05 was used to retain covariates in the multivariate model. Thus, because the risk of DGF is not proportional to quantitative covariate value (for example, donor age), it does not

respect the log-linearity assumption required for the logistic regression. Thus, in order to respect this hypothesis, all the covariates were transformed to categorical covariates.

Because the covariate thresholds were ill defined in the literature concerning the risk of DGF, they were calculated by maximizing the likelihood of the corresponding univariate model. Statistical analyses were performed using R version 2.1.

Results

Demographic characteristics of the 262 consecutive donors (Table 1)

Mean age was of 38.2 years (16-83) with 58% of donors older than 35 years and 16% older than 55 years. Males represented 69.5% of the study population. Donor characteristics and parameters of resuscitation in the intensive care unit recorded between the time of diagnosis of brain death and the kidney retrieval are presented in Table 1. Several characteristics of this population are worth noting. Nineteen percent (19%) of donors presented a prior history of hypertension and 30% of alcoholism (26 % of missing data). Iodinated contrast products were used in almost half of the donors (52.1%) for brain death diagnosis. A large majority of patients received colloids as plasma volume expanders during the resuscitation (91.6%) with a mean of 1645.2 mL (IC=(1509-1781)) and 62% received hydroxyethylstarch colloid (HES) with a mean of 944 mL (IC=(43-1045)). Vasopressive drugs were administered in 82.4% after brain death, with Dopamine® being used in 74.9%. A severe hypotensive episode was recorded in 51% of patients and 4.5% presented an episode of cardiac arrest.

Demographic characteristics of the 449 recipients (Table 2)

Mean age of the recipients was 44.5 years (range 4-77) with 28% older than 55 years and 62.8% male. The initial disease was a glomerulopathy in 31.2%. Thirteen percent (13%) of patients received a combined kidney and pancreas transplantation for a type I diabetes nephropathy. Thirty two percent (32%) of the patients were immunised against HLA class I

with a PRA mean of 11.5% . The mean HLA incompatibility index with the donor was 3.5. Twenty nine % of patients had recurrent post-transplant dialysis and 7% once after surgery , with a dialysis mean of 1.2. The mean delayed graft function was 6.4 days according to the creatinine clearance threshold criteria (see Patients and Methods). Thymoglobulin® induction (7 to 10 days) was administered in 55.2% with a delayed introduction (7 days) of calcineurin inhibitors. The maintenance therapy improved over the course of the study follow-up with the appearance of new drugs and particularly of Mycophenolate Mofetil (Cellcept®, Roche Neuilly France) which was introduced in all recipients from 1997 onwards (i.e. 38.5% of all study patients).

Univariate analysis

The mean DGF was 6.4 days and 40% of patients (n=180) presented a DGF longer than 6 days. With regard to DGF, covariate thresholds were retained in order to best fit with the logistic model. Indeed, no threshold for this type of analysis is clearly defined in the literature. The selected thresholds were those that minimized the deviance from the model (figure 1). The univariate analysis showed that some parameters correlated with a lower risk factor for prolonged DGF ≥ 6 days. For the donor, a stay in intensive care longer than 40 hours (OR= 0.44, $p=0.0014$), an infusion of more than 1250 mL of colloids other than HES after brain death during resuscitation (OR = 0.53, $p = 0.0037$) and multiple organ retrieval including the heart (OR= 0.63, $p = 0.037$) are associated with a lower risk of prolonged DGF ≥ 6 days. On the other hand, donor age above 35 years (OR= 1.88, $p<0.0053$), female donors (OR = 1.65, $p = 0.036$), a past history of hypertension (OR= 2.51, $p=0.0037$), Epinephrine (OR = 2.82, $p=0.011$) and infusion of more than 1500 mL of HES colloids (OR = 1.82, 0.017) after brain death were risk factors for a prolonged DGF ≥ 6 days. (Table 3)

For the recipient, female gender (OR= 0.66, p=0.049) and combined kidney and pancreas transplantation (OR= 0.17, p = 0.0038) were associated with a lower risk of prolonged DGF \geq 6 days. A low CIT threshold than that previously described (CIT \geq 16 h) was associated with a higher risk of prolonged DGF (OR = 2.05, p = 0.0049). Finally, recipients age was highly associated with a prolonged risk of DGF when above 55 years (OR = 1.68, p = 0.019) (Table 4)

Multivariate analysis : Marginal logistic model according to the definition in days of the DGF

When applying multivariate logistic regression analysis to DGF, the use of Epinephrine during the donor resuscitation (p<0.001, OR = 4.35), a CIT above 16 hours (p=0.01, OR= 2.16), and a recipient age older than 55 years (p=0.003, OR=2.75) were clearly associated with an increased risk of prolonged DGF. On the other hand, the probability of a shorter DGF was highly associated with the administration of a total volume of colloids (*other than HES*) above 1250 ml (p<0.0002, OR=0.40). Finally, a stay in the intensive care unit of more than 40 hours (p=0.0003, OR = 0.40), a combined kidney and pancreas transplant (p=0.0004, OR = 0.19), the use of thymoglobulin® for induction (p=0.0134, OR = 0.55) and a maintenance immunosuppressive therapy with Cellcept® (p=0.0001, OR = 0.41) were significantly associated with a shorter DGF.

Multivariate analysis : Marginal logistic model according to the dialysis definition of the DGF

In this model, we found that the risk of DGF according to dialysis requirement during the first week post transplantation, correlates with the history of donor hypertension (p<0.0004, OR 2.97), the use of Epinephrine during donor resuscitation (p= 0.0093, OR = 3.13), the infusion of more than 750 mL of HES colloids after brain death (p=0.018, OR = 1.80) and a cold ischemia time longer than 24h. Details of both logistic regression analysis and the mean DGF values according to each definition and covariates are presented in Table 5 and 6.

The correlation parameters of the autoregressive regression 1 (AR(1)) structure equals 0.20. Finally, according to all the covariates, two transplants derived from the same donor can be considered as independent. Finally, our statistical approach (marginal logistic model), enables us to assume that the majority of the donor-related parameters have been taken into account in our study and that there is no hidden donor covariate.

Discussion

Despite a decade of progress in kidney transplantation, non-immune factors remain a major influence on graft outcome, as suggested by a rate of graft loss that has been only poorly influenced by the level of immunosuppressive drug exposure after one year (244-246). In addition, non-immune parameters, such as donor age (89) or graft ischemia, have been shown to strongly affect the host immune response (247). Because, donor parameters represent potentially important risk factors in terms of kidney graft outcome (130, 234, 248-250), Some authors have proposed donor scoring system for cadaveric renal transplantation (251). Recent studies have suggested that donor factors may account for 35 to 45 % of the variability in graft function (252, 253). Particularly, brain death itself has a serious impact on organ quality and graft outcome (110, 254). Other authors have pointed out that some risk factors are more specifically related to the resuscitation procedure of the brain dead donor, such as the type of fluid expander (111, 238) or vasopressive drugs (237). The aim of our study was to explore the consequences of a large number of donor-related parameters, particularly following the diagnosis of brain death and the organ retrieval procedure. Compared to previous reports, our study is also based on a larger and monocentric cohort. In addition, because two different recipients receive kidneys from the same donor, and to avoid masking the importance of donor factors using a classical paired statistical analysis, we took advantage of a statistical

method using a marginal model (243). This model can be used to test all the donor covariates and to assess their consequences in the early outcome.

The role of donor covariates on delayed graft function was studied using the cut-off of 6 days of DGF (120), instead of the level of post-transplant urine output (127, 255). This choice was founded on a former study by our group of the role of DGF defined as “the time for the kidney to reach a calculated clearance above 10 mL/min” based on a large cohort of kidney recipients between 1986 and 1995. However, because this definition is not used routinely we conducted a comparison study using a more “classical” definition of DGF according to the need for dialysis during the first week post transplantation. In the present study (1827 patients between 1990 and 2003) we confirm that prolonged DGF ≥ 6 days does indeed have a major impact on graft loss (10% lower graft survival at 10 years in the group of prolonged DGF ≥ 6 days, $p < 0.001$). We observed that 21% of patients with a DGF longer than 6 days did not undergo dialysis as they maintained diuresis, a stable weight and a good tolerance of uremia despite a clearance < 10 ml/min. On the other hand, 7.5% of patients with a DGF shorter than 6 days underwent dialysis because of hyperkalemia or because they were overweight confirming that the requirement of dialyses is not enough accurate to define the DGF. Finally, we show that both definitions give the same risk factors for DGF (except past history of donor hypertension) but with a different cut-off. Nevertheless, the statistical model does not make it possible to determine whether the difference found for the cut-offs are statistically different. However, we show that the model using the definition in days of DGF ($<$ or ≥ 6 days) enhances the number of explanatory variables and thus is probably more interesting for the physician . A recent study of Schnuelle showed that dialysis requirement post-transplantation was not a significant explanatory variable in the multivariate analysis of five-year graft survival contrary to the one week graft fonction, confirming our choice of DGF definition with the creatinine clearance. (256).

Finally, The aim of the study was to determine which recipient and donor parameters, especially those stemming from the brain death status and the retrieval procedure, are risk factors for prolonged DGF. In order to guarantee homogeneity in terms of the resuscitation and retrieval procedure, only the 449 recipients who received a graft from 262 brain dead donors consecutively harvested in the intensive care unit of our centre were retained. Among the large numbers of donor resuscitation parameters studied in the model, few were associated with an increased risk of prolonged DGF, except Epinephrine infusion, which increased the risk by 4.3 and possibly reflects the worse effect on serum creatinin in high dose catecholamines treated donors (113) and/or the habits of the intensivist of our center who use preferentially this drug in case of hemodynamic and cardiogenic instability in the donor expecting a beneficial effect of its more powerful beta-adrenergic effect in comparison to norepinephrine. Therefore epinephrine was used in patients with more severe hemodynamic alterations justifying higher dosage, so higher vasoconstrictive effect, and more renal impairment for these two reasons. On the contrary, other resuscitation covariates are likely associated with a shorter DGF that could be related to efficient resuscitation, control of the hemodynamics of the donor, and good quality of the organ as suggested by the effect of infusion of large volume expanders (>1250 ml), length of stay in intensive care (>=40 hours) and multiple organ donation (heart procurement) or by other possible relevant parameters involved in the good quality of the graft which could explain the shorter DGF, such expensive preservation fluid for instance, in the combined kidney and pancreas transplantation. Nevertheless, a trend for HES infusion (>1500 ml) during resuscitation, which was found to be a risk factor for prolonged DGF possibly because of a direct nephrotoxic effect of some compounds (238), suggest it should be avoided during donor resuscitation. (111). One hypothesis is that HES colloid infusion (at or above a critical volume) could generate deleterious histological lesions (osmotic nephrosis-like lesions) (257). These lesions,

particularly when generated in impaired kidneys, could increase the risk of early failure (DGF). However, no biopsies were performed on HES-treated donor kidneys before transplantation in our cohort. ATG induction therapy also seems to protect against DGF, acting directly (on graft mononuclear infiltrate) rather than because of a delayed introduction of calcineurin inhibitors (258) (259). Finally, half of the patients received Cellcept® for maintenance therapy, which is significantly associated with a lower risk of prolonged DGF, confirming a possible protective effect of this drug against DGF (260) (261).

Importantly, we found recipient and donor age to be risk factors for prolonged DGF ≥ 6 days in the univariate model. However, the marginal model identified recipient but not donor age as the independent risk factor for DGF, contrasting with what has been described elsewhere (255). This difference may be due to the link between the two variables (our current practice is to match donor and recipient age) and the shorter cut off for donor age (35 years) which we have statistically calculated by maximizing the likelihood in the univariate model to fits better with the clinical reality. One explanation could be the advanced vascular disease in older recipients (103), which increases the risk of hypoxia and ischemic damage of the usually aged-matched in suboptimal kidney from old donors who are becoming the average donor in many programs over the world. In our study, 29% of recipients older than 55 years had a past history of vascular disease and 40% presented early vascular events after transplantation (Stroke, arteritis etc) versus 12% and 20 % respectively in younger patients ($p < 0.001$).

Taken together, based on a larger number of brain dead donors than in previous studies, we show that several donor parameters have a significant impact on DGF and are dependent on a good management of the donor in the intensive care unit. We also suggest that donor age might not be the leading independent parameter involved in DGF risk. Careful management of brain dead donor resuscitation, i.e. correction of plasma expander volume, limitation of HES

infusion combined with additional attempts to decrease CIT above 16 hours, particularly in recipients older than 55 years, should further decrease DGF and increase graft survival.

Acknowledgement: we thank the Roche Laboratory for its support of the DIVAT data bank, Genzyme Laboratory for its statistics financial contribution and Dr J.Ashton-Chess for editing the manuscript.

Table 1 Donor Characteristics

n = 262	Average or percentage	IC 95%
Donor age	38.2 years	[36.8-39.5]
Male donor	69.5%	[65.2-73.7]
History of hypertension	19.0%	[14.8-23.2]
History of diabetes	3.0%	[1.2-4.9]
History of dyslipidemia	5.1%	[2.7-7.5]
History of alcoholism	30.1%	[25.2-35.1]
Cause of death (cerebral vascular accident)	52.0%	[46.0-58.0]
Iodinated contrast-media	52.1%	[47.5-59.7]
Hydroxyethylstarch gelatin HES	61.9%	[57.4-66.4]
Colloids other than HES	82.2%	[78.6-85.7]
Volume of HES	944.0 mL	[843.1-1044.9]
Volume of gelatin other than HES	1645.0 mL	[1509-1781.1]
Dopamine	74.9%	[69.8-78.0]
Dobutamine	11.8%	[8.8-14.8]
Epinephrine	7.6%	[5.1-10.0]
Norepinephrine	17.2%	[13.8-20.7]
Albumin	16.3%	[12.8-19.8]
Cardiovascular shock	51.0%	[46.4-55.6]
Cardiac arrest	4.5%	[2.5-6.4]
Duration in intensive care	78.4 hours	[55.7-101]
Uremia at organ procurment	5.8 mmol/L	[5.4-6.2]
Creatinemia at organ procurment	99.6 µmol/L	[93.6-105.6]

Table 2 Recipient Characteristics

n = 449	Average or percentage	IC 95%
Age	44.5 years	[43.2-45.8]
Male recipient	62.8	[58.8-67.2]
Initial disease potentially recurrent*	31.2%	[26.9-35.5]
Combined kidney /pancreas graft	13.0%	[9.9-16.2]
History of hypertension	19.0%	[14.8-23.2]
Anti T PRA (%)	11.3	[9.0-13.6]
% anti T PRA>0	32.5%	[28.1-36.9]
Inc HLA-A-B-DR	3.5	[3.3-3.6]

Delayed graft function (days)	6.5	[5.8-7.1]
Number of post transplant dialyses	1.2	[1.0-1.5]
ATG induction therapy	55.2%	[50.6-59.9]
Cellcept® maintenance therapy	38.5%	[34.0-43.0]

*immune Glomerulopathy, hemolytique and uremic syndrome and focal and segmental glomerular sclerosis.

Table 3 Univariate analysis ; Donor covariates

	OR	IC 95 %	p-value
Female donor	1.65	[1.05-2.59]	0.0306
History of hypertension	2.51	[1.34-4.70]	0.0037
History of diabetes	2.14	[0.51-8.94]	0.2947
History of dyslipidemia	0.97	[0.31-3.02]	0.9530
History of ethylism	1.13	[0.65-1.95]	0.6548
Iodinated contrast-media	1.02	[0.66-1.57]	0.9403
Dobutamine	0.90	[0.45-1.78]	0.7525
Epinephrine	2.83	[1.27-6.32]	0.0112
norepinephrine	1.03	[0.58-1.82]	0.9074
Hydroxyethylstarch gelatin HES > 1500 mL	1.82	[1.12-2.97]	0.0173
Colloids other than HES > 1250 mL	0.53	[0.34-0.81]	0.0037
Blood Transfusion	0.69	[0.44-1.08]	0.1151
Colloids other than HES	1.01	[0.66-1.55]	0.9782
Cardiac arrest	1.72	[0.64-4.57]	0.2790
Heart retrieval	0.63	[0.41-0.96]	0.0371
Lung retrieval	0.84	[0.45-1.53]	0.5665
Pancreas retrieval	0.80	[0.49-1.31]	0.3668
Liver retrieval	0.68	[0.44-1.07]	0.0965
Organ preservation fluid (celsior or Collins)	0.91	[0.42-1.99]	0.8157
Organ preservation fluid (others)	0.72	[0.44-1.18]	0.1975
Donor age > 35 years	1.88	[1.22-2.89]	0.0053
Uremia at retrieval time > 5.5 mmol/L	0.78	[0.46-1.32]	0.3472
Creatinemia at retrieval time > 70 µmol/L	1.42	[0.79-2.55]	0.2450
Urine output > 4500 mL	1.22	[0.79-1.88]	0.3749
Duration in intensive care > 40 hours	0.44	[0.26-0.73]	0.0014

Table 4 Univariate analysis ; Recipients covariates

	OR	IC 95 %	p-value
Female recipient	0.66	[0.44-1.00]	0.0499
Initial disease potentially recurrent*	1.20	[0.81-1.77]	0.3874
Combined kidney /pancreas graft	0.17	[0.05-0.56]	0.0038
History of hypertension	0.94	[0.60-1.48]	0.7883
ATG induction therapy	0.68	[0.46-1.01]	0.0589
Sandimum® maintenance therapy	0.72	[0.55-1.32]	0.4786
Neoral® maintenance therapy	0.82	[0.39-1.69]	0.5826
Prograf® maintenance therapy	0.75	[0.34-1.68]	0.4900
Cellcept® maintenance therapy	0.68	[0.44-1.04]	0.0833
% anti T PRA>0	1.34	[0.90-;1.98]	0.1625
Recipient age > 55 years	1.68	[1.09-2.59]	0.0194
Incompatibilities HLA-A-B-DR > 3	0.74	[0.50-;1.10]	0.1345
Year of graft > 1996	0.73	[0.47-;1.15]	0.1740
Cold ischemia time > 16 hours	2.05	[1.24-3.39]	0.0049

Table 5 Logistic Model of Explicative Variables of DGF

	Coef	Et	OR	IC 95%	p value
Intercept	-0.35	0.51	0.70	[0.26-1.91]	0.4848
Donor sex	0.46	0.25	1.58	[0.97-2.59]	0.0636
Epinephrine	1.47	0.45	4.35	[1.80-10.5]	0.0010
Gelatin other than HES >1250 ml	-0.92	0.24	0.40	[0.25-0.64]	0.0002
HES gelatin >1500 mL	0.49	0.29	1.63	[0.92-2.88]	0.0900
Duration in Intensive care > 40 hours	-0.92	0.25	0.40	[0.24-0.65]	0.0003
Recipient sex	-0.17	0.29	0.84	[0.48-1.49]	0.5448
Recipient age > 55 years	1.01	0.34	2.75	[1.41-5.35]	0.0033
Combined Kidney/pancreas graft	-1.64	0.46	0.19	[0.08-0.48]	0.0004
ATG induction therapy	-0.60	0.24	0.55	[0.34-0.88]	0.0134
Cellcept® maintenance therapy	-0.90	0.27	0.41	[0.24-0.69]	0.0001
Cold Ischemia Time > 16 hours	0.77	0.30	2.16	[1.20-3.89]	0.0102
(Sex recipient x age recipient > 55)	-1.29	0.56	0.28	[0.09-0.82]	0.0200

Table 6 Logistic Model of Explicative Variables of DGF according to the dialysis definition

	Coef	Et	OR	IC 95%	p value
Intercept	-1.42	0.25	0.24	[0.15-0.39]	0.0001
Donor hypertension	1.09	0.31	2.97	[1.62-5.46]	0.0004
Epinephrine	1.14	0.44	3.13	[1.32-7.41]	0.0093
HES gelatin >750 mL	0.59	0.25	1.80	[1.11-2.94]	0.0186
Cold Ischemia Time > 24 hours	0.74	0.24	2.10	[1.31-3.35]	0.0023

Legends

Table 1 - Donor characteristics

262 consecutive brain dead donors from the same centre were included in the study. Donor parameters (age, sex, medical history, cause of death) were retrospectively collected. The resuscitation parameters were recorded between the time of diagnosis of brain death and the retrieval procedure i.e : type of vasopressive drugs, type and volume of colloid plasma expander, hypotensive shock, cardiac arrest, urine volume and renal function.

Table 2 - Recipient characteristics

449 recipients received transplants in the same transplantation centre from 262 donors. 87% received a kidney alone and 13% received a combined kidney and pancreas transplant.

Table 3 - Univariate analysis ; Donor covariates describes the covariates of the donor according to the 6 day threshold of DGF. The cut off for each variable was assessed by maximizing the likelihood of the corresponding univariate model. Few covariates of the donor resuscitation correlate with an increase risk of prolonged DGF ≥ 6 days except HES colloids and epinephrin infusion after brain death. Donor age ≥ 35 years (much younger than that usually described) is a risk factor for prolonged DGF.

Table 4 - Univariate analysis ; Recipient covariates describes the covariates of the recipient according to the 6 day threshold of DGF. Only recipient older than 55 years and CIT longer than 16 hours appear to correlate with a risk of prolonged DGF ≥ 6 days.

Table 5 – The final multivariate model of delayed graft function according the the daily definition describes the covariates of a DGF according to a 6-day cut-off (see Materials and Methods.). Epinephrin administration, HES infusion, recipient age above 55 years and cold ischemia time duration increase the probability of a prolonged DGF. There is an interaction

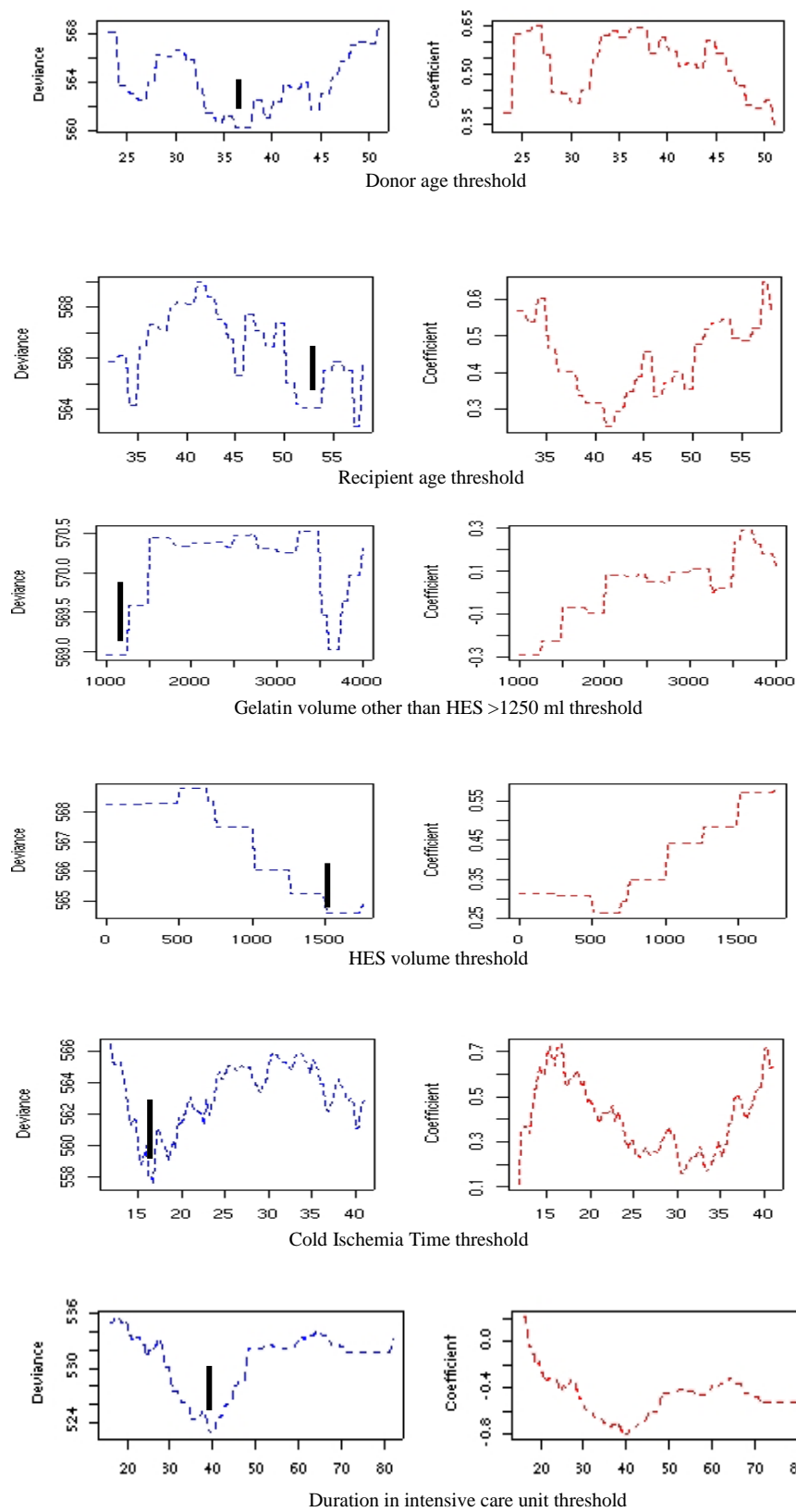
between recipient age > 55 years and sex ($p=0.02$). Also, male recipients older than 55 years are significantly more at risk of prolonged DGF ($p<0.003$) than female recipients within the same age range ($p=0.51$).

Table 6 – The final multivariate model of delayed graft function according to the dialysis definition. Donor hypertension, Epinephrin administration, HES infusion and cold ischemia time duration increase the probability of a prolonged DGF.

Figure 1

No threshold for this type of analysis has been clearly defined in the literature. In our statistical model, the selected thresholds are those which minimize the deviance of the model indicated by a bold line : 35 years of age for the donor, 55 years of age for the recipient, 1250 mL of colloids other than HES, 1500 mL of HES colloids, 16 hours of CIT and 40 hours in intensive care.

Figure 1



Effect of Brain-Dead Donor Resuscitation on Delayed Graft Function: Results of a Monocentric Analysis

Magali Giral,¹ Jean Pierre Bertola,² Yohann Foucher,³ Daniel Villers,² Evelyne Bironneau,² Yvonnick Blanloeil,⁴ Georges Karam,⁵ Pascal Daguin,¹ Lydie Lerat,¹ and Jean Paul Souillou^{1,6}

Background. We have previously shown that a delayed graft function (DGF) longer than 6 days was a crucial threshold for long-term graft outcome. The aim of this study was to analyze the correlation of DGF ≥ 6 days with brain-dead donor variables, including those related to resuscitation, in a population of 262 consecutive brain-dead donors from 1990 to 2003.

Methods. We used a marginal logistic model in which DGF was considered as a binary variable with a cutoff of 6 days. **Results.** Monovariate analysis of donor parameters showed that male, age above 35 years, primary history of hypertension, hydroxyethyl starch (HES) fluid greater than 1500 mL or epinephrine infusion during resuscitation were risk factors for prolonged DGF. The multivariate logistic regression model showed that epinephrine use during donor resuscitation ($P < 0.001$, odds ratio [OR] = 4.35), cold ischemia time (CIT) ≥ 16 hr ($P = 0.01$, OR = 2.16), and recipient age > 55 years ($P = 0.003$, OR = 2.75), were associated with a risk of prolonged DGF. A long stay (> 40 hr) in intensive care and a large volume of colloids (> 1250 mL, except HES) correlated with a lower risk of DGF.

Conclusion. Our study shows an impact for only a limited number of brain dead donor resuscitation parameters on DGF duration. We also show that CIT has a much lower threshold (< 16 hr) for DGF risk than previously described. Importantly, we show that recipient age is clearly a major independent risk factor for prolonged DGF, whereas donor age seems to act mostly as a dependent risk factor.

Keywords: Brain death, Kidney/renal, Delayed graft function, Ischemia reperfusion.

(*Transplantation* 2007;83: 1174–1181)

Kidney graft outcome is influenced by multiple parameters, among which the host-versus-graft immune response represents a major component. Nevertheless, nonimmune factors such as delayed graft function (DGF) (1, 2), which is the most common complication affecting kidney allografts in the immediate posttransplant period, have also been shown to be deleterious for graft outcome (3, 4). Although experimental studies have shown the crucial role of ischemia reperfusion injury in the physiopathology of DGF (5), the relative contribution of donor or recipient-related factors to the development of DGF are still debated. Certain donor-related factors (6–8), such as insults stemming from the brain death status and the retrieval procedure (9–11), have been shown to influence graft outcome. In addition, several studies have already shown that some drugs used during donor resuscitation, such as adrenergic agents (12), certain types of colloid plasma expanders (i.e., hydroxyethyl starch [HES]) (13, 14) or desmopressin (15), can be associ-

ated with poor subsequent graft outcome. However, to our knowledge, studies devoted to brain dead donor parameters are all based on relatively small donor cohorts (6) or have only analyzed a restricted numbers of parameters (7, 16). In a previous study, we showed that a “dose” of DGF greater than 6 days (i.e., the number of days after the transplantation to reach a creatinine clearance above 10 mL/min) was a crucial threshold for long-term graft outcome (1). However, in this former study, few “explanatory” variables from the donor and recipient (donor age, cold ischemia time [CIT], anti-T panel reactive antibodies [PRA], calcineurin inhibitor) were found to account for prolonged DGF. Based on the hypothesis that as yet unidentified donor parameters are risk factors for DGF, the aim of the present study was to explore whether, in addition to classical donor and recipient variables, brain-dead donor parameters including those related to resuscitation, correlate with a DGF ≥ 6 days. The population under study comprised 262 consecutive brain-dead donors harvested in our center from 1990 to 2003 that enabled transplantation in 449 recipients. Using a statistical method taking into account the dependence of the two kidneys stemming from the same donor, we show that several parameters are significantly associated with poor initial graft function, including brain dead donor resuscitation parameters which influence DGF duration and probably reflect both donor hemodynamic instability and the level of management of the brain dead donor. Moreover, we show that the classical cold ischemia time parameter, which plays a crucial role in prolonged DGF, is much shorter than previously described in the literature (17–19), in agreement with data from the U.S. Renal Data System Registry, which indicated that DGF increases by 23% every 6 hr of CIT (2). Finally, and paradoxically, we show evidence that recipient age > 55 years is clearly an independent risk factor for prolonged DGF, whereas donor age seems to be only a dependent risk factor.

¹ Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation and INSERM U643 (Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantation), Nantes, France.

² Service de Réanimation Médicale du CHU de Nantes, Nantes, France.

³ Institut Universitaire de Recherche Clinique, Unité de Biostatistique, Montpellier, France.

⁴ Service de Réanimation Neurochirurgicale du CHU de Nantes, Saint Herblain, France.

⁵ Service d'Urologie du CHU de Nantes, Nantes, France.

⁶ Address correspondence to: Jean Paul Souillou, M.D., Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation and INSERM U643 (Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantation), 30 bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.

E-mail: jean-paul.souillou@univ-nantes.fr

Received 28 July 2006. Revision requested 26 October 2006.

Accepted 26 January 2007.

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/07/8309-1174

DOI: 10.1097/01.tp.0000259935.82722.11

Q: 4

PATIENTS AND METHODS

Study Patients

A total of 1827 adult recipients received a kidney transplant in our center between 1990 and 2003. Because the main aim of the study was to assess the effect of brain dead donor resuscitation on prolonged DGF, to increase the homogeneity for the resuscitation and retrieval procedure, only 449 recipients who received a graft from 262 brain dead donors consecutively harvested in the intensive care unit of our center were retained.

Donors

Donor-related resuscitation data were extracted from intensive care unit observations from the time of the brain death diagnosis (first flat electroencephalography or cerebral tomodensitometry) to the retrieval procedure. For statistical analysis, resuscitation parameters included: type and volume of gelatin as a volume plasma expander (HES colloid versus gelatins), number of blood transfusions, type of vasopressor employed (dobutamine, dopamine, epinephrine, norepinephrine), occurrence of hypotensive shock due to high variations in blood pressure during the intensive care stay, hypotensive shock criteria were retained as defined by at least one episode of systolic pressure below 80 mm Hg), cardiac arrest, duration in intensive care, creatinemia and uremia at retrieval procedure, and urine production. Other parameters were: donor age and gender, cause of death (vascular or traumatic), history of hypertension, diabetes, dyslipidemia, alcoholism, use of iodinated contrast-media, multiple organ retrieval procedure (liver, heart, lung, pancreas and kidney), and organ preservation fluid utilized (Celsior, Wisconsin, Collins, and others).

Recipients

Only transplants performed in our center were taken into consideration to minimize the "center effect" and to take advantage of the prospective data retrieval of the *Données Informatisées et Validées en Transplantation* (DIVAT data bank; see below). Kidneys were attributed to 449 local recipients of a kidney alone or a combined pancreas and kidney graft. Recipient data were extracted from the DIVAT data bank, in which the biological and clinical data of our transplant patients have been prospectively recorded by a clinical research assistant independent of the medical team since 1990. The data are computerized in real time as well as at each transplant anniversary. The data are submitted to an annual audit on random patients according to the data sources. The quality of the DIVAT data bank is guaranteed by only allowing an error of less than 1%. Effect of recipient age, sex, initial disease (glomerulopathy, hemolytic uremic syndrome, and focal and segmental glomerular sclerosis versus others), history of hypertension, type of graft (kidney or combined kidney and pancreas), highest level of anti-class I PRA, human leukocyte antigen (HLA)-A-B-DR incompatibilities, cold ischemia time, usage of Thymoglobulin induction, type of calcineurin inhibitor (Sandimmune, Neoral, or Prograf), Cellcept in the maintenance therapy and year of transplantation were tested in the model. A total of 55% of patients received antithymocyte globulin (ATG) induction therapy relayed by a calcineurin inhibitor, 17.5% received an anti-

interleukin (IL)2R, 11.5% received another inductions (anti-LFA1, anti-CD4, LF08), and 16.7% received no induction.

Agence de Biomedecine codes were used so as to assure donor and recipient anonymity. In addition, the DIVAT data bank has received the approval of the *Comité National Informatique et Liberté*.

Statistical Analysis

DGF Study

In a previous study (1), we have defined the DGF by the number of days after the transplantation to reach a Cockcroft calculated creatinine clearance (cCrCl) above 10 mL/min (the patients who would have spontaneously reached 10 mL/min of cCrCl at least 48 h after the last day of dialysis). Using this definition, we had already identified that a DGF longer than 6 days was a strong predictive factor for graft loss. According to this first observation and given that this cutoff remained true when applied to the whole population included in the study period (1990 to 2003; data not shown), we used the same binomial cutoff for DGF, so-called definition in days of DGF (<6 days vs. ≥6 days), in order to investigate donor and recipient risk factors for prolonged DGF ≥6 days. However, given that our definition is not yet routinely used to determine the DGF, we compared our results with a more "classical" definition, which is the requirement of dialysis in the first week posttransplantation (dialysis definition of DGF) (5). To take into account the fact that two grafts are derived from the same donor (paired data), we used a marginal logistic model with generalized least squares (GLS) (20). Assuming that DGF is binomial in distribution and that correlation was exchangeable, covariates were selected with a univariate strategy and a two-sided a level of 0.20. An α -level of 0.05 was used to retain covariates in the multivariate model. Importantly, because the risk of DGF is not proportional to quantitative covariate value (for example, donor age), it does not respect the log-linearity assumption required for the logistic regression. Thus, in order to respect this hypothesis, all the covariates were transformed to categorical covariates.

Because the covariate thresholds were ill defined in the literature concerning the risk of DGF, they were calculated by maximizing the likelihood of the corresponding univariate model. Statistical analyses were performed using R version 2.1.

RESULTS

Demographic Characteristics of the 262 Consecutive Donors

Demographic characteristics of the 262 consecutive donors are presented in Table 1. Mean age was 38.2 years (16–83) with 58% of donors older than 35 years and 16% older than 55 years. Males represented 69.5% of the study population. Donor characteristics and parameters of resuscitation in the intensive care unit recorded between the time of diagnosis of brain death and the kidney retrieval are presented in Table 1. Several characteristics of this population are worth noting. Nineteen percent of donors presented a prior history of hypertension and 30% of alcoholism (26% of missing data). Iodinated contrast products were used in almost half of the donors (52.1%) for brain death diagnosis. A large majority of patients received colloids as plasma volume expanders during

TABLE 1. Donor characteristics

Characteristic	Average or percentage	95% confidence interval
Donor age (years)	38.2	36.8–39.5
Male donor	69.5%	65.2–73.7
History of hypertension	19.0%	14.8–23.2
History of diabetes	3.0%	1.2–4.9
History of dyslipidemia	5.1%	2.7–7.5
History of alcoholism	30.1%	25.2–35.1
Cause of death (cerebrovascular accident)	52.0%	46.0–58.0
Iodinated contrast-media	52.1%	47.5–59.7
Hydroxyethyl starch (HES)	61.9%	57.4–66.4
Colloids other than HES	82.2%	78.6–85.7
Volume of HES (mL)	944.0	843.1–1044.9
Volume of gelatin other than HES (mL)	1645.0	1509–1781.1
Dopamine	74.9%	69.8–78.0
Dobutamine	11.8%	8.8–14.8
Epinephrine	7.6%	5.1–10.0
Norepinephrine	17.2%	13.8–20.7
Albumin	16.3%	12.8–19.8
Cardiovascular shock	51.0%	46.4–55.6
Cardiac arrest	4.5%	2.5–6.4
Duration in intensive care (hours)	78.4	55.7–101
Uremia at organ procurement (mmol/L)	5.8	5.4–6.2
Creatinemia at organ procurement ($\mu\text{mol/L}$)	99.6	93.6–105.6

A total of 262 consecutive brain dead donors from the same center were included in the study. Donor parameters (age, sex, medical history, cause of death) were retrospectively collected. The resuscitation parameters were recorded between the time of diagnosis of brain death and the retrieval procedure were: type of vasopressive drugs, type and volume of colloid plasma expander, hypotensive shock, cardiac arrest, urine volume, and renal function.

the resuscitation (91.6%) with a mean of 1645.2 mL (95% CI 1509–1781) and 62% received HES colloid with a mean of 944 mL (95% CI 43–1045). Vasopressive drugs were administered in 82.4% after brain death, with dopamine being used in 74.9%. A severe hypotensive episode was recorded in 51% of patients and 4.5% presented an episode of cardiac arrest.

Demographic Characteristics of the 449 Recipients

Demographic characteristics of the 449 recipients are presented in Table 2. Mean age of the recipients was 44.5 years (range: 4–77) with 28% older than 55 years and 62.8% male. The initial disease was a glomerulopathy in 31.2%. Thirteen percent of patients received a combined kidney and pancreas transplantation for a type I diabetes nephropathy. Thirty-two percent (32%) of the patients were immunized against HLA class I with a PRA mean of 11.5%. The mean HLA incompatibility index with the donor was 3.5. Twenty-nine percent of patients had recurrent posttransplant dialysis and 7% once after surgery, with a dialysis mean of 1.2. The mean delayed graft function was 6.4 days according to the creatinine clear-

TABLE 2. Recipient characteristics

Characteristic	Average or percentage	95% confidence interval
Age (years)	44.5	43.2–45.8
Male recipient	62.8	58.8–67.2
Initial disease potentially recurrent ^a	31.2%	26.9–35.5
Combined kidney/pancreas graft	13.0%	9.9–16.2
History of hypertension	19.0%	14.8–23.2
Anti-T PRA	11.3%	9.0–13.6
Anti-T PRA >0	32.5%	28.1–36.9
HLA-A-B-DR incompatibilities	3.5	3.3–3.6
Delayed graft function (days)	6.5	5.8–7.1
Number of posttransplant dialyses	1.2	1.0–1.5
ATG induction therapy	55.2%	50.6–59.9
Cellcept maintenance therapy	38.5%	34.0–43.0

A total of 449 recipients received transplants in the same transplantation center from 262 donors; 87% received a kidney alone and 13% received a combined kidney and pancreas transplant.

^a Immune glomerulopathy, hemolysis, and uremic syndrome and focal and segmental glomerular sclerosis.

ance threshold criteria (see Patients and Methods). Thymoglobulin induction (7 to 10 days) was administered in 55.2% with a delayed introduction (7 days) of calcineurin inhibitors. The maintenance therapy improved over the course of the study follow-up with the appearance of new drugs and particularly of mycophenolate mofetil (Cellcept, Roche, Neuilly, France), which was introduced in all recipients from 1997 onwards (i.e., 38.5% of all study patients).

Univariate Analysis

The mean DGF was 6.4 days and 40% of patients (n=180) presented a DGF longer than 6 days. With regard to DGF, covariate thresholds were retained in order to best fit with the logistic model. Indeed, no threshold for this type of analysis is clearly defined in the literature. The selected thresholds were those that minimized the deviance from the model (Fig. 1). The univariate analysis showed that some parameters correlated with a lower risk factor for prolonged DGF ≥ 6 days. For the donor, a stay in intensive care longer than 40 hr (odds ratio [OR]=0.44, $P=0.0014$), an infusion of more than 1250 mL of colloids other than HES after brain death during resuscitation (OR=0.53, $P=0.0037$) and multiple organ retrieval including the heart (OR=0.63, $P=0.037$) are associated with a lower risk of prolonged DGF ≥ 6 days. On the other hand, donor age above 35 years (OR=1.88, $P<0.0053$), female donors (OR=1.65, $P=0.036$), a past history of hypertension (OR=2.51, $P=0.0037$), epinephrine (OR=2.82, $P=0.011$) and infusion of more than 1500 mL of HES colloids (OR=1.82, 0.017) after brain death were risk factors for a prolonged DGF ≥ 6 days (Table 3).

For the recipient, female gender (OR=0.66, $P=0.049$) and combined kidney and pancreas transplantation (OR=0.17, $P=0.0038$) were associated with a lower risk of prolonged DGF ≥ 6 days. A low CIT threshold than that previously described (CIT ≥ 16 h) was associated with a higher risk of prolonged DGF (OR=2.05, $P=0.0049$). Finally, recip-

F1

T3

WOLTERS

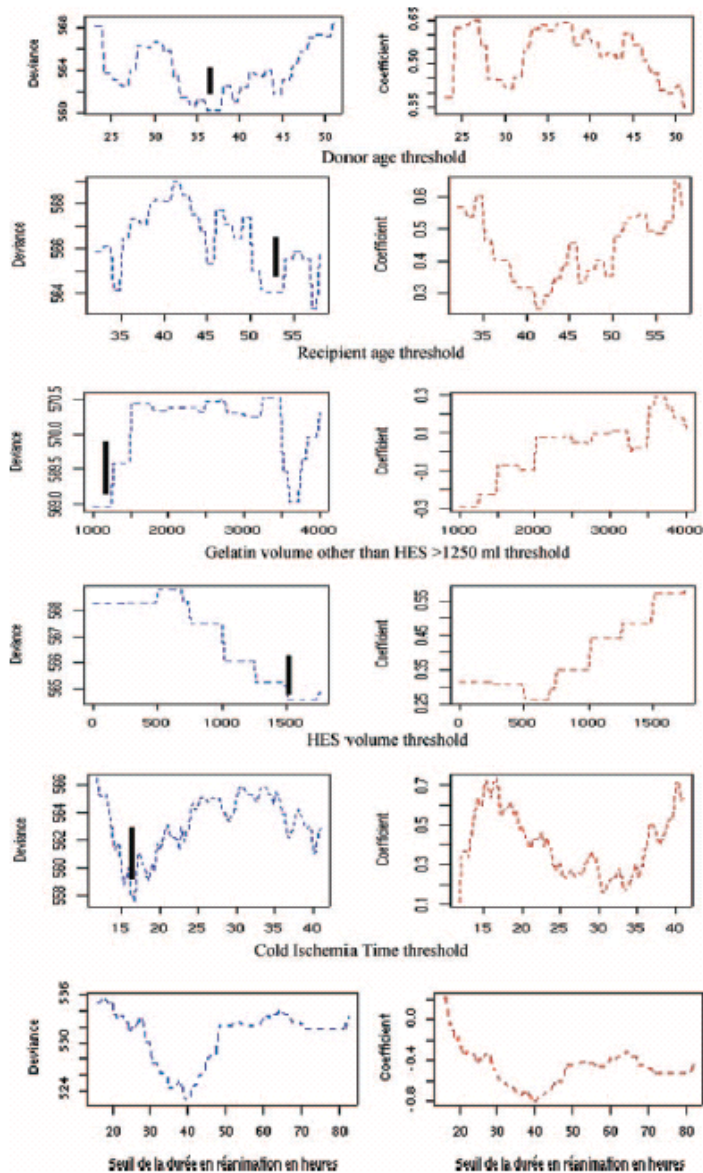


FIGURE 1. No threshold for this type of analysis has been clearly defined in the literature. In our statistical model, the selected thresholds are those that minimize the deviance of the model indicated by a bold line: 35 years of age for the donor, 55 years of age for the recipient, 1250 mL of colloids other than HES, 1500 mL of HES colloids, 16 hr of CIT, and 40 hr in intensive care.

14 patients age was highly associated with a prolonged risk of DGF when above 55 years (OR=1.68, $P=0.019$; Table 4).

Multivariate Analysis: Marginal Logistic Model According to the Definition in Days of the DGF

When applying multivariate logistic regression analysis to DGF, the use of Epinephrine during the donor resuscitation ($P<0.001$, OR=4.35), a CIT above 16 hr ($P=0.01$, OR=2.16), and a recipient age older than 55 years ($P=0.003$,

OR=2.75) were clearly associated with an increased risk of prolonged DGF. On the other hand, the probability of a shorter DGF was highly associated with the administration of a total volume of colloids (other than HES) above 1250 mL ($P<0.0002$, OR=0.40). Finally, a stay in the intensive care unit of more than 40 hr ($P=0.0003$, OR=0.40), a combined kidney and pancreas transplant ($P=0.0004$, OR=0.19), the use of Thymoglobulin for induction ($P=0.0134$, OR=0.55) and a maintenance immunosuppressive therapy with Cell-

TABLE 3. Univariate analysis

	Odds ratio	95% confidence interval	P value
Female donor	1.65	1.05–2.59	0.0306
History of hypertension	2.51	1.34–4.70	0.0037
History of diabetes	2.14	0.51–8.94	0.2947
History of dyslipidemia	0.97	0.31–3.02	0.9530
History of ethylism	1.13	0.65–1.95	0.6548
Iodinated contrast-media	1.02	0.66–1.57	0.9403
Dobutamine	0.90	0.45–1.78	0.7525
Epinephrine	2.83	1.27–6.32	0.0112
Norepinephrine	1.03	0.58–1.82	0.9074
Hydroxyethyl starch >1500 mL	1.82	1.12–2.97	0.0173
Colloids other than HES >1250 mL	0.53	0.34–0.81	0.0037
Blood transfusion	0.69	0.44–1.08	0.1151
Colloids other than HES	1.01	0.66–1.55	0.9782
Cardiac arrest	1.72	0.64–4.57	0.2790
Heart retrieval	0.63	0.41–0.96	0.0371
Lung retrieval	0.84	0.45–1.53	0.5665
Pancreas retrieval	0.80	0.49–1.31	0.3668
Liver retrieval	0.68	0.44–1.07	0.0965
Organ preservation fluid (Celsior or Collins)	0.91	0.42–1.99	0.8157
Organ preservation fluid (others)	0.72	0.44–1.18	0.1975
Donor age >35 years	1.88	1.22–2.89	0.0053
Uremia at retrieval time >5.5 mmol/L	0.78	0.46–1.32	0.3472
Creatinemia at retrieval time >70 μmol/L	1.42	0.79–2.55	0.2450
Urine output >4500 mL	1.22	0.79–1.88	0.3749
Duration in intensive care >40 hr	0.44	0.26–0.73	0.0014

Donor covariates describe the covariates of the donor according to the 6-day threshold of DGF. The cutoff for each variable was assessed by maximizing the likelihood of the corresponding univariate model. Few covariates of the donor resuscitation correlate with an increase risk of prolonged DGF ≥ 6 days except HES colloids and epinephrine infusion after brain death. Donor age ≥ 35 years (much younger than that usually described) is a risk factor for prolonged DGF.

cept ($P=0.0001$, OR=0.41) were significantly associated with a shorter DGF.

Multivariate Analysis: Marginal Logistic Model According to the Dialysis Definition of the DGF

In this model, we found that the risk of DGF according to dialysis requirement during the first week posttransplantation, correlates with the history of donor hypertension ($P<0.0004$, OR 2.97), the use of epinephrine during donor resuscitation ($P=0.0093$, OR=3.13), the infusion of more than 750 mL of HES colloids after brain death ($P=0.018$, OR=1.80) and a cold ischemia time longer than 24 hr. Details of both logistic regression analysis and the mean DGF values according to each definition and covariates are presented in Tables 5 and 6.

TABLE 4. Univariate analysis

	Odds ratio	95% confidence interval	P value
Female recipient	0.66	0.44–1.00	0.0499
Initial disease potentially recurrent ^a	1.20	0.81–1.77	0.3874
Combined kidney/pancreas graft	0.17	0.05–0.56	0.0038
History of hypertension	0.94	0.60–1.48	0.7883
ATG induction therapy	0.68	0.46–1.01	0.0589
Sandimmune maintenance therapy	0.72	0.55–1.32	0.4786
Neoral maintenance therapy	0.82	0.39–1.69	0.5826
Prograf maintenance therapy	0.75	0.34–1.68	0.4900
Cellcept maintenance therapy	0.68	0.44–1.04	0.0833
Percent anti-T PRA >0	1.34	0.90–1.98	0.1625
Recipient age >55 years	1.68	1.09–2.59	0.0194
Incompatibilities HLA-A-B-DR >3	0.74	0.50–1.10	0.1345
Year of graft >1996	0.73	0.47–1.15	0.1740
Cold ischemia time >16 hours	2.05	1.24–3.39	0.0049

Recipients covariates describe the covariates of the recipient according to the 6-day threshold of DGF. Only recipient older than 55 years and CIT longer than 16 hours appear to correlate with a risk of prolonged DGF ≥ 6 days.

The correlation parameters of the autoregressive regression 1 structure equals 0.20. Finally, according to all the covariates, two transplants derived from the same donor can be considered as independent. Finally, our statistical approach (marginal logistic model) enables us to assume that the majority of the donor-related parameters have been taken into account in our study and that there is no hidden donor covariate.

DISCUSSION

Despite a decade of progress in kidney transplantation, non-immune factors remain a major influence on graft outcome, as suggested by a rate of graft loss that has been only poorly influenced by the level of immunosuppressive drug exposure after one year (21–23). In addition, nonimmune parameters, such as donor age (24) or graft ischemia, have been shown to strongly affect the host immune response (25). Because donor parameters represent potentially important risk factors in terms of kidney graft outcome (8, 26–29), some authors have proposed donor scoring system for cadaveric renal transplantation (30). Recent studies have suggested that donor factors may account for 35–45% of the variability in graft function (31, 32). Particularly, brain death itself has a serious impact on organ quality and graft outcome (9, 33). Other authors have pointed out that some risk factors are more specifically related to the resuscitation procedure of the brain dead donor, such as the type of fluid expander (13, 14) or vasopressive drugs (12). The aim of our study was to explore the consequences of a large number of donor-related parameters, particularly after the diagnosis of brain death and the organ retrieval procedure. Compared to previous reports, our study is also based on a larger and monocentric cohort. In addition, because two different recipients receive kidneys from the same donor, and to avoid masking the importance of donor factors using a classical paired statistical analysis, we

TABLE 5. Logistic model of explicative variables of DGF

	Coefficient	SD	Odds ratio	95% confidence interval	P value
Intercept	-0.35	0.51	0.70	0.26-1.91	0.4848
Donor sex	0.46	0.25	1.58	0.97-2.59	0.0636
Epinephrine	1.47	0.45	4.35	1.80-10.5	0.0010
Gelatin other than HES >1250 mL	-0.92	0.24	0.40	0.25-0.64	0.0002
HES >1500 mL	0.49	0.29	1.63	0.92-2.88	0.0900
Duration in intensive care >40 hours	-0.92	0.25	0.40	0.24-0.65	0.0003
Recipient sex	-0.17	0.29	0.84	0.48-1.49	0.5448
Recipient age >55 years	1.01	0.34	2.75	1.41-5.35	0.0033
Combined kidney/pancreas graft	-1.64	0.46	0.19	0.08-0.48	0.0004
ATG induction therapy	-0.60	0.24	0.55	0.34-0.88	0.0134
Cellcept maintenance therapy	-0.90	0.27	0.41	0.24-0.69	0.0001
Cold ischemia time >16 hours	0.77	0.30	2.16	1.20-3.89	0.0102
Sex recipient×age recipient >55	-1.29	0.56	0.28	0.09-0.82	0.0200

The final multivariate model of delayed graft function according to the definition in days describes the covariates of DGF according to a 6-day cutoff (see Materials and Methods). Epinephrine administration, HES infusion, recipient age >55 years, and cold ischemia time duration increase the probability of a prolonged DGF. There is an interaction between recipient age >55 years and sex ($P=0.02$). Also, male recipients older than 55 years are significantly more at risk of prolonged DGF ($P<0.003$) than female recipients within the same age range ($P=0.51$).

TABLE 6. Logistic model of explicative variables of DGF according to the dialysis definition

	Coefficient	SD	Odds ratio	95% confidence interval	P value
Intercept	-1.42	0.25	0.24	0.15-0.39	0.0001
Donor hypertension	1.09	0.31	2.97	1.62-5.46	0.0004
Epinephrine	1.14	0.44	3.13	1.32-7.41	0.0093
HES >750 mL	0.59	0.25	1.80	1.11-2.94	0.0186
Cold ischemia time >24 hr	0.74	0.24	2.10	1.31-3.35	0.0023

The final multivariate model of delayed graft function according to the dialysis definition. Donor hypertension, Epinephrine administration, HES infusion and cold ischemia time duration increase the probability of a prolonged DGF.

took advantage of a statistical method using a marginal model (20). This model can be used to test all the donor covariates and to assess their consequences in the early outcome.

The role of donor covariates on delayed graft function was studied using the cut-off of 6 days of DGF (1), instead of the level of posttransplant urine output (5, 34). This choice was founded on a former study by our group of the role of DGF defined as "the time for the kidney to reach a calculated clearance above 10 mL/min" based on a large cohort of kidney recipients between 1986 and 1995. However, because this definition is not used routinely we conducted a comparison study using a more "classical" definition of DGF according to the need for dialysis during the first week posttransplantation. In the present study (1827 patients between 1990 and 2003), we confirm that prolonged DGF ≥ 6 days does indeed have a major impact on graft loss (10% lower graft survival at 10 years in the group of prolonged DGF ≥ 6 days, $P<0.001$). We observed that 21% of patients with a DGF longer than 6 days did not undergo dialysis as they maintained diuresis, a stable weight and a good tolerance of uremia despite a clearance <10 mL/min. On the other hand, 7.5% of patients with a DGF shorter than 6 days underwent dialysis because of hyperkalemia or because they were overweight suggesting that the requirement of dialyses is not enough accurate to define the DGF. Finally, we show that both definitions give the same

risk factors for DGF (except for the past history of donor hypertension) but with different cutoffs. Nevertheless, the statistical model does not make it possible to determine whether the difference found for the cutoffs are statistically different. However, we show that the model using the definition in days of DGF ($<$ or ≥ 6 days) enhances the number of explanatory variables and thus is probably more interesting for the physician. Moreover, a recent study of Schnuelle showed that dialysis requirement posttransplantation was not a significant explanatory variable in the multivariate analysis of five-year graft survival contrary to the 1-week graft function, confirming our choice of DGF definition with the creatinine clearance (35).

Finally, the aim of the study was to determine which recipient and donor parameters, especially those stemming from the brain death status and the retrieval procedure, are risk factors for prolonged DGF. In order to guarantee homogeneity in terms of the resuscitation and retrieval procedure, only the 449 recipients who received a graft from 262 brain dead donors consecutively harvested in the intensive care unit of our center were retained. Among the large numbers of donor resuscitation parameters studied in the model, few were associated with an increased risk of prolonged DGF, except epinephrine infusion, which increased the risk by 4.3 and possibly reflects the worst effect on serum creatinine in

high-dose catecholamines-treated donors (36) and/or the habits of the intensivist of our center who preferentially use this drug in cases of hemodynamic and cardiogenic instability in the donor expecting a beneficial effect of its more powerful beta-adrenergic effect in comparison to norepinephrine. Therefore, epinephrine was used in patients with more severe hemodynamic alterations justifying higher dosage, so higher vasoconstrictive effect, and more renal impairment for these two reasons. On the contrary, other resuscitation covariates are likely associated with a shorter DGF that could be related to efficient resuscitation, control of the hemodynamics of the donor, and good quality of the organ as suggested by the effect of infusion of large volume expanders (>1250 ml), length of stay in intensive care (≥ 40 hr) and multiple organ donation (heart procurement) or by other possible relevant parameters involved in the good quality of the graft which could explain the shorter DGF, such expensive preservation fluid for instance, in the combined kidney and pancreas transplantation. Nevertheless, a trend for HES infusion (>1500 mL) during resuscitation, which was found to be a risk factor for prolonged DGF possibly because of a direct nephrotoxic effect of some compounds (14), suggest it should be avoided during donor resuscitation (13). One hypothesis is that HES colloid infusion (at or above a critical volume) could generate deleterious histological lesions (osmotic nephrosis-like lesions) (37). These lesions, particularly when generated in impaired kidneys, could increase the risk of early failure (DGF). However, no biopsies were performed on HES-treated donor kidneys before transplantation in our cohort. ATG induction therapy also seems to protect against DGF, acting directly (on graft mononuclear infiltrate) rather than because of a delayed introduction of calcineurin inhibitors (38, 39). Finally, half of the patients received Cellcept for maintenance therapy, which is significantly associated with a lower risk of prolonged DGF, confirming a possible protective effect of this drug against DGF (40, 41).

Importantly, we found recipient and donor age to be risk factors for prolonged DGF ≥ 6 days in the univariate model. However, the marginal model identified recipient but not donor age as the independent risk factor for DGF, contrasting with what has been described elsewhere (34). This difference may be due to the link between the two variables (our current practice is to match donor and recipient age) and the shorter cut off for donor age (35 years) which we have statistically calculated by maximizing the likelihood in the univariate model to fit better with the clinical reality. One explanation could be the advanced vascular disease in older recipients (42), which increases the risk of hypoxia and ischemic damage of the usually aged-matched in suboptimal kidney from old donors who are becoming the average donor in many programs over the world. In our study, 29% of recipients older than 55 years had a past history of vascular disease and 40% presented early vascular events after transplantation (stroke, arteritis, etc.) versus 12% and 20%, respectively, in younger patients ($P < 0.001$).

Taken together, based on a larger number of brain dead donors than in previous studies, we show that several donor parameters have a significant impact on DGF and are dependent on a good management of the donor in the intensive care unit. We also suggest that donor age might not be the leading independent parameter involved in DGF risk. Careful man-

agement of brain dead donor resuscitation, such as correction of plasma expander volume, limitation of HES infusion, combined with additional attempts to decrease CIT above 16 hr (particularly in recipients older than 55 years), should further decrease DGF and increase graft survival.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Roche Laboratory for its support of the DIVAT data bank, Genzyme Laboratory for its statistics financial contribution, and Dr. J. Ashton-Chess for editing the manuscript.

REFERENCES

- Giral-Classe M, Hourmant M, Cantarovich D, et al. Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Int* 1998; 54: 972.
- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, et al. Delayed graft function: Risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 968.
- Feldman HI, Gayner R, Berlin JA, et al. Delayed function reduces renal allograft survival independent of acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1306.
- Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995; 59: 962.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364: 1814.
- Suri D, Meyer TW. Influence of donor factors on early function of graft kidneys. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1317.
- Pessione F, Cohen S, Durand D, et al. Multivariate analysis of donor risk factors for graft survival in kidney transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 361.
- Ojo AO, Leichtman AB, Punch JD, et al. Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 153.
- Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 343.
- van den Eijnden MM, Leuvenink HG, Ottens PJ, et al. Effect of brain death and non-heart-beating kidney donation on renal function and injury: An assessment in the isolated perfused rat kidney. *Exp Clin Transplant* 2003; 1: 85.
- van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int* 2003; 64: 1874.
- Schnuelle P, Berger S, de Boer J, et al. Donor employment of vasopressors and its impact on allograft survival after transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33: 1282.
- Cittanova ML, Leblanc I, Legendre C, et al. Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. *Lancet* 1996; 348: 1620.
- Coronel B, Laurent V, Mercatello A, et al. [Can hydroxyethylamid be used during intensive care of brain-dead organ donors?]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1994; 13: 10.
- Guesde R, Barrou B, Leblanc I, et al. Administration of desmopressin in brain-dead donors and renal function in kidney recipients. *Lancet* 1998; 352: 1178.
- Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ, et al. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2967.
- Quiroga I, McShane P, Koo DD, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 1689.
- Merkus JW, Hoitsma AJ, Koene RA. Detrimental effect of acute renal failure on the survival of renal allografts: influence of total ischaemia time and anastomosis time. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 881.
- Carter JT, Chan S, Roberts JP, Feng S. Expanded criteria donor kidney allocation: Marked decrease in cold ischemia and delayed graft function at a single center. *Am J Transplant* 2005; 5: 2745.
- Pinheiro J, Bates D. Mixed-effects Models in S and S-plus. Springer 2000.

CONCLUSION

CONCLUSION

La dysfonction chronique des greffons est le nouveau challenge de la transplantation. La prévention de la survenue d'une néphropathie chronique du transplant en est l'enjeu majeur. Comme nous l'avons vu au cours de notre exposé, il s'agit d'une pathologie polyfactorielle dont les racines débutent chez le donneur et qui correspondent à la somme de facteurs immunologiques, non immunologiques et de facteurs de progression des lésions du transplant qui conduisent à la dysfonction et à l'échec de la greffe. L'apport de biomarqueurs biologiques comme les DNAsip ou l'analyse de paramètres immunologiques (répertoire, anticorps etc). pourrait permettre d'individualiser très en amont des lésions histologiques, des signatures de « profils de risque » de rejet chronique, de néphropathie chronique ou de toxicité des anticalcineurines en autres. Cette approche non invasive puisque réalisée grâce à l'utilisation de PBMC des patients recueillis sur une simple prise de sang est actuellement à l'étude dans notre équipe à l'ITERT (2 PHRC nationaux en cours : EVAL tol 2003, PI M.Giral, DPCR array 2005, PI Jean Paul Souillou). Ces nouvelles techniques, si elles sont validées pourraient permettre d'intervenir très tôt sur l'évolution d'une greffe et d'anticiper les modifications de stratégie thérapeutique avant que des phénomènes irréversibles ne conduisent à la dysfonction chronique des greffons et à l'échec de greffe.

Une autre approche, serait de revisiter l'abord statistique des études en transplantation. En effet, la plupart des modèles pour prédire un « endpoint » en transplantation, soit utilisent des modèles de régression linéaire multiple pour des variables continues avec une répartition normale sur des observations indépendantes, soit des régressions logistiques pour des variables dichotomiques (absence ou présence de la variable à tester), soit des modèles log-linéaires qui s'appliquent à des variables catégorielles (ex : score de banff), soit enfin des modèles de survie type modèle de Cox pour définir l'apparition d'un événement (décès, rejet, échec). Ces analyses de survie des greffons sont en général basées sur des modèles de régression dont le principe est de censurer toutes les causes de perte de greffon sauf celle que l'on veut étudier et de tester les co-variables sur un seul modèle à la fois.

Cette approche ne tient pas compte cependant du fait que le risque de perdre un greffon fonctionnel dépend de nombreuses causes possibles en même temps ou séquentiellement dans le temps comme nous l'avons exposé dans cette thèse et qu'il peut exister des états de transition d'un stade à un autre. Dans le modèle de Cox classiquement utilisé en

transplantation (vie du greffon ou vie du patient), les variables explicatives sont fixes au cours du temps et sont généralement définies à l'inclusion et il n'existe aucune information sur la fonction du risque de base. Les analyses dites multi-états pourraient enrichir les modèles et permettre une approche plus proche de la réalité clinique en transplantation rénale. En effet dans les modèles statistiques multi-états, plusieurs événements peuvent être étudiés avec des retours possibles sur les états antérieurs, ce qui permet une analyse plus précise de l'évolution de la pathologie du patient. Des mesures spécifiques de l'effet des variables explicatives peuvent être testées sur chaque état et sur les passages d'un états à un autres. Ils permettent ainsi de modéliser « la forme » de la fonction de risque de base, et d'analyser les risques « compétitifs » (plusieurs états absorbants : décès, échec) et d'étudier des phénomènes de dégradation ou de vie accélérée.

Quelques études récentes en transplantation rénale ont abordé la cause de perte des greffons en utilisant ce type d'approche et ont abouti à une meilleure compréhension de la complexité des facteurs affectant la vie des greffons (262) (263) (264). Cet apport sera d'autant plus sensible que les progrès des thérapeutiques ont considérablement réduit les risques les rejets aigus qui étaient jusqu'à présent le principal facteur de jugement d'efficacité des traitements (265). Le déficit de la transplantation repose maintenant sur l'amélioration de la survie à long terme des greffons et donc sur une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans la perte des greffons. Les études antérieures en utilisant les modèles de Cox restent loin de la complexité clinique. L'apport des analyses multi – états pourrait permettre de définir avec plus de précision quels sont les patients à risques de perdre leur greffon et bien sûr de développer des stratégies cliniques ou thérapeutiques en amont de ce risque. Cette approche pourrait aussi permettre de tester sur des populations ciblées des nouvelles stratégies thérapeutiques inaccessibles par un abord mono-paramétrique des analyses de survie. Enfin, définir des états et des transitions d'états et les corrélés à des variables explicatives pourraient introduire précisément les paramètres cliniques des patients comme marqueurs de passage d'états des greffons (NCT ou au décès).

Nous conduisons actuellement une recherche sur l'étude d'un modèle semi-markovien en transplantation rénale. Cette étude est menée en collaboration avec l'équipe du professeur Daurès de l'institut de biostatistique de Montpellier sous la responsabilité de Yohann Foucher (3ème année de thèse de biostatistique) et de moi même. Ce travail a fait l'objet de 2 présentations orales dans des congrès internationaux de biostatistique (Montréal 2006, Genève 2006) et d'une première publication en revision dans la revue *biostatistics in medicine* (voire annexe jointe).

Nos perspectives sont donc de continuer de valider une signature biologique précoce du rejet chronique dans le sang des patients. Mais aussi de finaliser notre modélisation par l'approche statistique multi-états, les patients à risque de perte leur greffon en utilisant simultanément toutes les covariables pertinentes impliqués dans la dysfonction des greffons. Ce nouvel abord épidémiologique qui nécessite un très grand nombre de patients, ce qu'autorise la base DIVAT, devrait nous permettre de définir beaucoup plus précisément les populations à risques dans le temps.

Nous souhaitons continuer à développer la base DIVAT pour en faire le premier outil d'analyse épidémiologique valide en greffe de rein en Europe (Euro DIVAT), mais aussi en greffe de pancréas.

A terme, le but de ces travaux est d'améliorer la connaissance et la prise en charge précoce des facteurs de risque des transplantés. Dans la même optique, nous souhaitons utiliser la base DIVAT comme outil de suivi partagé des patients avec les néphrologues et les généralistes pour optimiser la prise en charge des facteurs de progression de la NCT. De plus il nous est apparu important de prendre en compte aussi l'éducation du patient en projetant de mettre à sa disposition un accès à son dossier informatique et des conseils hygiéno-diététiques personnalisés (DIVAT-ville).

Enfin, DIVAT devient un standard international comme en témoigne la création d'un réseau épidémiologique de suivi des transplantés sur le même outil : le réseau LATINA.

BIBLIOGRAPHIE

1. Harrison JH, Merrill JP, Murray JE. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum* 1956; 6: 432.
2. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 1956; 160 (4): 277.
3. Morris PJ. Transplantation--a medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med* 2004; 351 (26): 2678.
4. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004; 351 (26): 2761.
5. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 321 (25): 1725.
6. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342 (9): 605.
7. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341 (23): 1725.
8. Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol* 2004; 13 (2): 117.
9. Kahan BD, Rajagopalan PR, Hall M. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation* 1999; 67 (2): 276.
10. Kahan BD. Cyclosporine: a revolution in transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31 (1-2A): 14S.
11. Paul LC. Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 1995; 47 (6): 1491.
12. Briganti EM, Russ GR, McNeil JJ, Atkins RC, Chadban SJ. Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *N Engl J Med* 2002; 347 (2): 103.
13. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346 (8): 580.
14. Colvin RB. Chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349 (24): 2288.
15. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int* 1996; 49 (2): 518.
16. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (1): 167.
17. Monaco AP, Burke JF, Jr., Ferguson RM, et al. Current thinking on chronic renal allograft rejection: issues, concerns, and recommendations from a 1997 roundtable discussion. *Am J Kidney Dis* 1999; 33 (1): 150.
18. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55 (2): 713.
19. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3 (6): 708.
20. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7 (3): 518.

21. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349 (24): 2326.
22. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Evolution and pathophysiology of renal-transplant glomerulosclerosis. *Transplantation* 2004; 78 (3): 461.
23. Bonsib SM, Abul-Ezz SR, Ahmad I, et al. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2000; 58 (5): 2206.
24. Kriz W, Hartmann I, Hosser H, et al. Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (3): 496.
25. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004; 78 (4): 557.
26. Ishii Y, Sawada T, Kubota K, Fuchinoue S, Teraoka S, Shimizu A. Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67 (1): 321.
27. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Delta analysis of posttransplantation tubulointerstitial damage. *Transplantation* 2004; 78 (3): 434.
28. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585.
29. Joosten SA, van Ham V, Nolan CE, et al. Telomere shortening and cellular senescence in a model of chronic renal allograft rejection. *Am J Pathol* 2003; 162 (4): 1305.
30. Chkhotua A, Shohat M, Tobar A, et al. Replicative senescence in organ transplantation-mechanisms and significance. *Transpl Immunol* 2002; 9 (2-4): 165.
31. Ferlicot S, Durrbach A, Ba N, Desvaux D, Bedossa P, Paradis V. The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol* 2003; 34 (9): 924.
32. Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* 2004; 65 (2): 510.
33. Badid C, Desmouliere A, Babici D, et al. Interstitial expression of alpha-SMA: an early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (11): 1993.
34. Strutz F, Okada H, Lo CW, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; 130 (2): 393.
35. Ng YY, Huang TP, Yang WC, et al. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 1998; 54 (3): 864.
36. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110 (3): 341.
37. Fan JM, Ng YY, Hill PA, et al. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; 56 (4): 1455.
38. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (1): 96.
39. Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, et al. Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am J Pathol* 2001; 159 (4): 1313.

40. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2001; 345 (2): 93.
41. Ivanyi B. Transplant capillaropathy and transplant glomerulopathy: ultrastructural markers of chronic renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (4): 655.
42. Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V, et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2005; 5 (2): 383.
43. Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D, Tufveson G, Persson H, Persson NH. The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation* 1993; 56 (2): 307.
44. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004; 4 (8): 1289.
45. Humar A, Payne WD, Sutherland DE, Matas AJ. Clinical determinants of multiple acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2000; 69 (11): 2357.
46. Sijpkens YW, Doxiadis, II, Mallat MJ, et al. Early versus late acute rejection episodes in renal transplantation. *Transplantation* 2003; 75 (2): 204.
47. Shishido S, Asanuma H, Nakai H, et al. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (4): 1046.
48. Moreso F, Ibernón M, Goma M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* 2006; 6 (4): 747.
49. Ibernón M, Goma M, Moreso F, et al. Subclinical rejection impairs glomerular adaptation after renal transplantation. *Kidney Int* 2006; 70 (3): 557.
50. Kee TY, Chapman JR, O'Connell PJ, et al. Treatment of subclinical rejection diagnosed by protocol biopsy of kidney transplants. *Transplantation* 2006; 82 (1): 36.
51. Cecka JM, Terasaki PI. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry--1991. *Clin Transpl* 1991: 1.
52. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331 (6): 365.
53. Cicciarelli J, Cho Y. HLA matching: univariate and multivariate analyses of UNOS Registry data. *Clin Transpl* 1991: 325.
54. Susal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 2002; 73 (8): 1269.
55. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3 (6): 665.
56. Cecka JM, Zhang Q, Reed EF. Preformed cytotoxic antibodies in potential allograft recipients: recent data. *Hum Immunol* 2005; 66 (4): 343.
57. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998.
58. Wahrmann M, Exner M, Schillinger M, et al. Pivotal role of complement-fixing HLA alloantibodies in presensitized kidney allograft recipients. *Am J Transplant* 2006; 6 (5 Pt 1): 1033.
59. Opelz G. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 2005; 365 (9470): 1570.

60. Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Valentin N, et al. Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation. *Transplantation* 2003; 75 (4): 477.
61. Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol* 2006; 67 (3): 230.
62. Souillou JP, Peyrat MA, Guenel J. Association between treatment-resistant kidney-allograft rejection and post-transplant appearance of antibodies to donor B-lymphocyte alloantigens. *Lancet* 1978; 1 (8060): 354.
63. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004; 4 (3): 438.
64. Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO, Gerbase-DeLima M. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant* 2006; 6 (10): 2316.
65. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 (9): 2804.
66. Regele H, Bohmig GA, Habicht A, et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (9): 2371.
67. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (3): 574.
68. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5 (10): 807.
69. Rolls HK, Kishimoto K, Dong VM, et al. T-cell response to cardiac myosin persists in the absence of an alloimmune response in recipients with chronic cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2002; 74 (7): 1053.
70. Joosten SA, van Ham V, Borrias MC, van Kooten C, Paul LC. Antibodies against mesangial cells in a rat model of chronic renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (4): 692.
71. Carter V, Shenton BK, Jaques B, et al. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37 (2): 654.
72. Almond PS, Matas AJ, Gillingham K, et al. Risk factors for second renal allografts immunosuppressed with cyclosporine. *Transplantation* 1991; 52 (2): 253.
73. Mahoney RJ, Norman DJ, Colombe BW, Garovoy MR, Leeber DA. Identification of high- and low-risk second kidney grafts. *Transplantation* 1996; 61 (9): 1349.
74. Bryan CF, Baier KA, Nelson PW, et al. Long-term graft survival is improved in cadaveric renal retransplantation by flow cytometric crossmatching. *Transplantation* 1998; 66 (12): 1827.
75. Lair D, Coupel S, Giral M, et al. The effect of a first kidney transplant on a subsequent transplant outcome: an experimental and clinical study. *Kidney Int* 2005; 67 (6): 2368.
76. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Lechler R. Comparison of the direct and indirect pathways of allorecognition in chronic allograft failure. *Transplant Proc* 2001; 33 (1-2): 449.
77. Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor

- HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (1): 252.
78. Bendjelloul F, Desin TS, Shoker AS. Donor non-specific IFN-gamma production by primed alloreactive cells as a potential screening test to predict the alloimmune response. *Transpl Immunol* 2004; 12 (2): 167.
 79. 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 (1): 294.
 80. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, et al. The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl Immunol* 2005; 14 (1): 49.
 81. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6 (4): 345.
 82. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6 (4): 338.
 83. Taams L, Vukmanovic-Stejic M, Salmon M, Akbar A. Immune regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2003; 11 (3-4): 277.
 84. 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 (3): 398.
 85. Greenstein S, Siegal B. Compliance and noncompliance in patients with a functioning renal transplant: a multicenter study. *Transplantation* 1998; 66 (12): 1718.
 86. Ghods AJ, Nasrollahzadeh D. Noncompliance with immunosuppressive medications after renal transplantation. *Exp Clin Transplant* 2003; 1 (1): 39.
 87. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6 (4): 736.
 88. Brouard S, Dupont A, Giral M, et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2005; 5 (2): 330.
 89. de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis, II, et al. Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (7): 1538.
 90. de Fijter JW. The impact of age on rejection in kidney transplantation. *Drugs Aging* 2005; 22 (5): 433.
 91. Reutzler-Selke A, Filatenkov A, Jurisch A, et al. Grafts from elderly donors elicit a stronger immune response in the early period posttransplantation: a study in a rat model. *Transplant Proc* 2005; 37 (1): 382.
 92. de Fijter JW, Persijn GG. Age, the riddle of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (11): 2307.
 93. Ojo AO, Hanson JA, Meier-Kriesche H, et al. Survival in recipients of marginal cadaveric donor kidneys compared with other recipients and wait-listed transplant candidates. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (3): 589.
 94. Takemoto S, Terasaki PI. Donor age and recipient age. *Clin Transpl* 1988: 345.
 95. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Cibrik DM, et al. Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure. *Transplantation* 2000; 70 (2): 306.
 96. Meier-Kriesche HU, Cibrik DM, Ojo AO, et al. Interaction between donor and recipient age in determining the risk of chronic renal allograft failure. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50 (1): 14.
 97. Bradley BA. Rejection and recipient age. *Transpl Immunol* 2002; 10 (2-3): 125.
 98. Meier-Kriesche HU, Ojo A, Hanson J, et al. Increased immunosuppressive vulnerability in elderly renal transplant recipients. *Transplantation* 2000; 69 (5): 885.

99. Moreso F, Ortega F, Mendiluce A. Recipient age as a determinant factor of patient and graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 Suppl 3: iii16.
100. Keith DS, Cantarovich M, Paraskevas S, Tchervenkov J. Recipient age and risk of chronic allograft nephropathy in primary deceased donor kidney transplant. *Transpl Int* 2006; 19 (8): 649.
101. Palomar R, Ruiz JC, Cotorruelo JG, et al. [Effect of recipient age on the clinical course of renal transplantation]. *Nefrologia* 2001; 21 (4): 386.
102. Lufft V, Kliem V, Tusch G, Dannenberg B, Brunkhorst R. Renal transplantation in older adults: is graft survival affected by age? A case control study. *Transplantation* 2000; 69 (5): 790.
103. Pieringer H, Biesenbach G. Risk factors for delayed kidney function and impact of delayed function on patient and graft survival in adult graft recipients. *Clin Transplant* 2005; 19 (3): 391.
104. Pascher A, Reutzel-Selke A, Jurisch A, et al. Alterations of the immune response with increasing recipient age are associated with reduced long-term organ graft function of rat kidney allografts. *Transplantation* 2003; 76 (11): 1560.
105. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med* 1995; 333 (6): 333.
106. Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, et al. Long-term outcome of renal transplantation from older donors. *N Engl J Med* 2006; 354 (4): 343.
107. Nagareda T, Kinoshita Y, Tanaka A, et al. Clinicopathology of kidneys from brain-dead patients treated with vasopressin and epinephrine. *Kidney Int* 1993; 43 (6): 1363.
108. Amado JA, Lopez-Espadas F, Vazquez-Barquero A, et al. Blood levels of cytokines in brain-dead patients: relationship with circulating hormones and acute-phase reactants. *Metabolism* 1995; 44 (6): 812.
109. Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int* 1999; 56 (4): 1551.
110. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation* 1999; 67 (3): 343.
111. Cittanova ML, Leblanc I, Legendre C, Mouquet C, Riou B, Coriat P. Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. *Lancet* 1996; 348 (9042): 1620.
112. Guesde R, Barrou B, Leblanc I, et al. Administration of desmopressin in brain-dead donors and renal function in kidney recipients. *Lancet* 1998; 352 (9135): 1178.
113. Schnuelle P, Berger S, de Boer J, Persijn G, van der Woude FJ. Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation. *Transplantation* 2001; 72 (3): 455.
114. Schnuelle P, Yard BA, Braun C, et al. Impact of donor dopamine on immediate graft function after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4 (3): 419.
115. Kapper S, Beck G, Riedel S, et al. Modulation of chemokine production and expression of adhesion molecules in renal tubular epithelial and endothelial cells by catecholamines. *Transplantation* 2002; 74 (2): 253.
116. Berger SP, Hunger M, Yard BA, Schnuelle P, Van Der Woude FJ. Dopamine induces the expression of heme oxygenase-1 by human endothelial cells in vitro. *Kidney Int* 2000; 58 (6): 2314.
117. Schnuelle P, Lorenz D, Mueller A, Trede M, Van Der Woude FJ. Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation. *Kidney Int* 1999; 56 (2): 738.

118. Salahudeen AA, Jenkins JK, Huang H, Ndebele K, Salahudeen AK. Overexpression of heme oxygenase protects renal tubular cells against cold storage injury: studies using hemin induction and HO-1 gene transfer. *Transplantation* 2001; 72 (9): 1498.
119. Koning OH, Ploeg RJ, van Bockel JH, et al. Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: a prospective study of renal function and graft survival after preservation with University of Wisconsin solution in multi-organ donors. European Multicenter Study Group. *Transplantation* 1997; 63 (11): 1620.
120. Giral-Classe M, Hourmant M, Cantarovich D, et al. Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Int* 1998; 54 (3): 972.
121. Woodcock SA, Kyriakides C, Wang Y, et al. Soluble P-selectin moderates complement dependent injury. *Shock* 2000; 14 (6): 610.
122. Pemberton M, Anderson G, Vetvicka V, Justus DE, Ross GD. Microvascular effects of complement blockade with soluble recombinant CR1 on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. *J Immunol* 1993; 150 (11): 5104.
123. Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* 2001; 104 (12): 1413.
124. Bergamaschini L, Gobbo G, Gatti S, et al. Endothelial targeting with C1-inhibitor reduces complement activation in vitro and during ex vivo reperfusion of pig liver. *Clin Exp Immunol* 2001; 126 (3): 412.
125. de Zwaan C, Kleine AH, Diris JH, et al. Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2002; 23 (21): 1670.
126. Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 91 (2): 393.
127. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364 (9447): 1814.
128. Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, et al. Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 2003; 162 (1): 127.
129. Neugarten J, Srinivas T, Tellis V, Silbiger S, Greenstein S. The effect of donor gender on renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7 (2): 318.
130. Zeier M, Dohler B, Opelz G, Ritz E. The effect of donor gender on graft survival. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 (10): 2570.
131. Mackenzie HS, Azuma H, Rennke HG, Tilney NL, Brenner BM. Renal mass as a determinant of late allograft outcome: insights from experimental studies in rats. *Kidney Int Suppl* 1995; 52: S38.
132. Remuzzi G. Double transplant of marginal kidneys. *Transplant Proc* 1999; 31 (7): 2962.
133. Brenner BM, Milford EL. Nephron underdosing: a programmed cause of chronic renal allograft failure. *Am J Kidney Dis* 1993; 21 (5 Suppl 2): 66.
134. Oudar O, Elger M, Bankir L, Ganten D, Ganten U, Kriz W. Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. *Ren Physiol Biochem* 1991; 14 (3): 92.
135. Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 1992; 232 (2): 194.
136. Vereerstraeten P, Wissing M, De Pauw L, Abramowicz D, Kinnaert P. Male recipients of kidneys from female donors are at increased risk of graft loss from both rejection and technical failure. *Clin Transplant* 1999; 13 (2): 181.

137. Shibue T, Kondo K, Iwaki Y, Terasaki PI. Effect of sex on kidney transplants. *Clin Transpl* 1987; 351.
138. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Leavey SF, et al. Gender differences in the risk for chronic renal allograft failure. *Transplantation* 2001; 71 (3): 429.
139. Antus B, Yao Y, Liu S, Song E, Lutz J, Heemann U. Contribution of androgens to chronic allograft nephropathy is mediated by dihydrotestosterone. *Kidney Int* 2001; 60 (5): 1955.
140. Antus B, Yao Y, Song E, Liu S, Lutz J, Heemann U. Opposite effects of testosterone and estrogens on chronic allograft nephropathy. *Transpl Int* 2002; 15 (9-10): 494.
141. Barnas U, Mayer G. Glomerular proteinuria in renal transplant patients: mechanisms and treatment. *Kidney Int Suppl* 1997; 63: S78.
142. Roodnat JJ, Mulder PG, Rischen-Vos J, et al. Proteinuria after renal transplantation affects not only graft survival but also patient survival. *Transplantation* 2001; 72 (3): 438.
143. Fernandez-Fresnedo G, Plaza JJ, Sanchez-Plumed J, Sanz-Guajardo A, Palomar-Fontanet R, Arias M. Proteinuria: a new marker of long-term graft and patient survival in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 Suppl 3: iii47.
144. Halimi JM, Laouad I, Buchler M, et al. Early low-grade proteinuria: causes, short-term evolution and long-term consequences in renal transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5 (9): 2281.
145. Ruggenti P, Perna A, Remuzzi G. Retarding progression of chronic renal disease: the neglected issue of residual proteinuria. *Kidney Int* 2003; 63 (6): 2254.
146. Jafar TH, Stark PC, Schmid CH, et al. Proteinuria as a modifiable risk factor for the progression of non-diabetic renal disease. *Kidney Int* 2001; 60 (3): 1131.
147. Jafar TH, Schmid CH, Landa M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of nondiabetic renal disease. A meta-analysis of patient-level data. *Ann Intern Med* 2001; 135 (2): 73.
148. Wang Y, Chen J, Chen L, Tay YC, Rangan GK, Harris DC. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8 (10): 1537.
149. Tang S, Leung JC, Abe K, et al. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2003; 111 (4): 515.
150. Brown KM, Kondeatis E, Vaughan RW, et al. Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *N Engl J Med* 2006; 354 (19): 2014.
151. Souillou JP, Giral M. Influence of graft characteristics on the outcome of kidney transplantation. *N Engl J Med* 2006; 354 (19): 2060.
152. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (11): 2974.
153. Arias M, Fernandez-Fresnedo G, Rodrigo E, Ruiz JC, Gonzalez-Cotorruelo J, Gomez-Alamillo C. Non-immunologic intervention in chronic allograft nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2005 (99): S118.
154. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int* 1998; 53 (1): 217.
155. Opelz G, Dohler B. Improved long-term outcomes after renal transplantation associated with blood pressure control. *Am J Transplant* 2005; 5 (11): 2725.
156. Boddi M, Sacchi S, Lammel RM, Mohseni R, Serner GG. Age-related and vasomotor stimuli-induced changes in renal vascular resistance detected by Doppler ultrasound. *Am J Hypertens* 1996; 9 (5): 461.
157. Don S, Kopecky KK, Filo RS, et al. Duplex Doppler US of renal allografts: causes of elevated resistive index. *Radiology* 1989; 171 (3): 709.

158. Radermacher J, Mengel M, Ellis S, et al. The renal arterial resistance index and renal allograft survival. *N Engl J Med* 2003; 349 (2): 115.
159. Cosio FG, Pelletier RP, Pesavento TE, et al. Elevated blood pressure predicts the risk of acute rejection in renal allograft recipients. *Kidney Int* 2001; 59 (3): 1158.
160. Akcay A, Sezer S, Ozdemir FN, et al. Association of the genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and endothelial nitric oxide synthase with chronic renal transplant dysfunction. *Transplantation* 2004; 78 (6): 892.
161. Lutz J, Risch K, Liu S, et al. Angiotensin type 1 and type 2 receptor blockade in chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2006; 70 (6): 1080.
162. Sanders PW, Gibbs CL, Akhi KM, et al. Increased dietary salt accelerates chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int* 2001; 59 (3): 1149.
163. Pirsch JD, D'Alessandro AM, Sollinger HW, et al. Hyperlipidemia and transplantation: etiologic factors and therapy. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2 (12 Suppl): S238.
164. Tse KC, Lam MF, Yip PS, Li FK, Lai KN, Chan TM. A long-term study on hyperlipidemia in stable renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2004; 18 (3): 274.
165. Roodnat JJ, Mulder PG, Zietse R, et al. Cholesterol as an independent predictor of outcome after renal transplantation. *Transplantation* 2000; 69 (8): 1704.
166. Wissing KM, Abramowicz D, Broeders N, Vereerstraeten P. Hypercholesterolemia is associated with increased kidney graft loss caused by chronic rejection in male patients with previous acute rejection. *Transplantation* 2000; 70 (3): 464.
167. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000; 6 (12): 1399.
168. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001; 7 (6): 687.
169. Kobashigawa JA. Statins in solid organ transplantation: is there an immunosuppressive effect? *Am J Transplant* 2004; 4 (7): 1013.
170. Gore JL, Pham PT, Danovitch GM, et al. Obesity and outcome following renal transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6 (2): 357.
171. Wolf G, Hamann A, Han DC, et al. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis [see comments]. *Kidney Int* 1999; 56 (3): 860.
172. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19 (4): 972.
173. Segarra A, Chacon P, Martinez-Eyarre C, et al. Circulating levels of plasminogen activator inhibitor type-1, tissue plasminogen activator, and thrombomodulin in hemodialysis patients: biochemical correlations and role as independent predictors of coronary artery stenosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (6): 1255.
174. Cedié E, Vazquez-Cruz B, Navarro-Cid J, et al. Role of endothelin-1 and thromboxane A2 in renal vasoconstriction induced by angiotensin II in diabetes and hypertension. *Kidney Int Suppl* 2002 (82): 2.
175. Terasaki PI, Koyama H, Cecka JM, Gjertson DW. The hyperfiltration hypothesis in human renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57 (10): 1450.
176. Orth SR, Viedt C, Ritz E. Adverse effects of smoking in the renal patient. *Tohoku J Exp Med* 2001; 194 (1): 1.
177. Sung RS, Althoen M, Howell TA, Ojo AO, Merion RM. Excess risk of renal allograft loss associated with cigarette smoking. *Transplantation* 2001; 71 (12): 1752.

178. Kamar N, Mariat C, Delahousse M, Lefrancois N, Dantal J, Benhamou P. New onset diabetes mellitus incidence and risk factors in kidney transplantation: results of the observational cross-sectional study diapason. *Transplant Proc* 2006; 38 (7): 2295.
179. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2003; 3 (2): 178.
180. Ducloux D, Kazory A, Chalopin JM. Posttransplant diabetes mellitus and atherosclerotic events in renal transplant recipients: a prospective study. *Transplantation* 2005; 79 (4): 438.
181. Testa R, Olivieri F, Bonfigli AR, et al. Interleukin-6-174 G > C polymorphism affects the association between IL-6 plasma levels and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 71 (3): 299.
182. Bamoulid J, Courivaud C, Deschamps M, et al. IL-6 promoter polymorphism -174 is associated with new-onset diabetes after transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 (8): 2333.
183. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328 (23): 1676.
184. Roodnat JJ, van Gurp EA, Mulder PG, et al. High pretransplant parathyroid hormone levels increase the risk for graft failure after renal transplantation. *Transplantation* 2006; 82 (3): 362.
185. Fink JC, Onuigbo MA, Blahut SA, et al. Pretransplant serum C-reactive protein and the risk of chronic allograft nephropathy in renal transplant recipients: a pilot case-control study. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (5): 1096.
186. Sezer S, Akcay A, Ozdemir FN, Kulah E, Arat Z, Haberal M. Post-transplant C-reactive protein monitoring can predict chronic allograft nephropathy. *Clin Transplant* 2004; 18 (6): 722.
187. Winkelmayr WC, Lorenz M, Kramar R, Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. C-reactive protein and body mass index independently predict mortality in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4 (7): 1148.
188. Albrecht EW, Stegeman CA, Tiebosch AT, Tegzess AM, van Goor H. Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *Am J Transplant* 2002; 2 (5): 448.
189. Djamali A, Reese S, Oberley T, Hullett D, Becker B. Heat shock protein 27 in chronic allograft nephropathy: a local stress response. *Transplantation* 2005; 79 (12): 1645.
190. Hayslett JP. Functional adaptation to reduction in renal mass. *Physiol Rev* 1979; 59 (1): 137.
191. Potter DE, Leumann EP, Sakai T, Holliday MA. Early responses of glomerular filtration rate to unilateral nephrectomy. *Kidney Int* 1974; 5 (2): 131.
192. Rennke HG, Klein PS. Pathogenesis and significance of nonprimary focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1989; 13 (6): 443.
193. Malt RA. Humoral factors in regulation of compensatory renal hypertrophy. *Kidney Int* 1983; 23 (4): 611.
194. Logan JL, Lee SM, Benson B, Michael UF. Inhibition of compensatory renal growth by indomethacin. *Prostaglandins* 1986; 31 (2): 253.
195. Conti FG, Striker LJ, Lesniak MA, MacKay K, Roth J, Striker GE. Studies on binding and mitogenic effect of insulin and insulin-like growth factor I in glomerular mesangial cells. *Endocrinology* 1988; 122 (6): 2788.
196. Abrass CK, Raugi GJ, Gabourel LS, Lovett DH. Insulin and insulin-like growth factor I binding to cultured rat glomerular mesangial cells. *Endocrinology* 1988; 123 (5): 2432.

197. Abboud HE, Poptic E, DiCorleto P. Production of platelet-derived growth factorlike protein by rat mesangial cells in culture. *J Clin Invest* 1987; 80 (3): 675.
198. Fotino S. The solitary kidney: a model of chronic hyperfiltration in humans. *Am J Kidney Dis* 1989; 13 (2): 88.
199. Zucchelli P, Cagnoli L, Casanova S, Donini U, Pasquali S. Focal glomerulosclerosis in patients with unilateral nephrectomy. *Kidney Int* 1983; 24 (5): 649.
200. Novick AC, Gephardt G, Guz B, Steinmuller D, Tubbs RR. Long-term follow-up after partial removal of a solitary kidney. *N Engl J Med* 1991; 325 (15): 1058.
201. Velosa JA, Offord KP, Schroeder DR. Effect of age, sex, and glomerular filtration rate on renal function outcome of living kidney donors. *Transplantation* 1995; 60 (12): 1618.
202. Azuma H, Nadeau K, Mackenzie HS, Brenner BM, Tilney NL. Nephron mass modulates the hemodynamic, cellular, and molecular response of the rat renal allograft. *Transplantation* 1997; 63 (4): 519.
203. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; 347 (7): 488.
204. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67 (1): 103.
205. Celik B, Randhawa PS. Glomerular changes in BK virus nephropathy. *Hum Pathol* 2004; 35 (3): 367.
206. Dantal J, Giral M, Hoormant M, Souillou JP. Glomerulonephritis recurrences after kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995; 4 (2): 146.
207. Ranchin B, Chapuis F, Dawhara M, et al. Vesicoureteral reflux after kidney transplantation in children. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (11): 1852.
208. Giral M, Pascuariello G, Karam G, et al. Acute graft pyelonephritis and long-term kidney allograft outcome. *Kidney Int* 2002; 61 (5): 1880.
209. Kamath NS, John GT, Neelakantan N, Kirubakaran MG, Jacob CK. Acute graft pyelonephritis following renal transplantation. *Transpl Infect Dis* 2006; 8 (3): 140.
210. Reinke P, Prosch S, Kern F, Volk HD. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis* 1999; 1 (3): 157.
211. Audard V, Amor M, Desvaux D, et al. Acute graft pyelonephritis: a potential cause of acute rejection in renal transplant. *Transplantation* 2005; 80 (8): 1128.
212. Dickenmann MJ, Cathomas G, Steiger J, Mihatsch MJ, Thiel G, Tamm M. Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71 (6): 764.
213. Toupance O, Bouedjoro-Camus MC, Carquin J, et al. Cytomegalovirus-related disease and risk of acute rejection in renal transplant recipients: a cohort study with case-control analyses. *Transpl Int* 2000; 13 (6): 413.
214. Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (4): 854.
215. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197.
216. Donnelly P, Henderson R, Fletcher K, et al. Specific and nonspecific immunoregulatory factors and renal transplantation. *Transplantation* 1987; 44 (4): 523.
217. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med* 2002; 8 (6): 582.

218. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* 2003; 111 (10): 1571.
219. Nitschke M, Wiehl S, Baer PC, Kreft B. Bactericidal activity of renal tubular cells: the putative role of human beta-defensins. *Exp Nephrol* 2002; 10 (5-6): 332.
220. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002; 298 (5595): 1025.
221. Olszyna DP, Opal SM, Prins JM, et al. Chemotactic activity of CXC chemokines interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78 in urine of patients with urosepsis. *J Infect Dis* 2000; 182 (6): 1731.
222. Ko YC, Mukaida N, Ishiyama S, et al. Elevated interleukin-8 levels in the urine of patients with urinary tract infections. *Infect Immun* 1993; 61 (4): 1307.
223. VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000; 106 (1): 145.
224. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (6): 1315.
225. Hakim RM, Goldszer RC, Brenner BM. Hypertension and proteinuria: long-term sequelae of uninephrectomy in humans. *Kidney Int* 1984; 25 (6): 930.
226. Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997; 64 (2): 190.
227. Seun Kim Y, Soo Kim M, Suk Han D, et al. Evidence that the ratio of donor kidney weight to recipient body weight, donor age, and episodes of acute rejection correlate independently with live-donor graft function. *Transplantation* 2002; 74 (2): 280.
228. Poggio ED, Hila S, Stephany B, et al. Donor kidney volume and outcomes following live donor kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6 (3): 616.
229. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63 (7): 968.
230. Feldman HI, Gayner R, Berlin JA, et al. Delayed function reduces renal allograft survival independent of acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11 (7): 1306.
231. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995; 59 (7): 962.
232. Suri D, Meyer TW. Influence of donor factors on early function of graft kidneys. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (6): 1317.
233. Pessione F, Cohen S, Durand D, et al. Multivariate analysis of donor risk factors for graft survival in kidney transplantation. *Transplantation* 2003; 75 (3): 361.
234. Ojo AO, Leichtman AB, Punch JD, et al. Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes. *Am J Kidney Dis* 2000; 36 (1): 153.
235. van den Eijnden MM, Leuvenink HG, Ottens PJ, et al. Effect of brain death and non-heart-beating kidney donation on renal function and injury: an assessment in the isolated perfused rat kidney. *Exp Clin Transplant* 2003; 1 (2): 85.
236. van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int* 2003; 64 (5): 1874.

237. Schnuelle P, Berger S, de Boer J, Persijn G, van der Woude FJ. Donor employment of vasopressors and its impact on allograft survival after transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33 (1-2): 1282.
238. Coronel B, Laurent V, Mercatello A, et al. [Can hydroxyethylamidon be used during intensive care of brain-dead organ donors?]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1994; 13 (1): 10.
239. Irish WD, McCollum DA, Tesi RJ, et al. Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (11): 2967.
240. Quiroga I, McShane P, Koo DD, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21 (6): 1689.
241. Merkus JW, Hoitsma AJ, Koene RA. Detrimental effect of acute renal failure on the survival of renal allografts: influence of total ischaemia time and anastomosis time. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6 (11): 881.
242. Carter JT, Chan S, Roberts JP, Feng S. Expanded criteria donor kidney allocation: marked decrease in cold ischemia and delayed graft function at a single center. *Am J Transplant* 2005; 5 (11): 2745.
243. Pinhero J, Bates D. *Mixed-effects Models in S and S-plus*. Springer 2000.
244. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351 (26): 2715.
245. Opelz G, Dohler B. Cyclosporine and long-term kidney graft survival. *Transplantation* 2001; 72 (7): 1267.
246. Vincenti F. A decade of progress in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 77 (9 Suppl): S52.
247. Avihingsanon Y, Ma N, Pavlakis M, et al. On the intraoperative molecular status of renal allografts after vascular reperfusion and clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 (6): 1542.
248. Keith DS, Demattos A, Golconda M, Prather J, Norman D. Effect of donor recipient age match on survival after first deceased donor renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (4): 1086.
249. Feduska NJ, Jr., Cecka JM. Donor factors. *Clin Transpl* 1994: 381.
250. Gourishankar S, Jhangri GS, Cockfield SM, Halloran PF. Donor tissue characteristics influence cadaver kidney transplant function and graft survival but not rejection. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (2): 493.
251. Nyberg SL, Matas AJ, Rogers M, et al. Donor scoring system for cadaveric renal transplantation. *Am J Transplant* 2001; 1 (2): 162.
252. Cosio FG, Qiu W, Henry ML, et al. Factors related to the donor organ are major determinants of renal allograft function and survival. *Transplantation* 1996; 62 (11): 1571.
253. Cosio FG, Elkhammas EA, Henry ML, et al. Function and survival of renal allografts from the same donor transplanted into kidney-only or kidney-pancreas recipients. *Transplantation* 1998; 65 (1): 93.
254. Gasser M, Waaga AM, Laskowski IA, Tilney NL. The influence of donor brain death on short and long-term outcome of solid organ allografts. *Ann Transplant* 2000; 5 (4): 61.
255. Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int* 2000; 58 (2): 859.
256. Schnuelle P, Gottmann U, Koppel H, et al. Comparison of early renal function parameters for the prediction of 5-year graft survival after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2006.

257. Legendre C, Thervet E, Page B, Percheron A, Noel LH, Kreis H. Hydroxyethylstarch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation. *Lancet* 1993; 342 (8865): 248.
258. Kamar N, Garrigue V, Karras A, et al. Impact of early or delayed cyclosporine on delayed graft function in renal transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Am J Transplant* 2006; 6 (5): 1042.
259. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7 (6): 384.
260. Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA, et al. Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation* 2000; 69 (11): 2405.
261. Remuzzi G, Lesti M, Gotti E, et al. Mycophenolate mofetil versus azathioprine for prevention of acute rejection in renal transplantation (MYSS): a randomised trial. *Lancet* 2004; 364 (9433): 503.
262. Gjertson DW, Dabrowska DM, Cui X, Cecka JM. Four causes of cadaveric kidney transplant failure: a competing risk analysis. *Am J Transplant* 2002; 2 (1): 84.
263. Bailey RC, Jia-Yeong Lin M, Krakauer H. Time-to-event modeling of competing risks with intervening states in transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3 (2): 192.
264. Lambert P, Collett D, Kimber A, Johnson R. Parametric accelerated failure time models with random effects and an application to kidney transplant survival. *Stat Med* 2004; 23 (20): 3177.
265. Matas AJ, Burke JF, Jr., DeVault GA, Jr., Monaco A, Pirsch JD. Chronic rejection. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4 (8 Suppl): S23.

ANNEXE

Article soumis à la revue statistics in medecine

A parametric semi-Markov model for multistate interval-censored data and its application to kidney transplant recipients

Yohann Foucher^{1,*,\dagger}, Magali Giral², Jean-Paul Soullou², Jean-Pierre Daures¹

¹ *Institut Universitaire de Recherche Clinique, Laboratoire de Biostatistique, 641 av. du doyen Gaston Giraud, 34093 Montpellier, France.*

² *Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation and Inserm U437, 30 bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.*

SUMMARY

In the semi-Markov process, the hazard function between states depends on the time spent in the current state. In order to compute this type of multistate model, most of the transition times are always considered to be exactly identified or right censored. However, in the longitudinal analysis of chronic diseases, investigators are often confronted with interval censored data (transition times are known to have occurred in some interval). In this article, we extend traditional semi-Markov models to allow for interval censoring, for hazard function with a U or inverse U shape and for determination of initial states according to covariates. Moreover, our approach of modeling is specific to each transition in order to obtain a better parsimony of the model. All these extensions are particularly adapted for the analysis of medical cohorts. We consider the example of kidney transplant recipient follow-up to illustrate our methodology. Copyright © 2000 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: semi-Markov model; interval censoring; generalized Weibull; multinomial logistic regression, kidney transplant follow-up

1. INTRODUCTION

In medicine, the use of multistate models is becoming increasingly common. This is particularly the case to fit longitudinal data of chronic diseases. In this context, much current analysis uses the Markov model, in which hazard functions are assumed to be independent of the time spent in the current state. We can cite the recent applications in the fields of asthma by Combescure et al. [1] or by Saint-Pierre et al. [2] and Human Immunodeficiency Virus by Alioum et al. [3] or Jackson et al. [4]. Semi-Markov models make this dependence possible, by fitting distribution of the waiting time in the state [5].

Three features may make the application of such a method difficult. First, the choice of waiting time distributions must be adapted to the real dynamics of the process. Sternberg

*Correspondence to: Yohann Foucher, Institut Universitaire de Recherche Clinique, Laboratoire de Biostatistique, 641 av. du doyen Gaston Giraud, 34093 Montpellier, France.

^{\dagger}E-mail : yohann.foucher@iurc.montp.inserm.fr

and Satten [6] propose nonparametric estimators based on an EM algorithm. A parametrical approach, avoiding the use of a step function, has also been used recently by Perer-Ocon and Ruiz-Castro [7]. The authors chose Weibull distribution, which constitutes an increasing or decreasing monotone function. Second, initial states are always determined by a vector of initialization probabilities, without taking covariate effects into account. Third, observations of the exact transition times may not be available. Indeed, the state of a person may only be known at certain dates (medical visits, biological measurements, etc.). Knowledge of the transition times and the corresponding time-dependent covariates could therefore be left and right censored. This type of incomplete data has been widely studied in survival analysis [8, 9, 10]. Concerning multistate models, Commenges developed non-homogeneous Markov models using the penalized likelihood method [11]. Satten and Sternberg [12] showed how a semi-Markov model can still be fit to interval-censored data. However, they used nonparametric estimations and a unidirectional model.

This paper explores a novel parametric semi-Markov model to deal with medical problematics, particularly with the analysis of longitudinal data. Its originality lies in the introduction of generalized Weibull hazard function, in the determination of initial states according to covariates and in dealing with interval-censored transition times. The development of such a type of model is motivated by the study of the evolution of kidney transplant recipients, using a cohort of patients followed up at Nantes University Hospital (France). The individuals studied are regularly recalled after receiving a kidney transplant. Two markers were collected to define three gravity states of clinical evolution : creatinine clearance and proteinuria. Transition times are therefore not exactly known and a patient may begin his/her evolution in any of these three states. Two absorbing states were also collected with their exact time of occurrence : definitive graft rejection and death. Furthermore, various covariates, some of which may be potential risk factors, were recorded at the time of transplantation and throughout the follow-up period.

The rest of this paper is organized as follows. In Section 2, the proposed general semi-Markov model is defined and in Section 3, the corresponding likelihood is computed. Section 4 applies this method to the follow-up of kidney transplant recipients and section 5 contains some concluding remarks.

2. STATISTICAL MODELLING

2.1. The semi-Markov process

Let $E = \{1, 2, \dots, k\}$ a finite state space. Suppose that the sample is constituted of n subjects, denoted by h ($h = 1, 2, \dots, n$). For a given patient h , the random processes $(T_h, X_h) = \{(T_{h,p}, X_{h,p}) : p \geq 0\}$, in which $0 = T_{h,0} < T_{h,1} < \dots < T_{h,p}$ are the consecutive times of entrance into the states $X_{h,0}, X_{h,1}, \dots, X_{h,r}, \dots, X_{h,p} \in E$, with $X_{h,r+1} \neq X_{h,r}, \forall p \geq 0$ and $X_{h,r}$ not persistent. p represents the number of transitions for the subject h . The sequences $X = \{X_{h,p}, p \geq 0\}$ form an embedded homogeneous Markov chain. The probabilities of jumping from i to j , associated with this chain, can be written as :

$$P_{ij} = P(X_{h,r+1} = j | X_{h,r} = i) \quad (1)$$

with the constraint $\sum_j P_{ij} = 1$. If state i is not persistent, then $P_{ij} \geq 0$ for $i \neq j$ and $P_{ij} = 0$ for $i = j$. Otherwise, if state i is persistent, then $P_{ij} = 0$ for $i \neq j$ and $P_{ij} = 1$ for $i = j$. In

the following developments, we will suppose that state i is transient. The embedded Markov chain does not deal with the state duration. The waiting times are defined explicitly. These processes (T_h, X_h) are called semi-Markovian, if the distribution of waiting times $d_{h,r}$, defined by the time between $T_{h,r+1}$ and $T_{h,r}$, satisfies the following equality for any subject h :

$$P(d_{h,r} \leq x, X_{h,r+1} = j | X_{h,0}, T_{h,0}, X_{h,1}, \dots, X_{h,r}, T_{h,r}) = P(d_{h,r} \leq x, X_{h,r+1} = j | X_{h,r})$$

The density probability function of the waiting time in state i before passing to state j , is given by :

$$f(x, \theta_{ij}) = \lim_{\Delta d \rightarrow 0^+} \frac{P(x < d_{h,r} < x + \Delta d | X_{h,r+1} = j, X_{h,r} = i)}{\Delta d} \quad (2)$$

in which θ_{ij} is the parameter vector. The value of the parameters can vary between transitions. To simplify notations, we will write $f_{ij}(x)$ in the place of $f(x, \theta_{ij})$. As is usual in survival analysis, we deduce from $f_{ij}(x)$ the corresponding survival function and hazard function, $S_{ij}(x)$ and $\lambda_{ij}(x)$ respectively. The marginal density probability function is deduced from the equations (1) and (2) :

$$f_i(x) = \lim_{\Delta d \rightarrow 0^+} \frac{P(x < d_{h,r} < x + \Delta d | X_{h,r} = i)}{\Delta d} = \sum_{j \neq i} P_{ij} f_{ij}(x) \quad (3)$$

By definition, the hazard function of the semi-Markovian process corresponds to the probability of jumping towards state j , given that the process occupies state i for a duration x :

$$\alpha_{ij}(x) = \lim_{\Delta d \rightarrow 0^+} \frac{P(x \leq d_{h,r} < x + \Delta d, X_{h,r+1} = j | d_{h,r} \geq x, X_{h,r} = i)}{\Delta d} = \frac{P_{ij} f_{ij}(x)}{S_i(x)} \quad (4)$$

with $i \neq j, i, j \in E$, and $\alpha_{ii}(x) = -\sum_{j \neq i} \alpha_{ij}(x)$.

2.2. Model parameterization

First, we based our strategy of modeling on the generalized Weibull distribution. The corresponding hazard function, able to fit a U or inverse U shape, is given by :

$$\lambda_{ij}(x) = \frac{1}{\theta_{ij}} \left(1 + \left(\frac{x}{\sigma_{ij}} \right)^{\nu_{ij}} \right)^{\frac{1}{\theta_{ij}} - 1} \frac{\nu_{ij}}{\sigma_{ij}} \left(\frac{x}{\sigma_{ij}} \right)^{\nu_{ij} - 1} \quad \forall x \geq 0, \forall \nu_{ij} > 0, \forall \sigma_{ij} > 0 \text{ and } \theta_{ij} > 0. \quad (5)$$

If we fix θ_{ij} at 1, we find the exact Weibull formulation. Therefore, this method generalizes the semi-Markov model based on Weibull distribution. Moreover, if we also fix the parameter ν_{ij} at 1, we find an exponential distribution (the hazard function is constant). These distributions have the advantage of being nested. Thus, the Likelihood Ratio Statistic (LRS) can be used to evaluate the relevance of a larger number of parameters.

Second, in order to take covariates into account in the model, we used the assumption of risk proportionality. The additional assumption was that covariates act on the waiting time distributions. Indirectly, from (4), their effects are reflected on the hazard functions of the semi-Markov process. Let $z_{h,ij} = (z_{h,ij}^1, z_{h,ij}^2, \dots, z_{h,ij}^{n_{ij}})$, the vector of n_{ij} covariates of the h^{th} subject, specific to the transition $i \rightarrow j$. The hazard function with covariates is therefore defined by :

$$\lambda_{ij}(x, z_{h,ij}) = \lambda_{0,ij}(x) \exp(\beta_{ij}^T z_{h,ij})$$

in which $\lambda_{0,ij}(x)$ is the baseline hazard function of the transition $i \rightarrow j$ and $\beta_{ij} = (\beta_{ij}^1, \beta_{ij}^2, \dots, \beta_{ij}^{n_{ij}})$ is the vector of n_{ij} regression parameters associated with $z_{h,ij}$. Parallel to the treatment of the Markov processes by Andersen [13], the model is semiproportional, in that the proportionality of hazards is assumed within each $i \rightarrow j$ transition but does not hold between transitions. The exponential function was chosen in order to obtain a strictly positive hazard function. Moreover, an interpretation as relative risk (RR) can be made from the ratio of the hazard function of waiting times.

2.3. Initial probabilities

This paragraph is significant when the studied process can be observed at the origin of follow-up and when it can begin in several states. This type of data may be analyzed using regression models for categorical dependent variables with more than two response categories [14, 15]. Let $G = \{1, 2, \dots, c\}$ the finite initial state space, with $G \in E$. We define

$$\pi_{0j} = P(X_{h,1} = j) \quad \forall j \in G \quad (6)$$

as the probability that a subject h will begin his evolution in state j . By defining $z_{h,0j}$, the vector of covariates associated with the initial state j for the h^{th} subject, the usual multinomial logistic regression can be written as :

$$\pi_{0j} = \frac{\exp(\gamma_{0j} + \beta_{0j} z_{h,0j})}{\sum_{k=1}^c \exp(\gamma_{0k} + \beta_{0k} z_{h,0k})} \quad \text{for } j = 1, \dots, c \quad (7)$$

in which γ_{0j} and β_{0j} are respectively the intercept and the vector of regression parameters associated with $z_{h,0j}$. Assuming that initial states are mutually exclusive and exhaustive, we must obtain $\sum_{j=1}^c \pi_{0j} = 1$. Then, choosing the c^{th} state as the initial state of reference, we adopt the convention that γ_{0c} and β_{0c} are null.

3. THE ESTIMATION PROCEDURE

3.1. Interval censoring and Likelihood

In order to accommodate right and interval censoring, we define more components, as proposed by Odell et al. [8]. Let $d_{h,r}^0$ be a value such that if $d_{h,r}^0 < d_{h,r}$ then $d_{h,r}^0$ is observed and $d_{h,r}$ is not. Similarly, let $d_{h,r}^1$ be a value such that if $d_{h,r}^1 > d_{h,r}$ then $d_{h,r}^1$ is observed and $d_{h,r}$ is not.

In the context of our longitudinal analysis, three types of observation must be distinguished. We will always assume that censoring is not informative [16].

- (i) Consider that the waiting time $d_{h,r}$ is right censored ($d_{h,r}^0 \leq d_{h,r} < d_{h,r}^1 = \infty$), indicated by $\delta_{h,r}^R$ in order to compute the likelihood. The contribution of such an observation is

$$P(x > d_{h,r}^0 | X_{h,r} = i) = \sum_{j \neq i} P_{ij} S_{ij}(d_{h,r}^0)$$

- (ii) Similarly, $\delta_{h,r}^I$ indicates that $d_{h,r}$ is interval censored ($0 < d_{h,r}^0 < d_{h,r} \leq d_{h,r}^1 < \infty$). Therefore, we have

$$P(d_{h,r}^0 < x < d_{h,r}^1, X_{h,r+1} = j | X_{h,r} = i) = P_{ij} (S_{ij}(d_{h,r}^0) - S_{ij}(d_{h,r}^1))$$

The left censoring is a particular case of the interval censoring, where $d_{h,r}^0 = 0$. The last expression can be simplified to $P_{ij}(1 - S_{ij}(d_{h,r}^1)) = P_{ij}F_{ij}(d_{h,r}^1)$

- (ii) Finally, $\delta_{h,r}^E = 1 - \delta_{h,r}^R - \delta_{h,r}^I$ indicates that $d_{h,r}$ is exactly observed. The contribution equals

$$\lim_{\Delta d \rightarrow 0^+} \frac{P(d_{h,r} < x < d_{h,r} + \Delta d, X_{h,r+1} = j | X_{h,r} = i)}{\Delta d} = P_{ij}f_{ij}(d_{h,r})$$

Making the product of all of these contributions, the Likelihood \mathcal{L} can thus be written as :

$$\begin{aligned} \ln \mathcal{L} &= \sum_h \left\{ \gamma_{0X_{h,1}} + \beta_{0X_{h,1}z_{h,0}X_{h,1}} - \ln \left(\sum_{i=1}^c \exp(\gamma_{0i} + \beta_{0i}z_{h,0}X_{h,1}) \right) \right. \\ &+ \sum_{ij} \sum_{X_{h,r}=i, X_{h,r+1}=j} \left\{ \delta_{h,r}^E \left[\ln P_{ij} - \ln \theta_{ij} + \left(\frac{1}{\theta_{ij}} - 1 \right) \ln \left(1 + \left(\frac{d_{h,r}}{\sigma_{ij}} \right)^{\nu_{ij}} \right) \right. \right. \\ &+ \ln \nu_{ij} + (\nu_{ij} - 1) \ln d_{h,r} - \nu_{ij} \ln \sigma_{ij} + \beta_{ij}z_{h,ij} + \ln A_{ij}(d_{h,r}) \left. \left. \right] + \delta_{h,r}^I \right. \\ &\left. \times \left[\ln P_{ij} + \ln(A_{ij}(d_{h,r}^0) - A_{ij}(d_{h,r}^1)) \right] + \sum_{ij} \sum_{X_{h,r}=i} \left\{ \delta_{h,r}^R \left[\ln \left(\sum_{j \neq i} P_{ij} A_{ij}(d_{h,r}^0) \right) \right] \right\} \right\} \end{aligned} \quad (8)$$

where $A_{ij}(x) = \exp(1 - (1 + (\frac{x}{\sigma_{ij}})^{\nu_{ij}})^{\frac{1}{\theta_{ij}}}) \exp(\beta_{ij}z_{h,ij})$ and $\gamma_{03} = \beta_{03} = 0$.

3.2. Modeling strategy

First, models are said to be univariate when only one factor is taken into account, even if it influences all of the transitions. We define a factor which acts on a transition as a covariate. We test the significance of regression parameters ($p \leq 0.20$), using the Likelihood Ratio Statistic (LRS). All the previously selected covariates are included in the multivariate model. The vector of covariates are transition-specific. By a descending procedure and always using LRS, each coefficient with a p-value higher than 0.05 was removed from the model.

Mathematical computing was carried out using R software version 2.1.1. We used the quasi-Newtonian algorithm to maximize Likelihood and to compute the Hessian matrix. Then, in order to ensure the conclusions concerning risk factors using LRS, we propose the Wald test. The agreement of the p-values also tests the good approximation of the covariance matrix.

4. AN ANALYSIS OF KYDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS

4.1. Data and proposed model

Such developments of the semi-Markov model were motivated by the analysis of the data from a prospective study of kidney transplant recipients, extracted from the DIVAT data bank where biological and clinical data of transplanted patients have been recorded since 1990. Data were computerized at each checkup visit and at each anniversary of the graft.

We consider the process characterized in Figure 1. The follow-up starts 3 months after the date of transplantation. The process is then regarded as stabilized. Two markers are used to qualify three gravity states of clinical evolution : creatinine clearance (CL) and

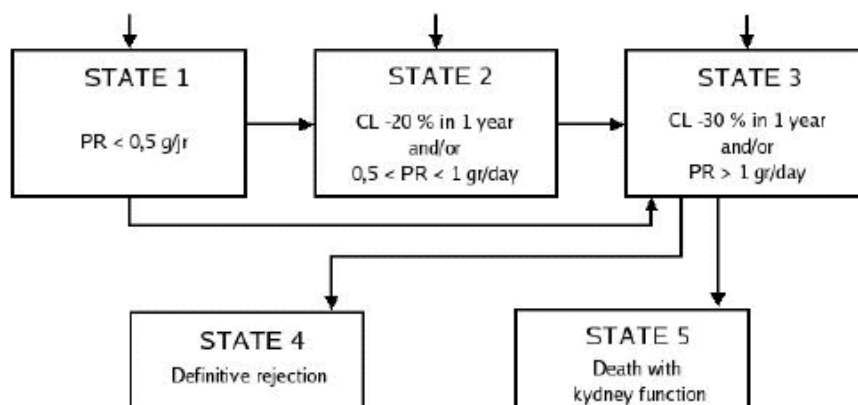


Figure 1. Five-state semi-Markov model

proteinuria (PR). Two absolute thresholds of PR (0.5 and 1 *gr/day*) identify three disease stages. Conversely, CL is rendered more relevant by considering its relative evolution. CL is calculated using the MDRD formula [17]. If in less than one year, this marker decreases by more than 20 percent, the state of the patient is considered to have worsened. A decrease of more than 30 percent is considered even more serious. Moreover, clinicians consider that an evolution of CL or PR below or above their respective threshold constitutes an aggravation of prognostic, which cannot be recovered. This explains the absence of return transition.

Except for special cases, transition times between states are not exactly known. Indeed, these markers evolve uninterrupted, but biological measurements are discontinuous. Patients may begin their evolution in one of the first three states. Two absorbing states are also defined, their exact date of occurrence being available : definitive graft rejection and death. A preliminary data analysis has demonstrated that not all of the possible transitions are represented.

One of the purposes of this model is to analyze evolution of patients according to the 5 following factors : gender (women = 1 ; men = 0), cold ischemia time (1 if higher than or equal to 16 hours and 0 otherwise), year of the transplant (1 if higher than or equal to 1998 and 0 otherwise), recipient age at the time of transplantation (1 if more than or equal to 55 years old and 0 otherwise) and delayed graft function (1 if more than or equal to 6 days and 0 otherwise). All of the patients with missing data were excluded. We also selected adults who had had more than 3 visits, in order to deal only with patients receiving proper follow-up. Finally, our sample is constituted of 997 patients, representing 22131 visits and 1980 exact or censored transitions. Table I describes the frequencies of these transitions. One can see that only 15.8 % and 12.2 % of the total number of transitions $3 \rightarrow 4$ and $3 \rightarrow 5$ are exactly observed. These percentages represent the patients directly entering in the state 3. The dates of entry and exit are then exactly indicated. Except for initial states, all of the other transitions are interval, left or right censored.

4.2. Results

In the univariate analysis, 14 transition-specific covariates were selected. By the descending procedure, only 9 factors were finally retained ($\ln\mathcal{L} = -4865.36$). The estimations of regression parameters are given in Table II. Table III presents the initial probabilities according to

Transition	Number	Percentage	Exactly observed ¹
0 → 1	807	80.9 %	.
0 → 2	112	11.2 %	.
0 → 3	78	7.8 %	.
total	997	100.0 %	.
1 → 2	396	20 %	0.0 %
1 → 3	299	15.1 %	0.0 %
1 → censoring	103	5.2 %	.
2 → 3	330	16.7 %	0.0 %
2 → censoring	159	8 %	.
3 → 4	139	7 %	15.8 %
3 → 5	41	2.1%	12.2%
3 → censoring	513	25.9 %	.
total	1980	100.0 %	.

¹ Percentage of exact observed times for a row

Table I. Frequency of the transitions observed

covariates. One can see that the majority of patients begin in state 1. Men have a lower probability of beginning in state 1 than women (0.82 vs 0.87 for a cold ischemia time ≥ 24 hours and a delayed of graft function < 6 days). Delayed graft function (DGF) and cold ischemia time also seem to constitute factors influencing these initial probabilities. A cold ischemia time greater than 24 hours is associated with an increasing probability of beginning in state 2. Finally, a DGF less than 6 days increases the probability of starting in state 1.

Transition	Covariate	Estim.	SD	RR	p using LRS	p using Wald
0 → 1	Intercept	2.45	0.16	.	0.0001	0.0001
0 → 1	Recipient Gender	0.40	0.17	.	0.0207	0.0205
0 → 1	Delayed graft function	-0.53	0.17	.	0.0013	0.0014
0 → 2	Intercept	-0.63	0.44	.	0.0842	0.1411
0 → 2	Cold ischemia time	1.10	0.43	.	0.0028	0.0104
1 → 2	Year of transplantation	0.76	0.12	2.13	0.0001	0.0001
1 → 3	Recipient Gender	0.28	0.15	1.32	0.0603	0.0575
1 → 3	Year of transplantation	1.20	0.19	3.32	0.0001	0.0001
2 → 3	Year of transplantation	0.52	0.12	1.68	0.0001	0.0001
3 → 5	Recipient age	1.62	0.40	5.05	0.0001	0.0001

Table II. Regression parameters for the final multivariate model

A few factors also influence the evolution of the process. In order to interpret the effects of such factors, we are restricted by equation (2) to conditioning on the following state. For example, the patients receiving a kidney after 1997 are 2.13 times more likely to leave state 1 than the others, given that they move to state 2. Respecting the same formulation, the year of transplantation constitutes an accelerating factor for transitions $1 \rightarrow 3$ and $2 \rightarrow 3$. Finally,

		Women			Men		
		π_{01}	π_{02}	π_{03}	π_{01}	π_{02}	π_{03}
Cold ischemia time < 16 hours	DGF < 6 days	0.92	0.03	0.05	0.88	0.04	0.08
	DGF \geq 6 days	0.87	0.05	0.09	0.82	0.06	0.12
Cold ischemia time \geq 16 hours	DGF < 6 days	0.87	0.08	0.05	0.82	0.11	0.07
	DGF \geq 6 days	0.80	0.13	0.08	0.72	0.17	0.11

Table III. Initial probabilities of beginning process in the state j , π_{0j} ($j = 1, 2, 3$)

being a woman and being older than 55 years respectively constitute accelerating factors for transitions $1 \rightarrow 3$ and $3 \rightarrow 5$. One can see that the LRS and Wald tests give very similar p-values. This agreement reinforces the coherence of the estimates.

Figure 2 presents examples of hazard functions of the semi-Markov process, α_{34} and α_{35} , depending on recipient age at transplantation. One can see that a covariate may indirectly influence a transition $i \rightarrow j$, even if only a significant association is retained for another transition $i \rightarrow k$ with the same starting state. Even though no unique value is calculated, Figure 3 shows the ratio of these hazard functions according to covariates. Values of the hazard ratio are above 1, demonstrating a protective role for recipient age lower than 55 years on the rejection of the kidney. This risk is not constant over the time.

Transition	σ_{ij}		ν_{ij}		θ_{ij}	
	Estim.	SD	Estim.	SD	Estim.	SD
1 \rightarrow 2	1071.00	2.49 $e - 7$	0.56	2.80 $e - 2$	0.06	9.18 $e - 3$
1 \rightarrow 3	1542.00	2.66 $e - 6$	0.61	3.89 $e - 2$	0.04	8.74 $e - 3$
2 \rightarrow 3	895.00	3.56 $e - 7$	0.56	3.08 $e - 2$	0.08	1.17 $e - 2$
3 \rightarrow 4	28.93	6.78 $e - 4$	1.36	8.78 $e - 2$	0.31	6.08 $e - 2$
3 \rightarrow 5	153.99	1.35 $e - 4$	1.10	1.61 $e - 1$	0.17	1.28 $e - 1$

Table IV. Waiting time distribution parameters for the final multivariate model ($P_{12} = 0.59$
 $SD = 0.02$, $P_{34} = 0.76$ $SD = 0.09$)

The results concerning parameters of waiting time distributions are presented in Table IV. The values of θ_{ij} show how the use of generalized Weibull distribution is relevant compared with Weibull or Exponential functions. Indeed, the LRS for the null hypothesis $\{\theta_{ij} = 1 \ \forall ij = 12, 13, 23, 34, 35\}$ equals 123.37 and corresponds to a p-value lower than 0.0001. One can notice that the standard deviations of σ_{ij} parameters are very small. This may be explained by the smaller effect of a σ_{ij} variation on the hazard function $i \rightarrow j$, compared to a change of ν_{ij} or θ_{ij} .

Even though the semi-Markov models allow for a more precise analysis of the factors associated with the dynamics of a process than the traditional survival models, it may be interesting to study the marginal effect of a covariate on the occurrence of a final event during the chronological time following transplantation. This is particularly interesting when a covariate is associated with few transitions. For example, in our application, the main covariate seems to be the year of transplantation. Receiving a transplant after 1997 constitutes a risk

factor for kidney degradation. However, it does not seem to be associated with transitions into final event. The issue is therefore to know the global impact of this variable on patient outcome. This marginal probability function of a final event k ($k = 4, 5$) on the chronological time is deduced from equations (1), (2) and (7) using the convolution product :

$$\begin{aligned}
 p_k(t) = & \pi_{03}P_{3k}f_{3k}(t) + \pi_{02} \int_0^t P_{23}f_{23}(x)P_{3k}f_{3k}(t-x)dx + \pi_{01} \left[\int_0^t P_{13}f_{13}(x) \right. \\
 & \times \left. P_{3k}f_{3k}(t-x)dx + \int_0^t P_{12}f_{12}(x) \int_0^{t-x} P_{23}f_{23}(y)P_{3k}f_{3k}(t-x-y)dydx \right] \quad (9)
 \end{aligned}$$

In our application, we decided to represent the marginal impact of the year of transplantation and the delayed graft function on the final prognostic of the graft. Figure 4 shows those probabilities of occurrence of rejection or death during the chronological time. For patients transplanted before 1998, a better prognostic of the kidney can clearly be seen. This is the same for death. This association is certainly due to the best data collect and to the more significant number of visits since 1998. The effect of DGF does not seem to be so important, even if its impact on the initial states modifies the probabilities of occurrence of states 4 and 5.

5. DISCUSSION

We have considered a flexible multistate model in order to analyze inherently complex longitudinal data. This model has been applied to kidney transplant follow-up. The generalized Weibull hazard function appears to be suitable and the interval censored approach useful for such a type of application.

Moreover, the use of a multinomial and multivariate logistic approach to analyze the initial process leads to a more precise modeling. The advantage of our method is also to base the estimations on the traditional maximum likelihood. The LRS can then be applied to the parameter selection strategy.

However, a few limits of the proposed model must be underlined. First, in the application, there are two transitions possible starting from the state 1 : $1 \rightarrow 2$ or $1 \rightarrow 3$. If patients were observed in an uninterrupted fashion, only the transition $1 \rightarrow 2$ should be present. We keep the transition $1 \rightarrow 3$ in order to identify the covariates associated with a sudden increase in CR. The second solution would be to take into account the double interval censoring transitions $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$ in the loglikelihood function. This contribution, according to the notations in section 3.1, can be written using the convolution product :

$$P_{12}P_{23} \left(\int_0^{d_{h,r}^0} f_{12}(x)S_{23}(d_{h,r}^0 - x)dx - \int_0^{d_{h,r}^1} f_{12}(x)S_{23}(d_{h,r}^1 - x)dx \right)$$

Second, the semi-Markovian property (1), according to which the evolution of the process is conditioned by the present state and the time spent in this state, is a strong assumption. For example, it is difficult to think that a patient who enters directly into state 3 is similar to a patient who has had his/her transplantation for a long time and has passed through states 2 and 3. The use of an embedded Markov chain, with an order higher than 1 and dependent on the chronological time, could constitute an extension.

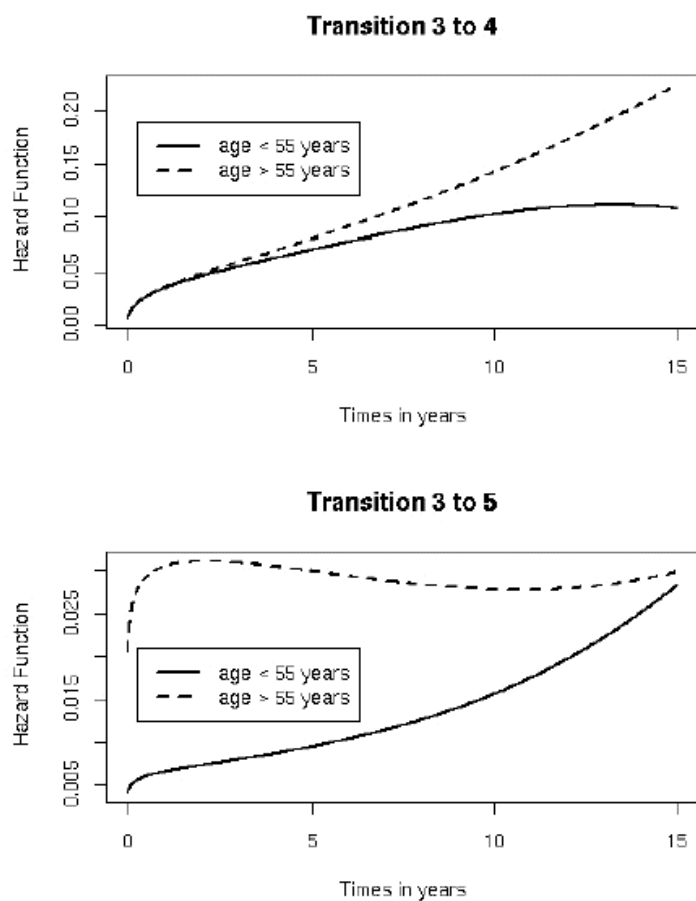


Figure 2. Hazard function of the semi-Markov process for the transitions $3 \rightarrow 4$ and $3 \rightarrow 5$

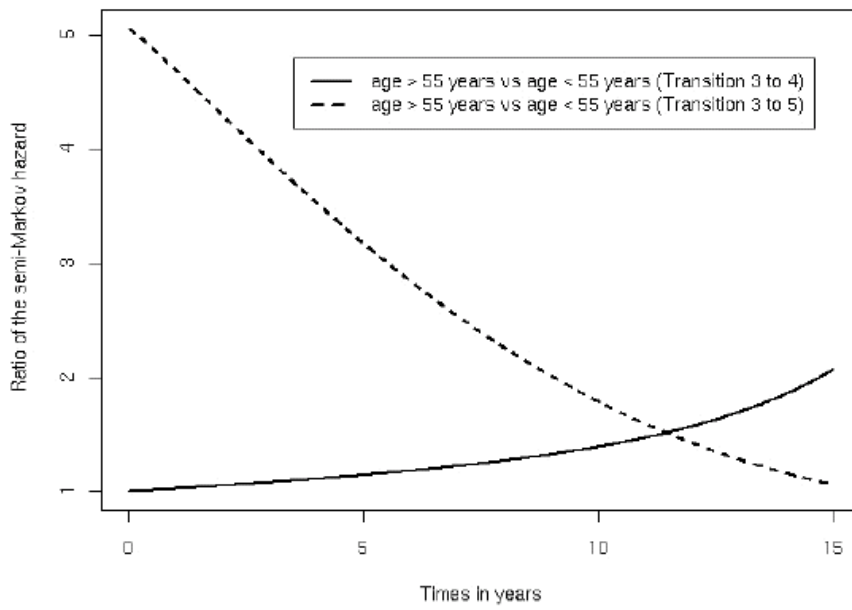


Figure 3. Effects of recipient age on the transitions $3 \rightarrow 4$ and $3 \rightarrow 5$

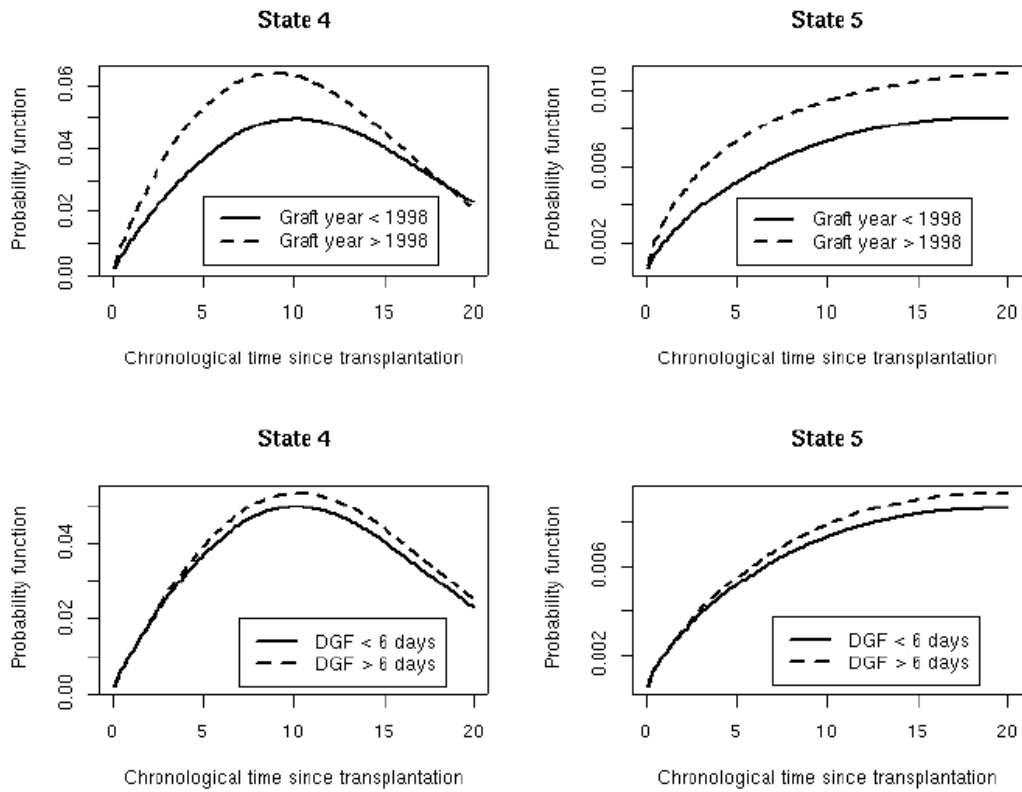


Figure 4. Probabilities of occurrence of rejection (state 4) or death (state 5) during the chronological time since transplantation (all other covariates are fixed at 0)

REFERENCES

1. C Combescure, P Chanez, P Saint-Pierre, JP Daures, H Proudhon, and P Godard. Assesment of variations in control of asthma over time. *European Respiratory Journal*, 22:298–304, 2003.
2. P Saint-Pierre, C Combescure, JP Daures, and P Godard. The analysis of asthma control under a Markov assumption with use of covariates. *Statistics in Medicine*, 22:3755–3770, Dec 2003.
3. A Alioum, V Leroy, D Commenges, F Dabis, and R Salamon. Effect of gender, age, transmission category, and antiretroviral therapy on the progression of human immunodeficiency virus infection using multistate Markov models. Groupe d'epidemiologie clinique du SIDA en Aquitaine. *Epidemiology*, 9:605–612, 1998.
4. C Jackson, L Sharples, S Thompson, S Duffy, and E Couto. Multistate Markov models for disease progression with classification error. *Journal of the Royal Statistical Society : Series D*, 52:193–193, Jul 2003.
5. DM Dabrowska, G Sun, and MM Horowitz. Cox Regression in a Markov Renewal Model : an application to the analysis of bone transplant data. *Journal of the American Statistical Association*, 89:867–877, 1994.
6. M Sternberg and G Satten. Discrete time nonparametric estimation for chain of events data subject to interval censoring and truncation. *Biometrics*, 55:179–187, 1999.
7. R Perez-Ocon and JE Ruiz-Castro. *Semi-Markov Models and Applications*, chapter 14, pages 229–238. Kluwer Academic Publishers, 1999.
8. P Odell, K Andersen, and R D'Agostino. Maximum Likelihood Estimation for Interval-Censored Data Using a Weibull-Based Accelerated Failure Time Model. *Biometrics*, 48:951–959, 1992.
9. J Sun. Variance estimation of a survival function for interval-censored survival data. *Statistics in medicine*, 20:1249–1257, 2001.
10. Y Chi and CH Tseng. Comparison of Several Relative Risk Estimators with Interval-Censored Data. *Biometrical Journal*, 44:197–212, 2002.
11. Commenges D. Inference for multi-state models from interval-censored data. *Statistical Methods in Medical Research*, 11:162–182, 2002.
12. G Satten and M Sternberg. Fitting Semi-Markov Models to interval-Censored Data with Unknown Initiation Times. *Biometrics*, 55:507–513, 1999.
13. PK Andersen, LS Hansen, and N Keiding. Assessing the influence of reversible disease indicators on survival. *Statistics in Medicine*, 10:1061–1067, 1991.
14. P McCullagh. Regression models for ordinal data (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society : Series B*, 42:109–142, 1980.
15. P McCullagh. *Generalized Linear Models*. Chapman and Hall, 1983.
16. JF Lawless. *Statistical Models and Methods for Lifetime Data*. Wiley, New York, 1982.
17. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, and Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Annals of Internal Medicine*, 130:461–70, 1999.