

2019-2020

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Qualification en Anatomie et Cytologie Pathologiques

IMPACT PRONOSTIQUE DE L'ŒDÈME DANS LES BIOPSIES RÉNALES DE GREFFONS AU COURS DES REJETS AIGUS

Benjamin MORVANT

Né le 03 juin 1987 au Mans (72)

Sous la direction de Mme le Professeur Marie-Christine ROUSSELET

Membres du jury

Mme le Professeur COPIN Marie-Christine	Présidente
Mme le Professeur ROUSSELET Marie-Christine	Directrice
M le Professeur AUGUSTO Jean-François	Membre
M le Professeur ROUSSEAU David	Membre
Mme le Docteur CROUÉ Anne	Membre
Mme le Docteur DUVEAU Agnès	Membre

Soutenue publiquement le :
23 octobre 2020

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné MORVANT Benjamin
déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant le **21/09/2020**

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie : Pr
Frédéric Lagarce

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
AZZOUZI Abdel Rahmène	Urologie	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BEYDON Laurent	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BOUVARD Béatrice	Rhumatologie	Médecine
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CAILLIEZ Eric	Médecine générale	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CHAPPARD Daniel	Cytologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine Générale	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
D'ESCATHA Alexis	Médecine et santé au Travail	Médecine
DINOMAS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUBEE Vincent	Maladies Infectieuses et Tropicales	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
EVEILLARD Mathieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine
FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GARNIER François	Médecine générale	Médecine

GASCOIN Géraldine	Pédiatrie	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILLET David	Chimie analytique	Pharmacie
HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine
HENNI Samir	Chirurgie Vasculaire, médecine vasculaire	Médecine
HUNAUULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LEGENDRE Guillaume	Gynécologie-obstétrique	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine
LEROLLE Nicolas	Médecine Intensive-Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et De la reproduction	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
MERCIER Philippe	Anatomie	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et Santé au Travail	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et Biologie Moléculaire	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOMME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Thérapeutique	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
TRZEPIZUR Wojciech	Pneumologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	Pédiatrie	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie

VERNY Christophe
WILLOTEAUX Serge

Neurologie
Radiologie et imagerie médicale

Médecine
Médecine

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANGOULVANT Cécile	Médecine Générale	Médecine
BAGLIN Isabelle	Chimie thérapeutique	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELLANGER William	Médecine générale	Médecine
BELONCLE François	Réanimation	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie	Pharmacie
BIERE Loïc	Cardiologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHAO DE LA BARCA	Juan-Manuel	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine
CLERE Nicolas	Pharmacologie / physiologie	Pharmacie
COLIN Estelle	Génétique	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
HAMEL Jean-François	Biostatistiques, informatique médicale	Médecine
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
KHIATI Salim	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	Médecine Générale	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie	Médecine
LACOEUILLE Franck	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
LEBDAI Souhil	Urologie	Médecine
LANDREAU Anne	Botanique/ Mycologie	Pharmacie
LEBDAI Souhil	Urologie	Médecine
LEGEAY Samuel	Pharmacocinétique	Pharmacie
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Pharmacognosie	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
LUQUE PAZ Damien	Hématologie; Transfusion	Médecine
MABILLEAU Guillaume	Histologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique	Pharmacie
MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAILHORIE Hélène	Bactériologie-virologie	Médecine

PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
PY Thibaut	Médecine Générale	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	Médecine Générale	Médecine
RINEAU Emmanuel	Anesthésiologie réanimation	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistiques	Pharmacie
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie
SAVARY Camille	Pharmacologie-Toxicologie	Pharmacie
SCHMITT Françoise	Chirurgie infantile	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	Pharmacie Clinique et Education Thérapeutique	Pharmacie
TANGUY-SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion	Médecine
TESSIER-CAZENEUVE Christine	Médecine Générale	Médecine
VENARA Aurélien	Chirurgie générale	Médecine
VIAULT Guillaume	Chimie organique	Pharmacie

PROFESSEURS EMERITES

Philippe MERCIER	Neurochirurgie	Médecine
Dominique CHABASSE	Parasitologie et Médecine Tropicale	Médecine
Jean-François SUBRA	Néphrologie	Médecine

AUTRES ENSEIGNANTS

AUTRET Erwan	Anglais	Médecine
BARBEROUSSE Michel	Informatique	Médecine
BRUNOIS-DEBU Isabelle	Anglais	Pharmacie
CHIKH Yamina	Économie-Gestion	Médecine
FISBACH Martine	Anglais	Médecine
O'SULLIVAN Kayleigh	Anglais	Médecine

Mise à jour au 09/12/2019

REMERCIEMENTS

A ma directrice de thèse,

Madame le Professeur Marie-Christine Rousselet

Professeur des Universités – Praticien hospitalier

Chef de service du département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire

Je vous remercie pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer ma thèse. Vous m'avez appris cette magnifique discipline qu'est l'Anapath. Vous avez toute ma gratitude pour votre enseignement, votre bienveillance, votre patience, votre rigueur, votre écoute et la confiance que vous m'avez accordée. J'ai eu la chance de vous avoir comme mentor depuis mon externat. Je vous prie de croire en ma sincère et profonde reconnaissance.

REMERCIEMENTS

A la présidente de mon jury,

Madame le Professeur Marie-Christine Copin

*Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHU Angers*

Pour me faire l'honneur de présider la soutenance de ma thèse. Pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et votre disponibilité. Je vous souhaite la bienvenue à Angers.

REMERCIEMENTS

Je remercie également les autres membres du jury,

Monsieur le Professeur Jean François Augusto

Professeur des Universités – Praticien hospitalier

Chef de service du département de Néphrologie – Dialyse – Transplantation, CHU Angers

Pour vos précieux conseils prodigués et l'aide apportée à la réalisation de ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre bienveillance.

Monsieur le Professeur David Rousseau

Professeur des Universités

Laboratoire LARIS – université d'Angers

Pour avoir rendu possible ce travail avec **Ali Ahmad**, notamment sur la partie bio-informatique. Vous avez toute ma gratitude pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ma thèse.

Madame le Docteur Anne Croué

Praticien Hospitalier

Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHU Angers

Pour tes conseils prodigués en anapath et en dehors durant tout mon internat et pour me faire l'honneur de participer à mon jury. Je te remercie de ton soutien, ta pédagogie, ta disponibilité, pour tes Crouettes en macroscopie (Qui est BM ?), et pour notre intérêt commun pour les félins.

Madame le Docteur Agnès Duveau

Praticien hospitalier

Département de Néphrologie – Dialyse – Transplantation, CHU Angers

Pour me faire l'honneur de participer à mon jury et d'évaluer ce travail.

REMERCIEMENTS

Je tiens également à remercier,

L'ensemble du Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire du CHU d'Angers

Mme le Professeur Audrey Rousseau, pour ta sympathie, ton encadrement sur les projets de recherche et l'enseignement de la neuropathologie.

M le Professeur Jean-Paul Saint-André, pour votre disponibilité et vos précieux enseignements.

Mme le Docteur Merzouka Zidane. Je te remercie Kouka pour toutes mes années d'internat, pour le compagnonnage, pour ta disponibilité permanente et ta bienveillance sans faille.

Mme le Docteur Sophie Michalak. Tu as toute ma gratitude pour m'avoir fait partager ton expertise sur la pathologie hépatique et sur la pathologie en général et pour ton encadrement lors de présentations orales. Merci aussi pour ta sympathie et tes précieux conseils.

M le Docteur Johnny Salloum. Je te remercie Sidi Johnny pour ta sympathie et ta disponibilité, je passerai avec plaisir te voir en terres guadeloupéennes !

Mme le Docteur Caroline Savary. Merci Caroline pour le semestre passé ensemble (front !!), pour tes conseils et ta disponibilité.

Les techniciens, **François, Pascale, Nicolas, Stéphanie, Chimène, Christelles S et P, Gwennaelle, Nadine, Fanny, Lydie, Claire, Amélie, Marie, Valentine**, les secrétaires, **Aurélié, Christelle, Nadine** et **Florence** et l'ingénieur **Laeticia**. Merci également à **Kelly**.

Et ceux qui sont passés dans le service,

Mme le Docteur Caroline Eymerit Morin. Tu auras été un de mes mentors depuis mes débuts d'internat. Merci pour ta bienveillance, j'espère que nous aurons l'occasion de travailler à nouveau ensemble.

Mmes les Docteur Sarah Leroux, Rida El Ayoubi, Hélène Plouhinec. Merci à vous pour tous les bons moments passés ensemble.

M le Docteur Triaou, je te remercie pour tes conseils lors des quelques semestres où tu as été mon sénior.

Mme Boisselier Blandine pour tes précieux conseils et pour les potins partagés dans notre bureau.

A l'ensemble du laboratoire du Centre Pathologique de l'Ouest

M le Docteur Éric Lavoine. Éric, je t'exprime toute ma gratitude pour ton soutien, ton investissement dans nos projets associatifs et dans la formation des internes angevins. Merci pour ton enseignement sur la pathologie digestive.

M le Docteur Sami Kettani, Mme le Docteur Maud Brousseau, M le Docteur Abdelmajid Dhouibi, Mme le Docteur Christine Richard. Veuillez recevoir l'expression de mes sincères remerciements pour l'accueil dans votre laboratoire et pour m'avoir fait partager vos expériences. Un grand merci aux techniciens, **Nathalie, Wen, Antoine, Isabelle** et toute l'équipe des techniciens et des secrétaires.

A l'ensemble du laboratoire de Pathologie du Centre hospitalier du Mans

M le Docteur Jérémy Sandrini, Mme le Docteur Armelle Foulet, M le Docteur Bernard Prophette, M le Docteur Louis Rémy De Ybarlucea, M le Docteur Tarik Yadaden. Je vous exprime toute ma gratitude pour l'accueil que vous m'avez fait dans le service du Mans et pour vos précieux conseils prodigués.

Aux techniciennes (**Jocelyne, Tana, Isabelle** et toute l'équipe) et les secrétaires du service d'anapath du Mans. Merci pour ce semestre un peu particulier, le plus long de mon internat !

A l'ensemble du laboratoire de Pathologie de l'Institut Cancérologique de l'Ouest

Mmes les Docteurs Véronique Verriele, Isabelle Valo et Farida Benallegue. Vous avez toute ma gratitude pour m'avoir enseigné la pathologie mammaire. Une pensée également à toute l'équipe technique.

A l'ensemble du Département d'Oncologie Médicale de l'ICO

Toute l'équipe médicale et l'équipe infirmière. En particulier à **Monsieur le Docteur Capitain**, merci Olivier pour tes précieux conseils et ton écoute *là-dessus*.

A l'ensemble du Département de biologie moléculaire de l'ICO

M le Professeur Alain Morel, Mmes les Docteurs Louise-Marie Chevalier et Camille Ramirez, M Luc Fey et toute l'équipe technique. Alain, je vous remercie de m'avoir accueilli un semestre dans votre service, pour votre disponibilité et votre expertise.

A l'ensemble de l'équipe 7 du laboratoire INSERM 1232 (CRCINA)

M le Docteur Delneste et Mme Le Professeur Pascale Jeannin. Vous avez toute ma gratitude pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire lors de mon année de Master 2.

REMERCIEMENTS

A mes co-internes et amis, et toute la team Path Angevine :

L'équipe mancelle avec **Baptiste** et **Romane** (Continuez à faire vivre l'esprit du Snam à Angers !)

Laure Marie, merci pour ta sympathie, tes bons conseils et ton franc parler.

Jérémie H avec la team FF, tu feras un excellent anapath.

Franck, mon comparse depuis le début de l'internat.

Une pensée pour l'équipe des présidents :

Alexandre, merci pour ton aide et ton soutien durant toutes ces années. A toutes les galères que nous avons vécues dans le bureau.

Sarah pour qui la présidence n'a pas été un fleuve tranquille, merci pour ces semestres passés ensemble, l'anapath du cœur/love, ta bonne humeur et le respect de la hiérarchie.

Pierre, bravo pour avoir persisté dans tes projets de recherche et ton M2.

Leslie, je te souhaite une belle expérience hollandaise, reviens à Angers avec des idées plein la tête !

Jérémie P pour qui l'aventure Anapath commence.

Un grand merci à tous pour votre implication dans cette belle asso qu'est l'AFAA !

Sans oublier les hors filières qui sont passées nous voir, **Alexia** et **Margot** et mes compagnons de M2, **Carole** et **Christopher**.

Aux amis de l'internat : les futurs manceaux **Kevin** et **Marlène**, pour tous les bons moments passés ensemble et merci **Kevin** pour ton énergie et ta motivation permanente (sans oublier le T-shirt...). **Yannick** et **Ana** avec nos galères de travaux et les soirées undergrounds. **Clément B** pour nous avoir rejoint au Lutin.

Une pensée également pour **Pierre** avec qui nous avons partagé un semestre spécial, **Laurent D**, **Edouard G**.

A mes amis d'externat, **Blandine**, **Fanny**, **Jean Baptiste**, **Florian**.

A mes amis depuis toujours, **Clément**, **Eva**, **Antoine**, **Tangui**, **Baba**, **Fred** et **Mehdi**.

REMERCIEMENTS

A mes proches :

A ma famille, pour le soutien dont ils ont toujours fait preuve à mon égard.

A mes **BC** n°1, n°2 et n°3, merci pour votre réconfort dans les moments difficiles.

A mon grand frère, **Antoine**, mon compagnon depuis le début !

A mes **parents**, pour tout ce que vous avez fait pour moi vous aurez mon éternel le reconnaissance et mon indéfectible amour.

Ce travail vous est dédié.

A ma chère et tendre, ma moitié **Florence**. Merci mon amour de faire partie de ma vie depuis toutes ces années. A notre aventure Yonnaise. Tu comptes pour moi plus que tout au monde !

LISTE DES ABREVIATIONS

ADICAP :	Association pour le Développement de l'Informatique en Cytologie et Anatomo-Pathologie
ADN :	Acide désoxyribonucléique
BK :	Virus BK
C1q, C3, C4d :	Complément
CD4 / CD8 / CD20 :	Cluster de Différenciation
CHU :	Centre Hospitalo-Universitaire
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DFG :	Débit de filtration glomérulaire
DSA :	Antigènes spécifiques du donneur
FP :	Faux Positif
FN :	Faux négatif
GLO :	Glomérule
GN :	Glomérulonéphrite
HLA :	Human Leucocyte Antigens
HPS :	Hématoxyline Phloxine Safran
HR :	Hazard Ratio
HSF	Hyalinose Segmentaire et Focale
IF:	Immunofluorescence
IHC :	Immuno-histochimie
IC :	Intervalle de Confiance
Ig :	Immunoglobuline
IMC :	Indice de Masse Corporelle
IV :	Intra-Veineuse
LB :	Lymphocyte B
LT :	Lymphocyte T
ND	Néphropathie Diabétique
NK :	Natural killer
NL :	Néphropathie Lupique
NTIC :	Néphropathie Tubulo-Intertitielle Chronique
OPcR :	Œdema Plasma cell Rich
PAS :	Periodic Acid Shift
PKAD :	Polykystose Autosomique Dominante
PR :	Purpura Rhumatoïde
RA :	Rejet Aigu
TCR :	T Cell Receptor
TGF β :	Transforming Growth Factor β
TNF α :	Tumor Necrosis Factor α
T-rég :	Lymphocytes T régulateurs
VP :	Vrai Positif
VN :	Vrai Négatif

RESUME

PREAMBULE : connaissances générales sur la transplantation rénale

1. La transplantation rénale

2. L'histologie rénale

3. Le rejet de greffon rénal

3.1 Le rôle du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

3.2 Le rejet hyper aigu

3.3 Le rejet aigu

4 Le diagnostic de rejet

5. Stratégies thérapeutiques du rejet aigu

5.1 Prévention du rejet

5.2 Le rejet aigu cellulaire

5.3 Le rejet aigu humoral

6. Mécanismes physiopathologiques de l'œdème au cours de l'inflammation

INTRODUCTION : hypothèses et objectifs

METHODOLOGIE

1. Type d'étude

2. Population

3. Échantillons biopsiques

4. Evaluation de la fonction rénale au diagnostic de rejet aigu et de la récupération fonctionnelle du greffon après le rejet aigu

5. Protocole et éthique

6. Analyse morphologique de l'œdème sur le tissu interstitiel rénal

7. Analyse informatique sur lames numérisées colorées au trichrome de Masson

7.1 Problématique

7.2 Numérisation et sélection des images

7.3 Segmentation avec le logiciel Ilastik©

7.3.1 Division de l'image en patches

7.3.2 Etape manuelle : annotation et apprentissage des régions analysées

7.3.3 Etape automatisée : utilisation de l'annotation d'images représentatives pour étendre les segmentations à d'autres images (*Batch Processing Mode*)

7.3.4 Correction et validation des segmentations

7.3.5 Calcul de la performance de segmentation et de quantification

8. Analyses statistiques

RESULTATS

1. Caractéristiques des patients et des greffons

2. Evaluation de l'impact pronostique de l'œdème

2.1 Variables quantitatives

2.2 Analyses univariées

2.3 Analyses multivariées : influence de l'œdème sur la fonction rénale lors du rejet aigu

2.4 Analyses multivariées : influence de l'œdème sur la récupération de la clairance à trois mois et douze mois

2.5 Analyses multivariées en sous-groupes : influence de l'œdème sur la fonction rénale et sa récupération à 3 mois et 12 mois selon le grade de rejet cellulaire

3. Analyse de la survie du greffon en fonction de l'œdème

4. Reproductibilité de l'analyse morphologique de l'œdème

5. Analyses informatiques de lames numérisées

5.1 Segmentation automatisée des images : quantification de la surface biopsique occupée par l'œdème

5.2 Comparaison de la segmentation avec les images annotées manuellement (performance de la segmentation automatique)

DISCUSSION

1. Étude de l'œdème au microscope optique

2. Limites de l'étude

3. L'œdème comme facteur de pronostic indépendant de la classification de Banff

4. L'œdème présent dans les rejets humoraux de mauvais pronostic

5. L'œdème prédictif de la résistance aux traitements de rejet

6. Etude morphométrique de l'œdème dans les biopsies rénales

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

LISTES DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

ANNEXES

RESUME

Introduction : Plusieurs études portant sur les greffons rénaux suggèrent que l'œdème serait un élément pronostique histologique péjoratif, toutefois sans en apporter la preuve statistique et la classification de Banff ne tient pas compte de l'œdème. Notre objectif principal était d'évaluer la valeur pronostique immédiate et à long terme de l'œdème du greffon lors d'un rejet aigu. Notre objectif secondaire était de mettre au point une méthode automatisée d'évaluation objective de l'œdème par analyse bio-informatique. **Matériels et méthodes :** Cette étude de cohorte, observationnelle, analytique, rétrospective et monocentrique a inclus les biopsies rénales avec rejet aigu diagnostiquées au Centre Hospitalier Universitaire d'Angers. L'évaluation semi-quantitative de l'intensité de l'œdème en trois groupes était réalisée au microscope par trois observateurs afin de rechercher un lien statistique entre l'œdème, la modification du débit de filtration glomérulaire et un éventuel retour en dialyse. Un logiciel de segmentation a été évalué sur sa fiabilité à reconnaître la matrice extracellulaire sur lames numérisées de tissu rénal. **Résultats :** De 2009 à 2018, quatre-vingt-quinze biopsies ont été incluses, quarante-et-une biopsies : groupe « sans œdème », quarante-deux biopsies : groupe « œdème faible ou modéré », douze biopsies : groupe « fort œdème ». En analyse univariée, l'évolution de la clairance rénale était défavorable ($p < 0,001$) et le risque de retour en dialyse était augmenté dans les groupes avec œdème (« faible à modéré » : HR=3,50 [1,14; 10.8], $p = 0,029$; « fort œdème » : HR=5,5 [1.61; 18.8] $p < 0,01$). L'intensité de l'œdème était aussi corrélée avec le grade et le type de rejet aigu, la présence d'anticorps anti-C4d, et l'inobservance. En analyses multivariées incluant ces facteurs, comparativement au groupe « sans œdème », il existait une corrélation négative entre présence d'un « fort œdème » et récupération de la clairance rénale après l'épisode de rejet aigu à 3 mois ($r = -0,430$ [-0,597; -0,263]; $p < 0,001$) et à 12 mois ($r = -0,557$ [-0,772; -0,341]; $p < 0,001$). Cette corrélation était également observée dans le groupe « œdème faible à modéré » ($p < 0,05$). Parallèlement, la

segmentation automatisée a été réalisée sur les biopsies avec fort œdème en utilisant des témoins sans œdème. Dix biopsies étaient exploitables. La segmentation avait une spécificité de 96%, une sensibilité de 59% et un F1 score de 0,67. **Conclusion :** L'intensité de l'œdème a un impact pronostique péjoratif sur la récupération de la clairance rénale après un rejet aigu, indépendamment du type et du grade de rejet. La segmentation automatisée de la matrice extracellulaire œdémateuse est possible mais nécessite un grand nombre de lames annotées pour augmenter la performance diagnostique.

PREAMBULE : connaissances générales sur la transplantation rénale

1. La transplantation rénale

La transplantation rénale est aujourd'hui le traitement de référence de l'insuffisance rénale terminale, qui, mieux que la dialyse, permet de réduire la morbidité et la mortalité des patients insuffisants rénaux (1). De plus en plus de patients sont candidats à la greffe en France (+ 29% entre 2011 et 2016, représentant 17 698 patients inscrits en 2016) et 3 615 transplantations rénales ont été réalisées en 2016 (2).

Les principales complications de l'allogreffe sont : le rejet de greffe (motivant un traitement immunosuppresseur au long cours), les complications cardio-vasculaires, les néoplasies malignes et les infections favorisées par l'immunosuppression médicamenteuse (3).

La survie moyenne des greffons a significativement augmenté depuis une vingtaine d'années avec des survies à 1 an passant de 83,7% à 92,6%, des survies à 5 ans de 68,2% à 80% et des survies à 10 ans de 52,3 à 59,6% entre les cohortes 1986-1990 et 2006-2008 (2).

2. L'histologie rénale

Le rein est entouré d'une capsule conjonctive associée à du tissu adipeux. Son parenchyme est composé de deux zones fonctionnelles : médullaire et corticale (**Figure 1**).

La région corticale, en dehors de la zone sous-capsulaire, contient les glomérules rénaux (corpuscules de Malpighi), entourés de nombreux tubes contournés distaux et proximaux. Chaque glomérule rénal est entouré d'une artère interlobulaire.

Le parenchyme médullaire, subdivisé en pyramides dites de Malpighi, est composé de tubes au diamètre varié.

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron constitué d'un glomérule, d'un tube contourné proximal et d'un tube contourné distal pénétrant dans la médullaire et se

prolongeant par une anse de Henlé et un tube collecteur. Le glomérule a pour fonction la filtration du sang et les tubes ont un rôle de modification de l'urine primitive par sécrétion et réabsorption.

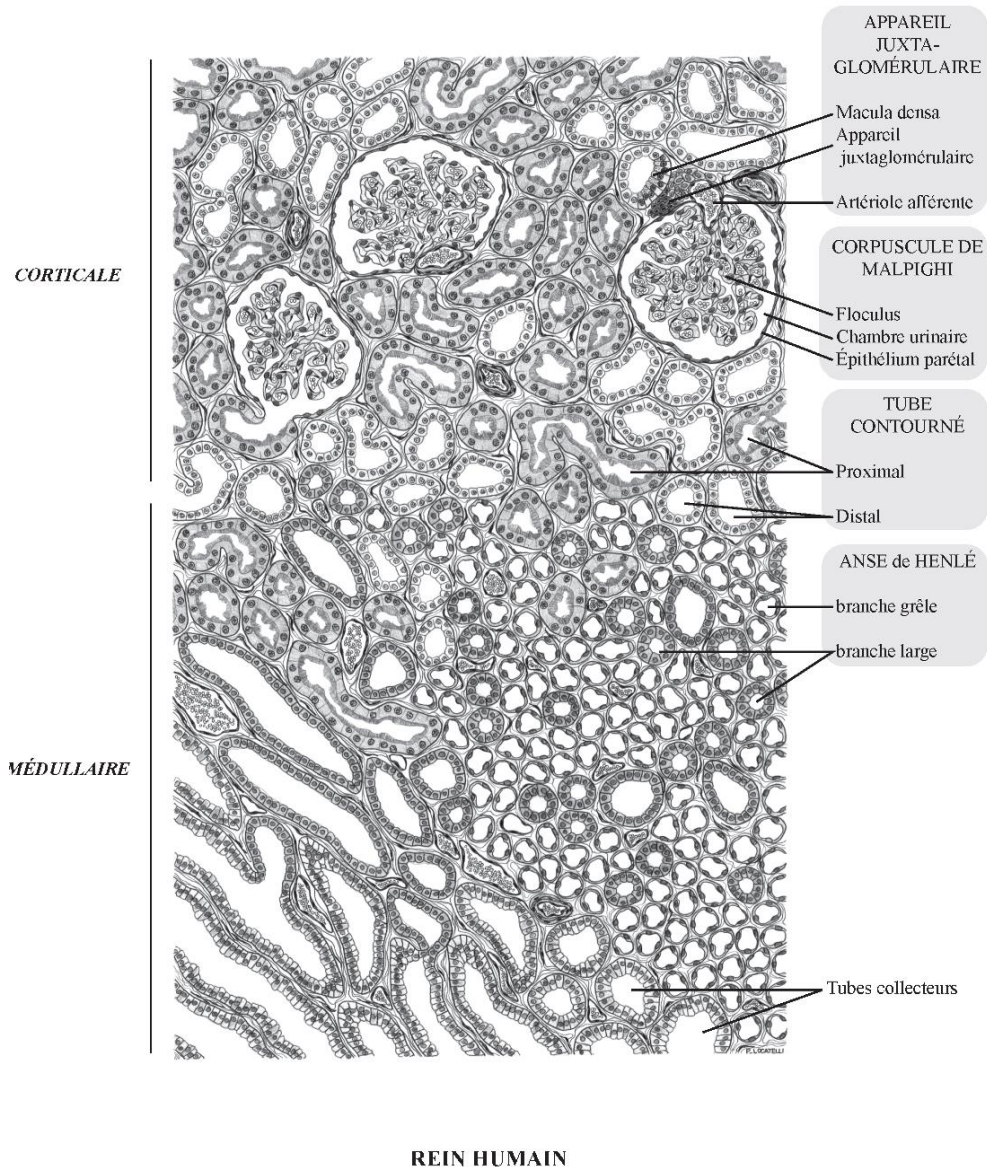


Figure 1 Histologie de la corticale et de la médullaire rénale (Ramirez et al, <https://doc-pedagogie.umontpellier.fr/medecine/histologieLV/index.php>)

3. Le rejet de greffon rénal

3.1 Le rôle du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Il existe deux classes de CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Les molécules du CMH de type 1 sont exprimées sur toutes les cellules nucléées de l'organisme sauf les cellules

germinales. Leur rôle est de présenter les peptides endogènes aux lymphocytes T CD8⁺. Les molécules du CMH de type 2 sont exprimées sur les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B activés) et interagissent préférentiellement avec les lymphocytes T CD4⁺ pour la reconnaissance des antigènes exogènes.

3.2 Le rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu survient dans les minutes suivant la revascularisation du greffon. Il est caractérisé par un thrombus se formant dans le hile rénal, responsable d'une nécrose ischémique du greffon. Il est dû à la présence chez le receveur d'anticorps anti-donneur préformés qui activent le complément (4). Il n'y a pas d'infiltration du greffon par des cellules immunitaires. Les cellules endothéliales stimulées vont sécréter le facteur de von Willebrand qui active l'hémostase primaire, entraîne l'adhésion et l'agrégation des plaquettes et génère la formation du thrombus (5). Les anticorps à l'origine de ce rejet sont soit innés, soit acquis lors de stimulations immunogènes comme les transfusions ou les grossesses, et reconnaissent les anticorps anti-HLA (*Human Leucocyte Antigens*) du CMH. Les tests de compatibilité, en amont de la transplantation, limitent ce type de rejet.

3.3 Le rejet aigu

Le rejet aigu concerne environ 15% des greffons à un an (6). Il apparaît dans les semaines ou mois post-greffe. Il est lié à une réaction du système immunitaire contre le greffon. Ce type de rejet nécessite une immunisation préalable, puis se produit en quelques jours. Il existe deux types de rejet aigu : le rejet cellulaire et le rejet humoral (7).

Le rejet cellulaire aigu est un mécanisme immunologique dépendant des lymphocytes T alors que le rejet humoral aigu est médié par les lymphocytes B.

Quatre phases sont classiquement identifiées dans la physiopathologie du rejet aigu : reconnaissance, activation, infiltration et destruction du greffon.

La phase de reconnaissance débute par l'alloréactivité directe, entraînant une activation des lymphocytes du receveur par les cellules dendritiques du donneur (allosensibilisation). En effet, le greffon contient des cellules dendritiques immatures sensibles, réagissant à l'environnement inflammatoire du parenchyme rénal du donneur. Cet environnement est notamment créé lors de la transplantation (temps d'ischémie, manipulation du greffon) et permet une maturation des cellules dendritiques du donneur. Ces cellules alors chargées de peptides allogéniques migrent vers les zones T des ganglions lymphatiques du receveur. Leur maturation entraîne l'expression de molécules du CMH : elles permettent l'activation des lymphocytes T alloréactifs.

Les cellules présentatrices d'antigènes du receveur s'infiltrant dans le greffon, attirées par l'inflammation puis migrent dans les ganglions lymphatiques. Enfin, des molécules solubles peuvent être transportées par voie sanguine vers les ganglions lymphatiques et reconnues par les cellules dendritiques du receveur. Les cellules dendritiques sont également le siège d'une reconnaissance alloréactive directe par les lymphocytes T CD8⁺ du receveur. Il existe ainsi plusieurs mécanismes possibles de reconnaissance allogénique et d'activation lymphocytaire du donneur par l'hôte.

Ces signaux d'activation lymphocytaire (liaison TCR-complexe CMH/peptide, signaux de différenciation fonctionnelle) entraînent **l'activation et la prolifération clonale de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ alloréactifs**. Les lymphocytes T auxiliaires activés se différencient et ont alors un profil cytokinique Th1. Ils produisent principalement de l'interféron gamma et de l'interleukine 2. Cette production cytokinique va entraîner l'amplification de la réponse alloréactive et l'activation de cellules effectrices comme les macrophages et les lymphocytes NK. Les lymphocytes B activés vont sécréter des anticorps dirigés contre les allo-antigènes du greffons (CMH du donneur).

Ces cellules effectrices alloréactives infiltreront le greffon. Elles vont migrer à travers l'endothélium des vaisseaux du greffon grâce à la sécrétion de chémokines et à l'expression de

molécules d'adhésion. Les cellules allogéniques du greffon sont lésées par les lymphocytes CD8⁺ du receveur qui, via la sécrétion de protéines cytotoxiques (perforines et granzymes) et la voie membranaire Fas/Fas ligand entraînent leur apoptose. L'environnement inflammatoire du greffon rénal est par ailleurs favorisé par les cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules effectrices. Cette inflammation entraîne des événements thrombotiques dans le greffon participant à terme à la **nécrose tissulaire et donc la destruction du rein greffé** (8).

Dans les rejets aigus cellulaires, des lymphocytes T sont retrouvés dans le tissu interstitiel, les tubes rénaux, parfois dans les artères et dans les glomérules. La tubulite, est caractéristique du rejet aigu cellulaire et se définit par l'infiltration de lymphocytes T et de macrophages dans la paroi tubulaire (9). Les lymphocytes T du receveur permettent la reconnaissance des allo-antigènes du donneur, synthétisés à partir des gènes du CMH (9) .

Les principales cellules dans l'interstitium rénal retrouvées quel que soit le type de rejet aigu sont des macrophages (38 à 60% en fonction de la sévérité) et des lymphocytes T (15 à 42%). Ces lymphocytes sont soit lymphocytes cytotoxiques CD8+, soit des lymphocytes CD4+ selon les études. Les lymphocytes B et NK sont présents mais en minorité (10-13).

4 Le diagnostic de rejet

L'évaluation du rejet aigu, subaigu et chronique se fait sur biopsie rénale avec la classification de Banff créée en 1991 et dernièrement révisée en 2017 (14). Elle intègre des critères gradés de façon semi-quantitative dans l'appréciation des lésions histologiques du greffon (glomérulite, infiltrat interstitiel, tubulite, artérite intinale, capillarite, glomérulopathie d'allogreffe, fibrose interstitielle, atrophie tubulaire, fibrose intinale, hyalinose artériolaire, augmentation du mésangium) (15) (**Tableau I**). La présence de la fraction du complément C4d sur les capillaires tubulaires définit le rejet humoral aigu (16). En 2013, cette classification a

intégré également des critères vasculaires pour les rejets humoraux (y compris C4d négatifs) et a défini la place de la biologie moléculaire (17). Elle permet ainsi de distinguer six classes diagnostiques :

- **Reins normaux**
- **Rejet à médiation humorale diagnostiqué avec :**
 - o Les lésions histologiques (Inflammation de la microcirculation)
 - Glomérulite ($g > 0$) en dehors d'une récurrence d'une glomérulonéphrite ou d'une glomérulopathie de novo
 - Et / ou d'une capillarite péritubulaire ($cpt > 0$)
 - Artérite intinale ou transmurale ($v > 0$)
 - o La présence d'anticorps spécifiques du donneur (DSA)
 - o L'interaction entre anticorps et endothélium
 - La présence de dépôt de C4d + (de façon linéaire) (C4d2 / C4d3 en IF, ou C4d positif en IHC sur paraffine)
 - Expression augmentée de transcrits de gènes associés au rejet humoral témoignant d'une activation endothéliale
 - o La présence d'une glomérulopathie d'allogreffe (rejet humoral chronique actif)
- **Lésions 'borderline' :** Tubulite (t1, t2 ou t3) avec infiltration interstitielle mineure (i0 ou i1) ou infiltration interstitielle modérée (i2 ou i3) avec légère tubulite (t1) en l'absence d'artérite intinale.
- **Rejet à médiation cellulaire**, classifié en fonction du grade :
 - o **Grade IA** : infiltration cellulaire significative (i2/i3) et tubulite modérée multifocale (t2)
 - o **Grade IB** : infiltration cellulaire significative (i2/i3) et tubulite sévère (t3)
 - o **Grade IIA** : infiltration cellulaire significative et artérite intinale (v1)
 - o **Grade IIB** : artérite intinale sévère (v2)
 - o **Grade III** : artérite transmurale ou nécrose fibrinoïde de la paroi musculaire (v3).
- **Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire sans orientation**
- **Autres** (infections, cristalopathies...)

Tableau I Classification de Banff: lésions élémentaires

Classification de Banff		
	Lésions aiguës	Lésions chroniques
Glomérule	Glomérulite (g)	Glomérulopathie allogreffe (cg) Hypertrophie mésangiale (mm)
Tubules	Tubulite (t)	Atrophie tubulaire (ct)
Interstitium	Infiltrat inflammatoire (i)	Fibrose interstitielle (ci)
Vaisseaux	Artérite intinale(v) Capillarite péritubulaire(cpt)(Banff 2005)	Artères : Endartérite fibreuse (cv) Hyalinose artériolaire (ah)

Score d'activité de 0 à 3

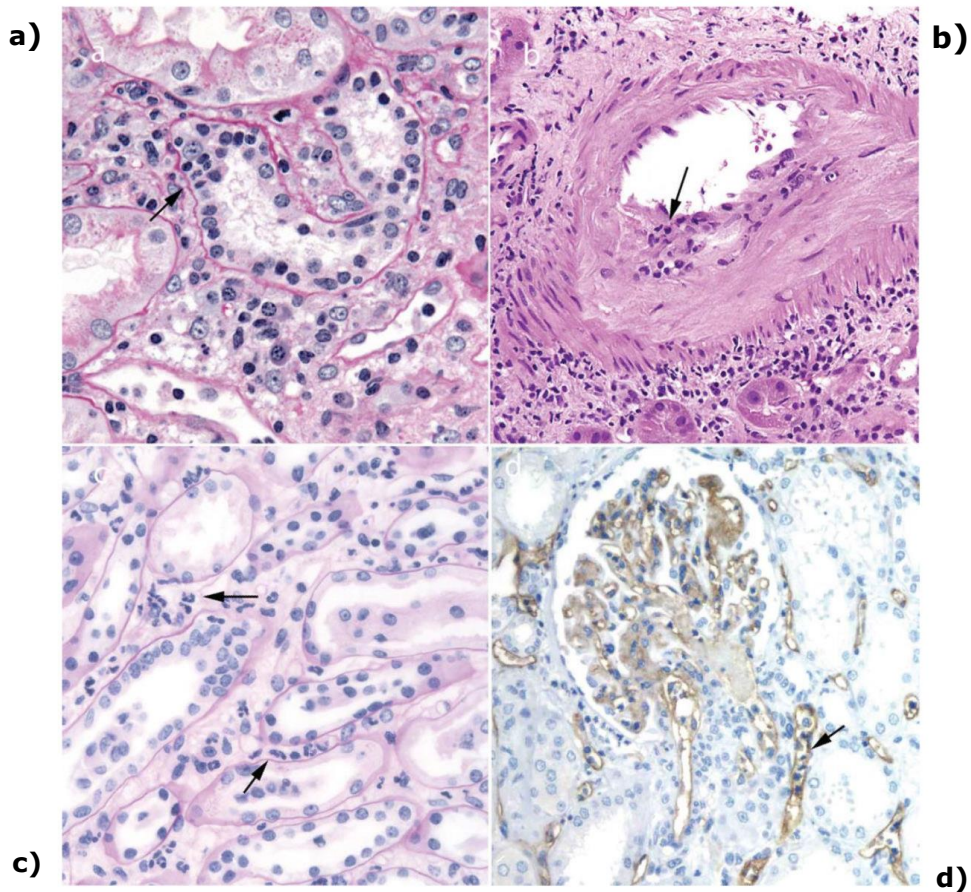


Figure 2 Lésions histologiques et immuno-histochimiques de rejet aigu (Williams et al. 2012).

- a) Lésions de tubulite (flèche) et infiltrat interstitiel
- b) Lésions de vascularite (flèche)
- c) Infiltrat de polynucléaires neutrophiles dans les capillaires péri-tubulaires
- d) Immunomarquage anti-C4d de la paroi de capillaires péri-tubulaires.

5. Stratégies thérapeutiques du rejet aigu

5.1 Prévention du rejet

La prévention du rejet repose sur l'appariement donneur/receveur et sur le risque immunologique du receveur. Il s'appuie sur un traitement d'induction (anticorps anti-lymphocyte et les anticorps monoclonaux anti-récepteur de l'interleukine 2) pour diminuer les risques de rejet dans les trois premiers mois suivant la transplantation. Puis, un traitement de maintenance immunosuppresseur est instauré. Il consiste en une trithérapie associant des stéroïdes à faible dose, un inhibiteur de la synthèse de l'ADN et immunosuppresseur de la famille des anti-calcineurines (ciclosporine ou tacrolimus). Les différents traitements immunosuppresseurs sont adaptés selon leurs effets pharmacocinétiques, leur efficacité et leurs éventuels effets secondaires (18).

5.2 Le rejet aigu cellulaire

Le principal traitement du rejet aigu cellulaire consiste en l'administration intra-veineux de fortes doses de stéroïdes, puis orale pendant quelques semaines. Dans les formes les plus sévères, en cas d'échec ou d'efficacité insuffisante (cortico-résistance), des anticorps anti-lymphocyte sont utilisés (18).

5.3 Le rejet aigu humoral

Le traitement du rejet humoral est moins codifié. Il associe l'administration de stéroïdes, d'immunoglobulines intra-veineuses, d'échanges plasmatiques et d'anticorps anti-CD20 (18).

6. Mécanismes physiopathologiques de l'œdème au cours de l'inflammation

L'inflammation est la réaction locale d'un tissu vascularisé à une agression. Elle débute par une réaction vasculo-exsudative et est généralement suivie du processus de réparation. Cette réaction physiologique peut être nocive notamment dans les maladies auto-immunes ou au cours des greffes. La réponse inflammatoire vasculaire et cellulaire est due à des médiateurs chimiques libérés sous l'effet du stimulus déclenchant l'inflammation.

Le siège de l'inflammation est le tissu conjonctif vascularisé. Les premières étapes de l'inflammation aiguë sont une modification du flux et du calibre vasculaire, une augmentation de la perméabilité vasculaire, puis la diapédèse leucocytaire. Le passage du sérum et des protéines plasmatiques à travers l'endothélium vers le tissu interstitiel résulte d'une altération de la perméabilité des capillaires du territoire lésé et constitue l'exsudat ou œdème inflammatoire. Il s'oppose au transsudat, extravasation de liquide pauvre en protéines due à un déséquilibre de la pression hydrostatique sur l'endothélium vasculaire. L'œdème résultant d'un transsudat ou d'un exsudat, est donc un épanchement liquidien anormal dans l'interstitium.

La modification du flux du calibre vasculaire commence par une vasoconstriction transitoire des artéioles suivie d'une vasodilatation. Le ralentissement du flux vasculaire et l'augmentation de la perméabilité vasculaire ont pour conséquence l'exsudat. Il est rapidement suivi de la diapédèse leucocytaire permettant la migration des leucocytes sanguins dans le tissu interstitiel. La fuite plasmatique vers l'interstitium est entretenue par une diminution de la pression osmotique intravasculaire, accompagnée d'une augmentation de la pression osmotique dans le tissu interstitiel sans retour veineux capillaire possible (19).

Plusieurs études suggèrent que la présence d'un œdème dans le greffon rénal pourrait être un autre élément pronostique histologique péjoratif, non évalué dans la classification de Banff. Cependant, les données de la littérature n'en apportent pas une preuve statistique

formelle (20–23). De plus, l'évaluation histologique de l'œdème est relativement subjective, donc soumise à une variabilité inter observateur.

INTRODUCTION : HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Au cours de la surveillance des patients transplantés, une biopsie du greffon rénal est indiquée en cas d'altération inexpiquée de la fonction rénale, d'apparition ou d'aggravation d'une protéinurie. Le diagnostic de rejet aigu est porté par l'examen de la biopsie du greffon à l'aide des critères de la classification de Banff (14). Il existe cependant des discordances entre l'évolution clinico-biologique de certains patients et les données histopathologiques de la biopsie du greffon rénal.

Nous avons étudié la présence et l'intensité d'un œdème dans des biopsies de greffons rénaux atteints d'un rejet aigu. L'objectif principal était d'estimer s'il existait une corrélation entre l'évaluation microscopique semi-quantitative de l'œdème et la sévérité du rejet selon la classification de Banff et si un œdème important était porteur d'un impact pronostique en recueillant le devenir des patients.

L'objectif secondaire était la mise au point et l'évaluation d'une méthode de reconnaissance de l'œdème par analyse automatisée. Le but était de créer un outil de quantification objective de l'œdème sur biopsies.

METHODOLOGIE

1. Type d'étude

Il s'agissait d'une étude de cohorte, observationnelle, analytique, rétrospective et monocentrique.

2. Population

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

Patients de plus de 18 ans, pris en charge dans le service de Néphrologie du Centre Hospitalier et Universitaire d'Angers, pour lesquels un diagnostic de rejet aigu humoral ou cellulaire a été porté sur biopsies rénales, sur la période de 2009-2018. Les inclusions se basaient sur une recherche par la codification ADICAP (Association pour le Développement de l'Informatique en Cytologie et Anatomo-Pathologie) dans le système informatique du Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire du CHU d'Angers, soit une inclusion sur les biopsies codées en :

- « Transplantation : rejet aigu » (ADICAP N°9634)
- « Transplantation : rejet aigu léger » (ADICAP N°9635)
- « Transplantation : rejet aigu modéré » (ADICAP N°9636)
- « Transplantation : rejet aigu sévère » (ADICAP N°9637)

3. Échantillons biopsiques

Le tissu de la biopsie de greffon rénal était adressé fixé dans une solution d'alcool, de formol et d'acide acétique. Après 1h30, ce tissu était ensuite, pendant 6 à 12 h, mis dans une solution aqueuse tamponnée de formol à 4% afin d'achever le processus de fixation, avant l'inclusion en paraffine. Des coupes de 3µm du bloc de paraffine étaient réalisées pour chacune

des colorations suivantes : HPS (Hématoxyline, Phloxine, Safran), coloration argentique de Jones, Trichrome de Masson, PAS (Periodic Acid Schiff).

Un autre fragment de tissu était conjointement adressé à l'état frais afin d'être congelé dans de l'azote liquide à -196°C. Une immunofluorescence directe était systématiquement réalisée sur coupes congelées avec les anticorps anti- IgA, IgG, IgM, C3, C1q, fibrinogène et l'anti-C4d.

Ces techniques permettaient l'interprétation morphologique des biopsies grâce aux critères de la classification de Banff et un diagnostic histologique final de rejet.

4. Evaluation de la fonction rénale au diagnostic de rejet aigu et de la récupération fonctionnelle du greffon après le rejet aigu

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) était calculé à partir de l'estimation de la fonction rénale par la formule MDRD à partir de la créatininémie.

Pour évaluer le retentissement du rejet sur la fonction rénale au moment de la biopsie, nous avons utilisé le rapport entre le DFG au moment du rejet (M0) et le DFG de base avant le rejet aigu ("Nadir"). La créatininémie de base était obtenue soit à partir d'un compte rendu médical soit à partir des créatininémies moyennes avant l'épisode de rejet aigu.

La récupération de la clairance rénale après l'épisode de rejet aigu a été évaluée avec le rapport entre le DFG à 3 mois (M3) sur le DFG de base avant le rejet aigu, puis avec le rapport entre le DFG à 12 mois (M12) après l'épisode de rejet aigu sur DFG de base avant le rejet aigu.

5. Protocole et éthique

Les données cliniques, paracliniques et anatomopathologiques étaient recueillies chez des patients greffés rénaux, pour lesquels un rejet aigu était suspecté. L'étude a été validée par le comité d'éthique du CHU d'Angers (numéro 2020/85).

Les données cliniques et biologiques disponibles dans le suivi post-biopsie étaient recueillies dans le dossier médical : traitement du rejet aigu, taux de créatinine sérique, débit de filtration glomérulaire, délai avant dialyse.

6. Analyse morphologique de l'œdème sur le tissu interstitiel rénal

L'étude microscopique était réalisée avec la coloration par le trichrome de Masson sur les zones corticales rénales. Trois observateurs indépendants ont participé à l'étude : un évaluateur junior, un évaluateur sénior non spécialiste en néphropathologie, un évaluateur sénior néphropathologiste.

Un œdème était considéré comme présent quand la matrice extracellulaire du cortex (colorée en bleu par le Trichrome de Masson) apparaissait pâle, moins colorée que la matrice extracellulaire de la médullaire et avec un espacement accentué entre les tubes. L'œdème pouvait être focal ou diffus (donnée non prise en compte dans le classement final), avec ou sans leucocytes interstitiels. Les zones médullaires et sous-capsulaires étaient exclues de l'analyse. Chaque observateur évaluait l'œdème de façon semi-quantitative en trois groupes :

- Absence d'œdème : cotation 0
- Présence d'œdème léger à modéré : cotation 1 (**Figure 3**)
- Présence d'œdème fort : cotation 2 (**Figure 4**)

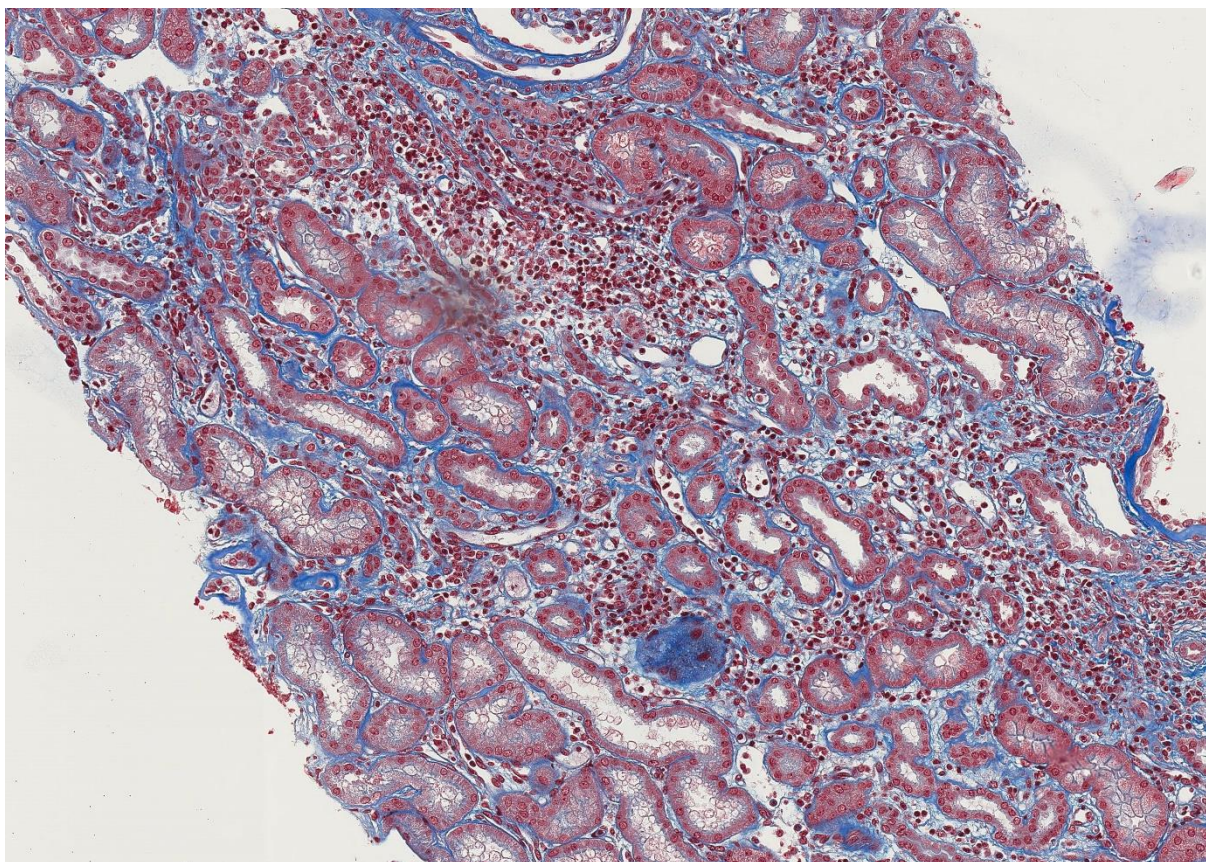


Figure 3 Exemple d'un œdème faible à modéré (cotation 1 (X100))

En cas de diagnostic discordant entre les trois observateurs, le grade final retenu était celui du pathologiste expert. Les cas ambigus avec un œdème fort étaient relus au microscope multi-tête par les trois pathologistes pour un diagnostic de consensus.

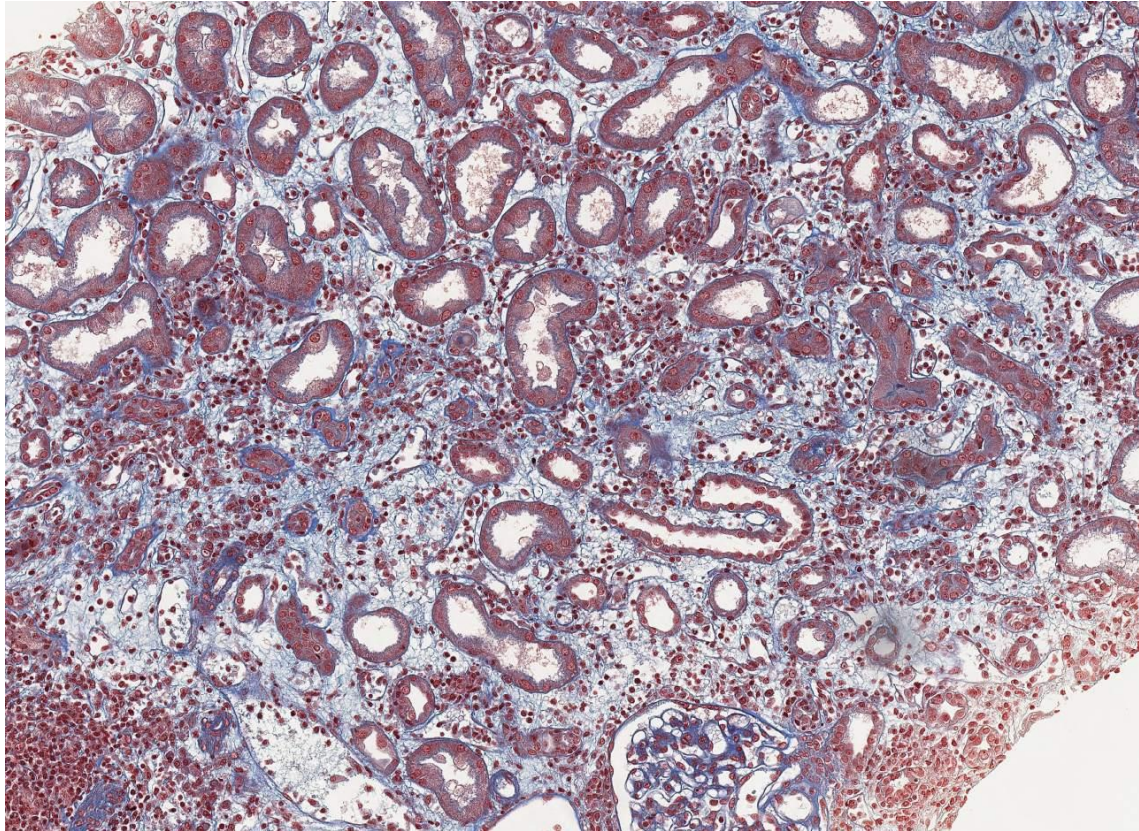


Figure 4 Exemple d'une biopsie avec fort œdème (cotation 2) (X100)

7. Analyse informatique sur lames numérisées colorées au trichrome de Masson

7.1 Problématique

Pour l'analyse informatique à partir de lames numérisées des biopsies rénales, il fallait définir des surfaces d'intérêt, et ensuite enseigner à un logiciel une méthode afin qu'il segmente automatiquement ces zones d'intérêt pour n'importe quelle lame à analyser.

7.2 Numérisation et sélection des images

Pour chaque biopsie de greffon, était sélectionnée par le pathologiste junior la coupe colorée au Trichrome de Masson présentant la meilleure qualité (bon contraste des couleurs, peu ou pas d'artéfacts liés à la coupe). La coupe de chaque greffon ainsi choisie était numérisée à l'objectif X40 par un scanner Aperio C52 Leica® (Leica Biosystems®, Wetzlar, Allemagne), avec une résolution par pixel de 0,252 μm . Puis avec le logiciel *Aperio Imagescope*, deux zones

représentatives de matrice extracellulaire œdémateuse ou normale dans la corticale de chaque biopsie étaient sélectionnées à l'objectif X10 et enregistrées au format JPEG et Tiff pour l'analyse informatique.

7.3 Segmentation avec le logiciel Ilastik©

Les surfaces à objectiver par le logiciel étaient :

- La surface totale du tissu rénal sur les images (distinction du tissu par rapport à la surface optiquement vide) : permettant de définir la surface biopsique totale.
- La surface des glomérules, tubules, vaisseaux et cellules inflammatoires
- La surface de la matrice extracellulaire

L'étude a été menée en partenariat avec les chercheurs du Laboratoire Angevin de Recherche en Ingénierie des Systèmes (LARIS) (Pr David Rousseau et M. Ali Ahmad), Pôle MathSTIC, Université d'Angers.

La segmentation des régions rénales dans les images numérisées reposait sur deux étapes, après adaptation de la taille de l'image :

- ➔ **1. Etape manuelle** : annotation des régions sur les images par le pathologiste junior (considéré « expert » par rapport à l'ordinateur) afin de faire la classification de chaque pixel dans l'une des trois régions prédéfinies (types de surface) et de créer une collection d'images de référence.
- ➔ **2. Etape automatisée** : reconnaissance et segmentation des différentes régions des images en utilisant Ilastik© (*Interactive learning and segmentation toolkit* Heidelberg Collaboratory for Image Processing, Université de Heidelberg, Allemagne) : ce logiciel s'inspire des données collectées sur les lames segmentées manuellement, par extrapolation (principe du « machine-learning »).

Les différentes étapes aboutissant à une segmentation automatisée des images sont résumées dans les paragraphes suivants et dans la **figure 8**.

7.3.1 Division de l'image en patches

La résolution des images sélectionnées était trop volumineuse pour le logiciel Ilastik© et la puissance de l'ordinateur utilisé (résolution des images à 4280 x 3056 pixels). Pour faciliter l'analyse informatique, chaque image était divisée en soixante patches d'une résolution de 500 x 500 pixels (**Figure 5**).

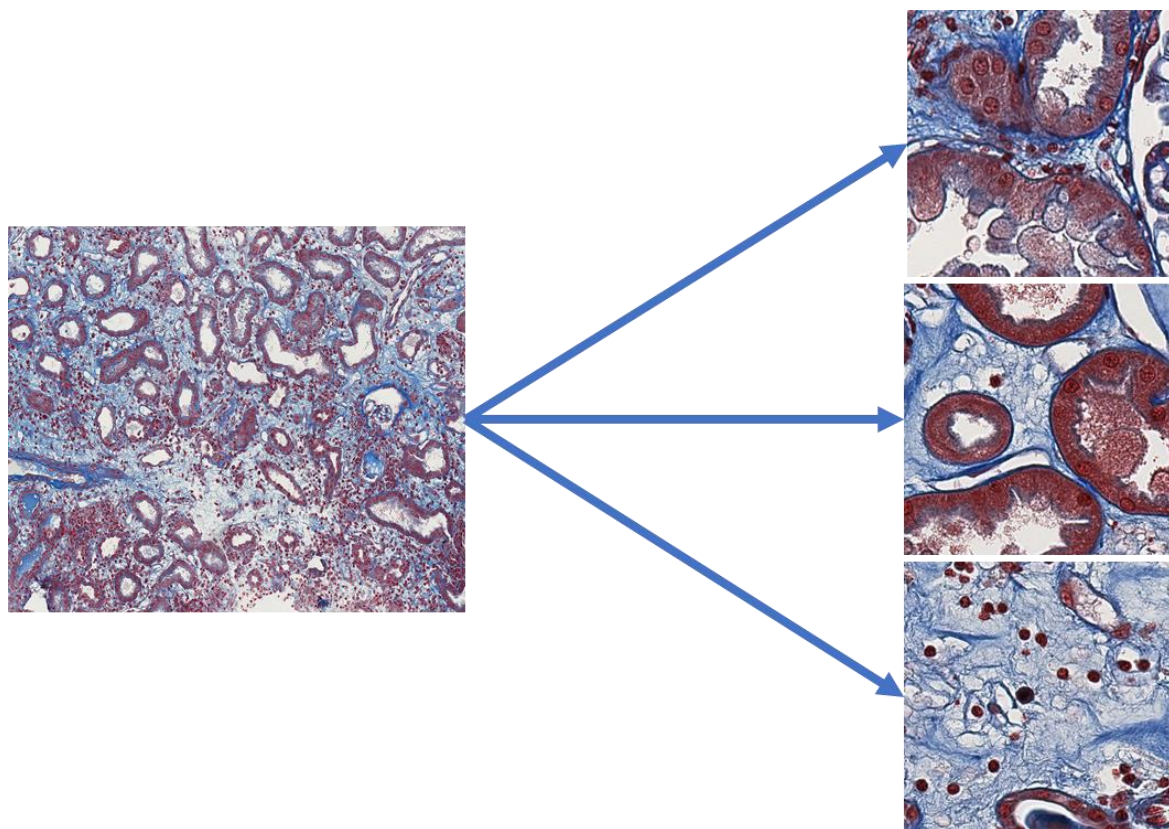


Figure 5 Division de l'image initiale en patches de 500 x 500 pixels

7.3.2 Etape manuelle : annotation et apprentissage des régions analysées

Le logiciel Ilastik© applique une extraction de caractéristiques des pixels de l'image, par la méthode de « forêt randomisée d'arbres décisionnels » (*voir explication en annexe*). Les caractéristiques de couleurs, textures, contours des structures (**Figure 6**) étaient déterminées sur plusieurs filtres (sept dimensions de filtres de 0,3 à 10). Trente-sept filtres étaient ainsi utilisés pour la segmentation.

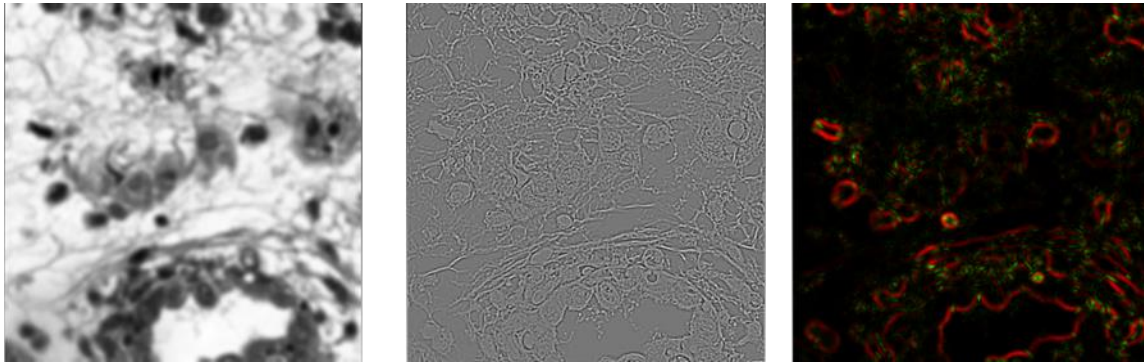


Figure 6 Exemples de filtres appliqués à la segmentation : a) couleurs ; b) contours ; c) texture

Dix patches étaient sélectionnés pour un premier apprentissage. Les images étaient annotées en fonction de la structure histologique correspondante par l'expert, permettant une segmentation sémantique (**Figure 7**). Deux groupes étaient ainsi définis :

- un groupe des structures histologiques regroupant les glomérules, les tubules, les vaisseaux associés aux cellules inflammatoires.
- un groupe de la matrice extracellulaire, incluant la matrice normale, l'œdème et la fibrose.

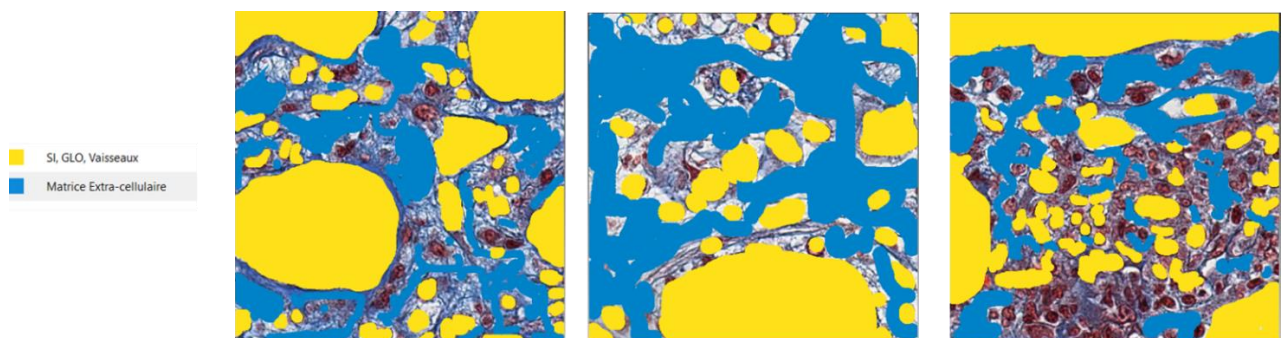


Figure 7 Annotation manuelle des structures rénales. En jaune : le groupe des structures rénales et de l'infiltrat inflammatoire ; en bleu le groupe matrice extracellulaire.

7.3.3 Etape automatisée : utilisation de l'annotation d'images représentatives pour étendre les segmentations à d'autres images (*Batch Processing Mode*)

Afin d'éviter l'annotation de chaque image, le *batch processing* dans le logiciel Ilastik© permettait de faire la segmentation sur une série d'images au grossissement X100 à partir de l'annotation d'un échantillon de patches représentatifs du tissu rénal.

7.3.4 Correction et validation des segmentations

Plusieurs segmentations manuelles par l'expert étaient ensuite réalisées afin de corriger les images après chaque étape de *batch processing* jusqu'à obtenir une segmentation automatisée satisfaisante.

7.3.5 Calcul de la performance de segmentation et de quantification

Afin d'évaluer la qualité et la performance de la segmentation, les patches étaient analysés et comparés à des images au préalable annotées par l'expert mais différentes des images annotées lors des segmentations initiales. Les données étaient comparées selon les critères suivants : la sensibilité, la spécificité, le F1 score.

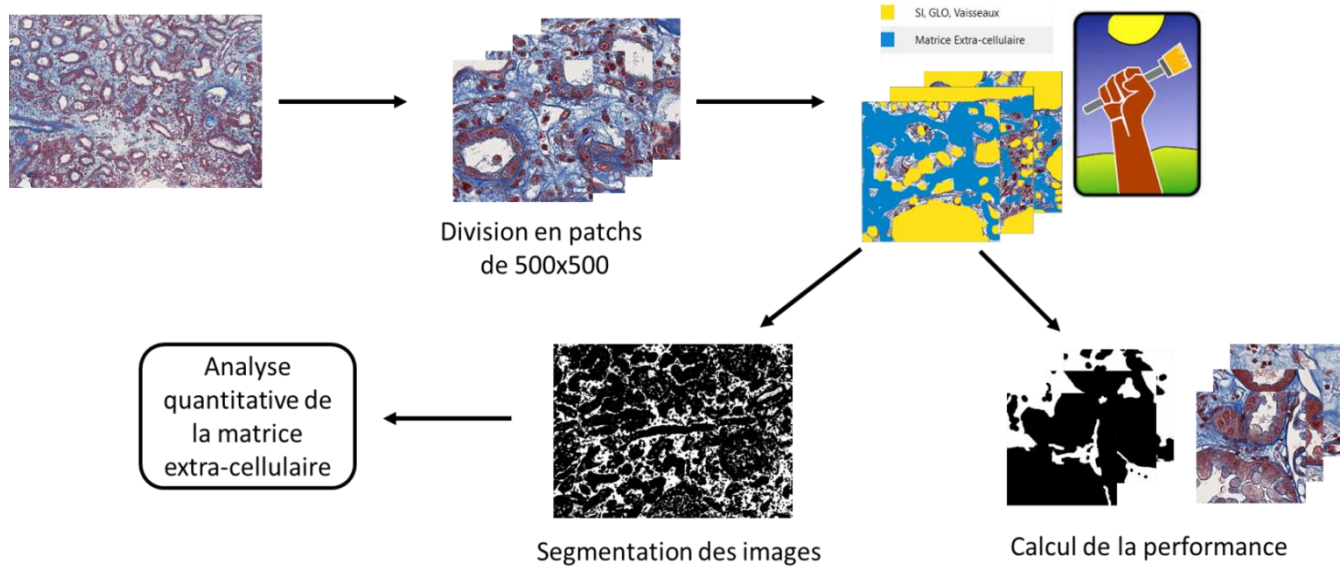


Figure 8 Schéma global de la segmentation et d'analyse des images

8. Analyses statistiques

Le logiciel Excel© (version 2019) et le logiciel Pvalue.io ont été utilisés pour les différentes analyses statistiques (24). Pour déterminer les facteurs prédictifs de l'œdème, nous avons effectué une analyse univariée en utilisant le test de Kruskal-Wallis ou le test exact de Fisher avant de réaliser une analyse multivariée avec une régression logistique. Les variables ayant un degré de signification inférieur à 0,15 dans l'analyse univariée ont été incluses dans le modèle multivarié en utilisant la méthode pas à pas. Un $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

Les variables présentant plus de 20% de données manquantes n'ont pas été introduites dans le modèle : si une variable comportait moins de 5% de données manquantes, nous avons réalisé une imputation par la médiane pour les variables quantitatives, et par le mode pour les variables qualitatives. Si une variable présentait entre 5% et 20% de données manquantes, une imputation multiple par équations de chaînes (MICE) a été réalisée.

L'analyse de survie a été réalisée avec un modèle de Cox univarié.

La fiabilité a été évaluée en utilisant le kappa de Fleiss avec un intervalle de confiance (IC) à 95% avec le logiciel Excel© sous Windows©. Les valeurs Kappa de 0,81 à 1,0 représentent un accord presque parfait, les valeurs entre 0,61 et 0,80 représentent un accord substantiel, 0,41-0,60 accord modéré, 0,21-0,40 accord juste, 0,01-0,20 accord léger et celles inférieures à 0 indiquent un accord médiocre (25).

RESULTATS

1. Caractéristiques des patients et des greffons

Entre le 1^{er} janvier 2009 et le 31 décembre 2018, 594 biopsies de greffon ont été analysées au CHU d'Angers. Parmi ces biopsies, 169 diagnostics ont été codés selon l'ADICAP en rejet aigu. Trente biopsies n'ont pu être revues (adressées à d'autres CHU, ou lames non retrouvées dans les archives et matériel résiduel insuffisant dans le bloc de paraffine). Quarante-quatre biopsies ont été exclues pour diverses raisons expliquées dans le diagramme de flux de l'étude (**Figure 9**). Quatre-vingt-quinze biopsies chez 73 patients ont finalement été analysées dans notre étude.

Le **tableau II** présente les caractéristiques cliniques des 73 patients et les caractéristiques des rejets aigus. Parmi les 95 biopsies, 54 présentaient un œdème : 42 avec un œdème faible à modéré (cotation 1) et 12 avec un œdème fort (cotation 2).

Le **tableau III** présente les caractéristiques des dix patients avec un œdème fort. Ce groupe comportait six femmes (patientes n°1 à n°6) et quatre hommes (patients n°7 à n°10). La patiente n°6 a eu trois biopsies successives avec un œdème fort pour deux épisodes de rejet aigu. Tous les patients présentaient un rejet aigu cellulaire. Aucun patient n'a présenté de toxicité aux anti-calcineurines.

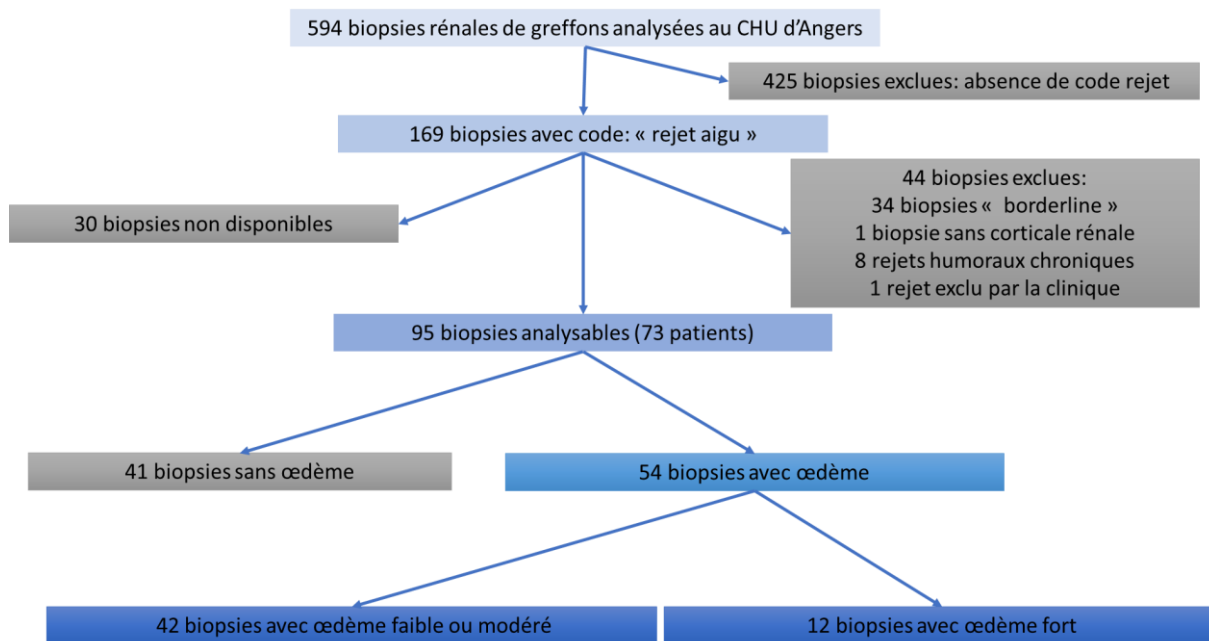


Figure 9 Diagramme de flux

Tableau II Caractéristiques anatomocliniques des patients

Nombre de biopsies	95
Nombre de patients	73
Sexe (H/F)	46/27
Age moyen (années)	43,8 (+/-15,0)
Nombre de biopsie(s) par patient n (%)	
1	55 (75,3)
2	14 (19,2)
3	4 (5,5)
Néphropathie initiale n (%)	
PKAD	8 (8,4)
Néphropathie à IgA	16 (16,8)
Autres GN primitives	12 (12,6)
Néphropathie secondaire	21 (22,1)
Néphropathie interstitielle/uropathie	23 (24,2)
Néphroangiosclérose	4 (4,2)
Néphropathie indéterminée	8 (8,4)
Autres	3 (3,3)
Caractéristiques des rejets aigus	
Délai moyen (mois)	29,6 (+/-38.9)
Type de rejet, n (%)	
Cellulaire	67 (70,5)
Humoral	12 (12,6)
Mixte	16 (16,9)
Classification des rejets aigus à médiation cellulaire n=67	
Grade Ia	36 (53,7)
Grade Ib	25 (37,3)
Grade IIa	3 (4,5)
Grade IIb	2 (3,0)
Grade III	1 (1,5)
Classification des rejets aigus à médiation humorale n=12	
DSA	8 (66,7)
Anti C4d	10 (88,3)
Classification des rejets aigus à médiation mixte n=16	
Grade Ia	6 (37,5)
Grade Ib	6 (37,5)
Grade IIa	4 (25,0)
Grade IIb	0 (0,0)
Grade III	0 (0,0)
DSA	11 (68,8)
Anti C4d	11 (68,8)
Facteurs associés	
Néphropathie à BK	5 (5,3)
Inobservance	4 (4,2)
Toxicité des anti-calcineurines	3 (3,6)
Traitements du rejet aigu n (%)	
Corticoïdes	91 (95,8)
Majoration du traitement de fond	34 (35,8)
Immunoglobulines	25 (26,3)
Thymoglobuline	10 (10,5)
Rituximab	4 (4,2)
Photochimiothérapie extracorporelle	10 (10,5)
Echanges plasmatiques	20 (21,0)

PKAD : polykystose autosomique dominante; GN, glomérulonéphrite.

Tableau III Caractéristiques anatomocliniques des 10 patients avec fort œdème.

B.	P.	Age	Délai entre biopsie et greffe	Grade rejet cellulaire	Rejet humoral	IF anti-C4d	DSA	Pathologie initiale	Transplantation antérieure	Néphropathie à BK	Inobservance	Délai avant retour en dialyse (en mois)
1	1	46	14.8	IIa	+	+	+	NL	-	+	-	5.9
2	2	24	5.1	Ia	-	-	-	HSF	+	-	-	61.2
3	3	33	68.2	Ib	-	-	-	PR	-	-	-	7.9
4	4	58	5.5	Ib	-	-	-	PKAD	-	+	-	NA
5	5	69	73.4	Ib	-	-	-	ND	-	-	-	14.4
6	6	19	38.7	Ib	+	+	+	NTIC	+	-	-	51.8
7	2	29	65.6	IIb	-	-	-	HSF	+	-	-	1.5
8	2	29	66.6	Ia	-	-	-	HSF	+	-	-	0.5
9	7	55	42.7	IIa	+	-	-	ND	+	-	-	NA
10	8	37	30.4	Ib	+	+	+	HSF	-	-	+	14.2
11	9	56	43.3	Ib	-	-	-	NTIC	-	-	-	NA
12	10	26	53.5	Ib	+	+	+	HSF	-	-	+	0.4

B. : numéro de la biopsie ; P. : numéro du patient ; PKAD : Polykystose rénale autosomique dominante ; HSF : Hyalinose segmentaire et focale ; NL : Néphropathie lupique ; NTIC : Néphropathie tubulo-interstitielle chronique ; ND : Néphropathie diabétique ; PR : Purpura rhumatoïde ; NA : absence de retour en dialyse

2. Evaluation de l'impact pronostique de l'œdème

2.1 Variables quantitatives

- Evaluation du retentissement immédiat du rejet aigu sur la fonction rénale :

La moyenne du rapport entre le débit de filtration glomérulaire (DFG) au moment du rejet (M0) sur le DFG avant le rejet aigu ("Nadir") était de 0,607 (+/- 0,203) (**Tableau IV**). Cinq biopsies (deux « sans œdème » et trois avec « œdème modéré ») n'ont pas été incluses dans le calcul du rapport : il s'agissait de biopsies réalisées après un rejet de moins de 7 jours après la greffe, la créatininémie et le DFG n'étaient pas disponibles.

- Evaluation de la récupération de la clairance rénale à 3 mois et à 6 mois de l'épisode aigu :

La moyenne du rapport entre le DFG avant le rejet aigu et le DFG après l'épisode de rejet aigu était de 0,736 (+/- 0,272) à trois mois et 0,688 (+/- 0,334) à douze mois. A 3 mois, sept cas n'ont pas pu être inclus dans le calcul (absence de créatininémie de base pour cinq patients, un patient était décédé et un patient ne présentait pas de données). A 12 mois, quatorze cas n'ont pas été inclus (absence de créatininémie de base pour cinq patients, cinq patients étaient décédés et trois patients ne présentaient pas de données).

Tableau IV Rapport moyen entre le DFG au moment de la biopsie, à 3 mois, à 12 mois et le DFG de base.

	moyenne (écart-type)	médiane [Q25-75]	min	max	n
DFG M0/ DFG de Base	0,607 (0.203)	0,625 [0,464; 0,721]	0,0739	1,19	90
DFG M3/DFG de base	0,736 (0,272)	0,765 [0,570; 0,910]	0,0388	1,42	88
DFG M12/DFG de base	0,688 (0,334)	0.732 [0,466; 0,928]	0,0388	1,64	81

DFG : débit de filtration glomérulaire ; M3 : 3 mois ; M12 : 12 mois

2.2 Analyses univariées

Tableau V Analyses univariées.

		œdème cotation 0 (n = 41)	œdème cotation 1 (n = 42)	œdème cotation 2 (n = 12)	n	p
Délai moyen biopsie/greffe (mois)		19,6 (±41,3)	35,7 (±38,2)	42,3 (±24,4)	95	<0,01
DFG M0/DFG de base, moyenne		0,694 (±0,153)	0,600 (±0,193)	0,349 (±0,155)	90	<0,001
DFG M3/DFG de base, moyenne		0,889 (±0,184)	0,680 (±0,241)	0,444 (±0,301)	88	<0,001
DFG M12/DFG de base, moyenne		0,871 (±0,210)	0,621 (±0,322)	0,289 (±0,311)	81	<0,001
DSA, n	0	36 (88%)	29 (69%)	8 (67%)	73	0,079
	1	5 (12%)	13 (31%)	4 (33%)	22	-
Grade rejet cellulaire, n	Ia	25 (66%)	15 (45%)	2 (17%)	42	<0,01
	Ib	8 (21%)	16 (48%)	7 (58%)	31	-
	II/III	5 (13%)	2 (6.1%)	3 (25%)	10	-
IF anti-C4d, n	0	37 (90%)	29 (69%)	8 (67%)	74	0,031
	1	4 (9.8%)	13 (31%)	4 (33%)	21	-
Inobservance, n	0	41 (100%)	40 (95%)	10 (83%)	91	0,041
	1	0 (0%)	2 (4.8%)	2 (17%)	4	-
Retour en dialyse dans les deux ans, n	0	40 (98%)	34 (81%)	5 (42%)	79	<0,001
	1	1 (2.4%)	8 (19%)	7 (58%)	16	-
Sexe, n	M	28 (68%)	29 (69%)	4 (33%)	61	0,067
	F	13 (32%)	13 (31%)	8 (67%)	34	-
Transplantation antérieure, n	0	34 (83%)	35 (83%)	7 (58%)	76	0,16
	1	7 (17%)	7 (17%)	5 (42%)	19	-
Type rejet, n	Cellulaire	35 (85%)	25 (60%)	7 (58%)	67	<0,01
	Mixte	3 (7.3%)	8 (19%)	5 (42%)	16	-
	Humoral	3 (7.3%)	9 (21%)	0 (0%)	12	-

0 : absence ; 1 : présent ; DSA : antigène spécifique du donneur ; IF : immunofluorescence ; M0 : 0 mois ; M3 : 3 mois ; M12 : 12 mois.

En analyse univariée, les rejets aigus avec un œdème de cotation 1 ou 2 étaient significativement plus tardifs que les rejets aigus sans œdème (19,6 mois (±41,3) vs 35,7 mois (±38.2) et 42,3 mois (±24,4) ; $p < 0,01$) (**Tableau V**).

Selon l'intensité de l'œdème, il y avait une différence significative sur le retentissement du rejet sur la fonction rénale ($p < 0,01$), et sur la récupération de la clairance rénale à 3 et 12 mois ($p < 0,001$). De même, le type de rejet aigu ($p < 0,01$), le grade de rejet aigu cellulaire ($p < 0,01$), la présence de l'anticorps anti-C4d ($p = 0,031$), l'inobservance ($p = 0,041$) et le retour en dialyse dans les deux ans ($p < 0,001$) étaient significativement différents en fonction de l'intensité de l'œdème.

L'intensité de l'œdème n'était pas corrélée à la présence d'une néphropathie à BK ni à une toxicité aux anti-calcineurines ($p = 0,19$; $p = 0,35$).

2.3 Analyses multivariées : influence de l'œdème sur la fonction rénale lors du rejet aigu

Dans la suite des résultats, la donnée nommée « intensité du rejet » décrit l'intensité de la détérioration de la fonction rénale. Au risque alpha 5%, en ajustant sur les données suivantes : transplantation antérieure, sexe, inobservance et type de rejet, il existait une relation statistiquement significative entre l'intensité du rejet et la cotation de l'œdème ($p < 0,001$) (**Tableau VI**).

En outre, comparativement au groupe « sans œdème » (cotation 0) :

- Il existait une corrélation entre l'intensité du rejet aigu et la présence d'un « œdème faible à modéré » (cotation 1) ($r = -0,110$; $p = 0,011$).
- Il existait une corrélation entre l'intensité du rejet aigu et la présence d'un « œdème fort » (cotation 2) ($r = -0,317$; $p < 0,001$).

Cette corrélation est négative car l'intensité du rejet est d'autant plus fort que le ratio des DFG est faible.

-Il existait une corrélation entre de l'intensité du rejet aigu et type de rejet. Le rejet humoral est associé à un rejet aigu plus intense ($r=0,137$; $p = 0.018$).

En revanche, il n'existait pas de différence statistiquement significative de l'intensité du rejet selon l'inobservance ($p=0,42$), le sexe ($p=0,53$) et une transplantation antérieure ($p=0,97$).

La positivité des DSA et de l'anticorps anti-C4d n'a pas servi de variable d'ajustement du fait d'une multicolinéarité (variables de prévision du modèle de régression linéaire mesurant le même phénomène) avec le rejet aigu humoral ou mixte.

Tableau VI Analyse de la régression linéaire multiple sur le retentissement immédiat du rejet aigu sur la fonction rénale selon l'œdème, le sexe, la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.

		Coefficients	p	p global
Œdème (cotation)	1 vs 0	-0,110 [-0,193; -0,0260]	0,011	<0,001
	2 vs 0	-0,317 [-0,444; -0,190]	<0,001	-
Inobservance	1 vs 0	-0,0750 [-0,258; 0,108]	0,42	0,42
Sexe	F vs M	-0,0245 [-0,102; 0,0529]	0,53	0,53
Transplantation antérieure	1 vs 0	-0,00183 [-0,0925 ; 0,0888]	0,97	0,97
Type rejet	Mixte vs cellulaire	0,0184 [-0,0828 ; 0,120]	0,72	0,056
	Humoral vs cellulaire	0,137 [0,0243 ; 0,250]	0,018	-

0 : absence ; 1 : présent ; F : femme ; H : homme

2.4 Analyses multivariées : influence de l'œdème sur la récupération de la clairance à trois mois et douze mois

Au risque alpha de 5%, en ajustant sur la présence d'une transplantation antérieure, le sexe, l'inobservance et le type de rejet, il existe une relation statistiquement significative entre la récupération de la clairance rénale après l'épisode de rejet aigu à 3 mois et 12 mois et la cotation de l'œdème ($p < 0,001$) (**Tableaux VII et VIII**).

En outre, comparativement au groupe « sans œdème » (cotation 0) :

- Il existait une corrélation entre la récupération de la clairance rénale après l'épisode de rejet aigu entre les groupes à 3 mois ($r=-0,206$; $p < 0,001$), à 12 mois ($r=-0,256$; $p < 0,001$) et la présence d'un « œdème faible à modéré » (cotation 1).

- Il existait une corrélation entre la récupération de la clairance rénale après l'épisode de rejet aigu entre les groupes à 3 mois ($r=-0,430$; $p < 0,001$), à 12 mois ($r=-0,557$; $p < 0,001$) et la présence d'un « œdème fort » (cotation 2).

Ces corrélations sont négatives car la récupération de la clairance rénale est d'autant plus faible que le ratio des DFG est faible.

En revanche, il n'existait pas de différence significative sur la récupération de la clairance rénale à 3 mois et à 12 mois entre les groupes selon le type rejet ($p=0,42$; $0,67$), l'inobservance ($p=0,12$; $0,57$), la présence d'une transplantation antérieure ($p=0,26$; $0,61$) ou le sexe ($p=0,96$; $p=0,55$).

- La positivité des DSA et de l'anticorps anti-C4d n'a pas servi de variable d'ajustement du fait d'une multicolinéarité (variables de prévision du modèle mesurant le même phénomène) avec le rejet aigu humoral ou mixte.

Tableau VII Analyse de la régression linéaire multiple sur la récupération de la clairance rénale à 3 mois en fonction de l'œdème, du sexe, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.

		Coefficients	p	p global
Œdème (cotation)	1 vs 0	-0,206 [-0,311; -0,102]	<0,001	<0,001
	2 vs 0	-0,430 [-0,597; -0,263]	<0,001	-
Inobservance	1 vs 0	-0,191 [-0,433; 0,0514]	0,12	0,12
Sexe	F vs M	-0,00243 [-0,105; 0,0999]	0,96	0,96
Transplantation antérieure	1 vs 0	-0,0683 [-0,189; 0,0523]	0,26	0,26
Type rejet	Mixte vs cellulaire	0,0847 [-0,0493; 0,219]	0,21	0,42
	Humoral vs cellulaire	-0,0165 [-0,167; 0,134]	0,83	-

0 : absence ; 1 : présent ; F : femme ; H : homme

Tableau VIII Analyse de la régression linéaire multiple sur la récupération de la clairance rénale à 12 mois en fonction de l'œdème, du sexe, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.

		Coefficients	p	p global
Œdème (cotation)	1 vs 0	-0,256 [-0,386; -0,126]	<0,001	<0,001
	2 vs 0	-0,557 [-0,772; -0,341]	<0,001	-
Inobservance	1 vs 0	-0,0894 [-0,399; 0,220]	0,57	0,57
Sexe	F vs M	0,0438 [-0,105; 0,193]	0,55	0,55
Transplantation antérieure	1 vs 0	-0,0421 [-0,207; 0,122]	0,61	0,61
Type rejet	Mixte vs cellulaire	-0,0326 [-0,208; 0,142]	0,71	0,67
	Humoral vs cellulaire	0,0732 [-0,129; 0,276]	0,47	-

0 : absence ; 1 : présent ; F : femme ; H : homme

2.5 Analyses multivariées en sous-groupes : influence de l'œdème sur la fonction rénale et sa récupération à 3 mois et 12 mois selon le grade de rejet cellulaire

Dans cette analyse en sous-groupes, les onze biopsies avec un rejet aigu humoral ont été exclues.

Au risque alpha de 5%, en ajustant sur le grade de rejet cellulaire, le sexe, la présence d'une transplantation antérieure et le type rejet, il existe une relation statistiquement significative entre le retentissement immédiat sur la fonction rénale, la récupération de clairance après l'épisode de rejet aigu et l'intensité de l'œdème ($p < 0,001$). Les autres variables introduites dans le modèle statistique, notamment le grade de rejet cellulaire (**Tableaux IX, X et XI**) ne sont pas liées significativement avec le retentissement immédiat et la récupération de clairance rénale.

Tableau IX Analyse de la régression linéaire multiple sur le retentissement immédiat du rejet aigu sur la fonction rénale en fonction de l'œdème, du sexe, du grade de rejet cellulaire, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.

		Coefficients	p	p global
Œdème (cotation)	1 vs 0	-0,122 [-0,212; -0,0318]	<0,01	<0,001
	2 vs 0	-0,320 [-0,457; -0,183]	<0,001	-
Grade de rejet cellulaire	Ib vs Ia	-0,0165 [-0,110; 0,0767]	0,72	0,24
	II/III vs Ia	-0,105 [-0,228; 0,0183]	0,094	-
Sexe	F vs M	-0,0272 [-0,111; 0,0569]	0,52	0,52
Transplantation antérieure	1 vs 0	0,00716 [-0,0911; 0,105]	0,88	0,88
Type de rejet	Mixte vs cellulaire	0,0279 [-0,0751; 0,131]	0,59	0,59

F : femme ; H : homme

Tableau X Analyse de la régression linéaire multiple sur la récupération de la clairance rénale à 3 mois en fonction de l'œdème, du sexe, du grade de rejet cellulaire, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.

		Coefficients	p	p global
Œdème (cotation)	1 vs 0	-0,247 [-0,384; -0,110]	<0,001	<0,001
	2 vs 0	-0,463 [-0,661; -0,265]	<0,001	-
Grade de rejet cellulaire	Ib vs Ia	-0,0137 [-0,156; 0,129]	0,85	0,78
	II/III vs Ia	-0,0655 [-0,243; 0,112]	0,46	-
Sexe	F vs M	-0,00211 [-0,119; 0,115]	0,97	0,97
Transplantation antérieure	1 vs 0	-0,0383 [-0,182; 0,106]	0,6	0,6
Type de rejet	Mixte vs cellulaire	0,105 [-0,0451; 0,254]	0,17	0,17

0 : absence ; 1 : présent ; F : femme ; H : homme

Tableau XI Analyse de la régression linéaire multiple sur la récupération de la clairance rénale à 12 mois en fonction de l'œdème, du sexe, du grade de rejet cellulaire, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet

		Coefficients	p	p global
Œdème (cotation)	1 vs 0	-0,292 [-0,440; -0,144]	<0,001	<0,001
	2 vs 0	-0,585 [-0,820; -0,349]	<0,001	-
Grade de rejet cellulaire	Ib vs Ia	-0,0105 [-0,167; 0,146]	0,89	0,82
	II/III vs Ia	-0,0825 [-0,412; 0,247]	0,59	-
Sexe	F vs M	0,0403 [-0,101; 0,182]	0,57	0,57
Transplantation antérieure	1 vs 0	-0,0703 [-0,242; 0,101]	0,42	0,42
Type de rejet	Mixte vs cellulaire	-0,0441 [-0,224; 0,136]	0,63	0,63

0 : absence ; 1 : présent ; F : femme ; H : homme

3. Analyse de la survie du greffon en fonction de l'œdème

Les patients décédés ou perdus de vue ont été considérés comme patients n'ayant plus un greffon viable. Dans cette hypothèse maximaliste d'échec, un greffon non viable impliquerait un retour en dialyse (Cinq patients décédés, deux perdus de vue).

Au risque alpha de 5%, il existe une relation statistiquement significative entre le retour en dialyse et l'intensité de l'œdème ($p < 0,01$) sur 120 mois (**Tableau XII**).

Les patients avec un « œdème faible à modéré » sur la biopsie du greffon ont un risque multiplié en moyenne par **3,5** de revenir en dialyse ($p = 0,029$) par rapport aux patients sans œdème.

Les patients avec un « fort œdème » sur la biopsie du greffon ont un risque multiplié en moyenne par **5,5** de revenir en dialyse ($p < 0,01$) par rapport aux patients sans œdème.

Ces risques sont modélisés sur la **figure 10**.

Tableau XII Analyse Cox univariée de la survie du greffon.

		Hazard Ratio	p	p global
Œdème	1 vs 0	3,50 [1,14 ; 10.8]	0029	<0.01
(cotation)	2 vs 0	5,50 [1.61 ; 18.8]	<0.01	-

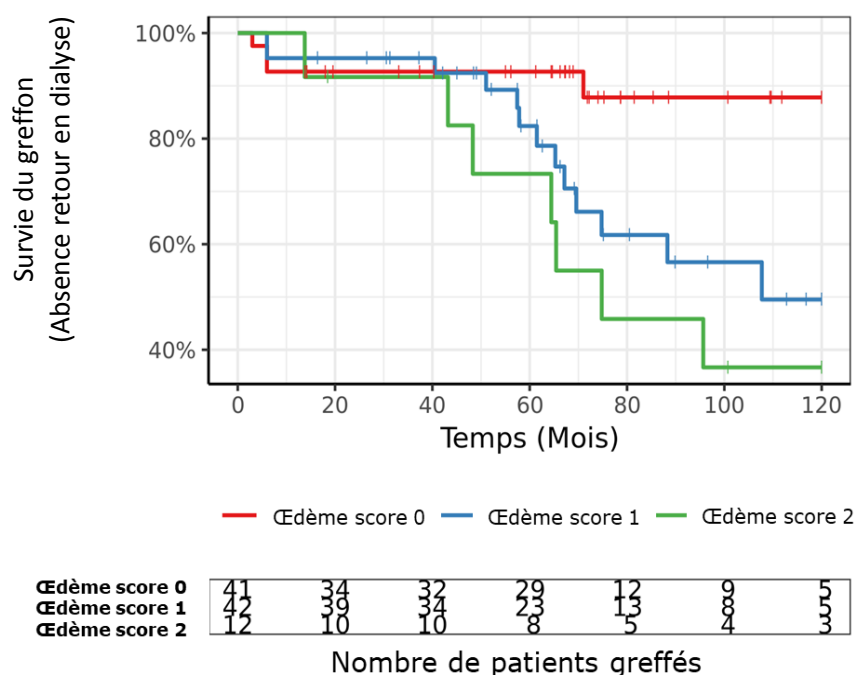


Figure 10 Analyse de survie avec la régression de Cox selon les différents groupes d'œdème

4. Reproductibilité de l'analyse morphologique de l'œdème

Les quatre-vingt-quinze biopsies ont été relues de façon indépendante par les trois observateurs pour la cotation de l'œdème. Le score kappa montrait un accord très fort entre les observateurs pour l'évaluation de l'œdème toutes classes confondues ($\kappa=0,71$). L'accord était quasi parfait entre eux pour l'évaluation d'un fort œdème : « cotation 2 » ($\kappa=0,82$) mais moins bon pour l'œdème léger à modéré « cotation 1 » ($\kappa=0,62$) (**Tableau XIII**).

Quatre biopsies avec suspicion de « fort œdème » n'ont pas fait consensus: classement dans le groupe « fort œdème » par les deux pathologistes non experts et dans le groupe

« œdème faible à modéré » par l'expert. Après relecture de consensus au microscope multitéte, trois cas ont été maintenus dans le groupe « œdème faible à modéré » et un cas a été classé en groupe « fort œdème ». Le principal argument faisant consensus était le caractère diffus de l'œdème dans la corticale rénale pour le reclassement de la biopsie dans le groupe « fort œdème ».

Tableau XIII Score de concordance Kappa de Fleiss réalisé avec les 95 biopsies de la cohorte.

	Total	Œdème cotation 0	Œdème cotation 1	Œdème cotation 2
Kappa de Fleiss (κ)	0,71	0,73	0,62	0,82

5. Analyses informatiques de lames numérisées

5.1 Segmentation automatisée des images : quantification de la surface biopsique occupée par l'œdème

Après l'étape de mise au point de la segmentation automatisée, deux groupes de segmentation ont été réalisés. Quinze biopsies ont été analysées par le logiciel Ilastik© : un groupe de cinq cas de biopsies « sans œdème » (groupe témoin) et un groupe de dix cas avec « fort œdème » (deux images au X100 analysées pour chaque cas). Deux cas de biopsies avec œdème fort ont été exclus de l'analyse automatisée à cause d'une coloration au Trichome de Masson altérée.

Cinq segmentations ont été réalisées sur chaque groupe avec des corrections et des annotations. Les données des deux séries de segmentation ont ensuite été ajoutées et cumulées afin de réaliser la segmentation définitive.

Trente-trois patches de cas avec « fort œdème » et vingt-cinq patches de cas « sans œdème », représentatifs des structures rénales et de la matrice extracellulaire ont été sélectionnés au cours des différentes segmentations

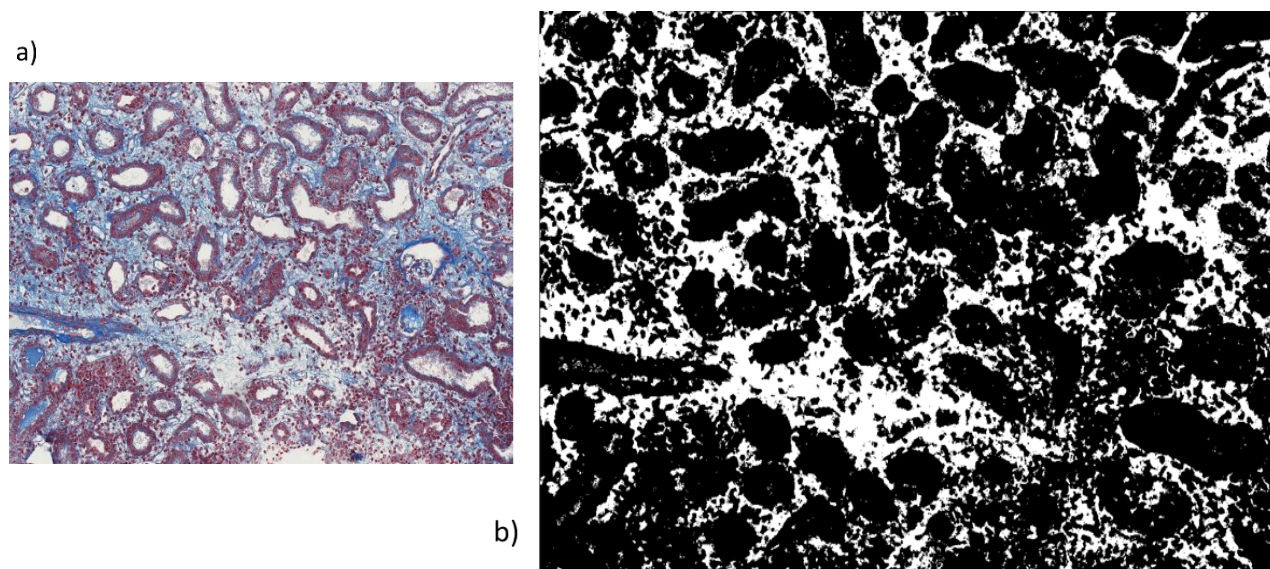


Figure 11 Résultats après segmentation du cas n°3 avec fort œdème : nombre de pixel total: 13559920. Nombre de pixel avec matrice extra cellulaire 4228315 soit 31,2%. a) lame colorée par le Trichrome de Masson. b) Résultats de la segmentation (matrice extra cellulaire en blanc).

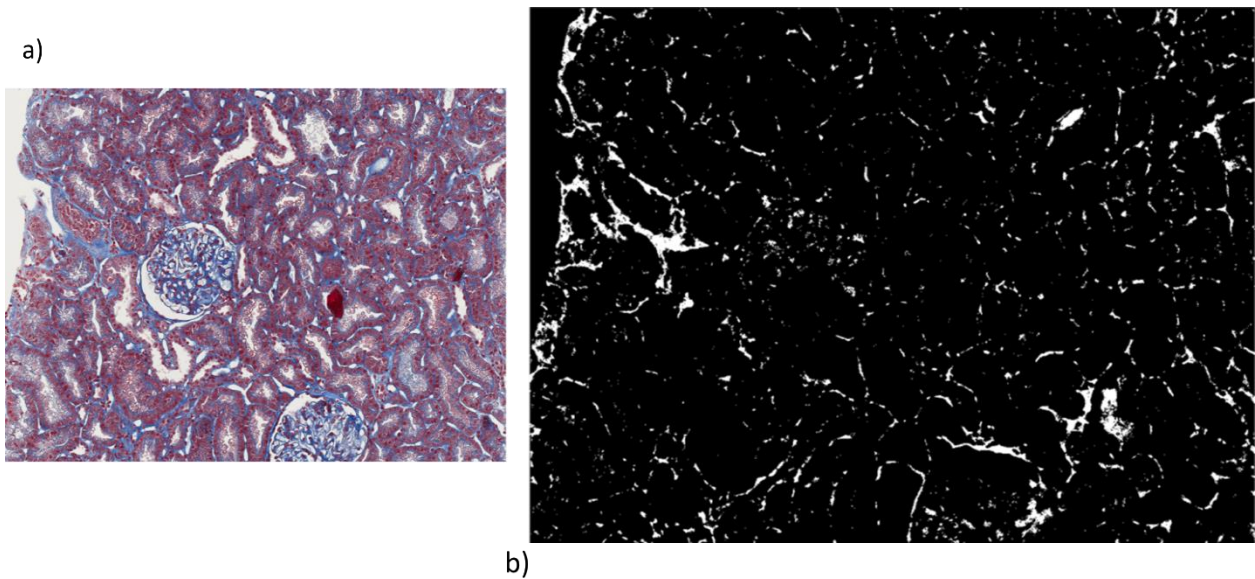


Figure 12 Résultats après segmentation du cas n°14 sans œdème : nombre de pixel total: 13336918. Nombre de pixel avec matrice extra cellulaire 558282 soit 4,2%. a) lame colorée par le Trichrome de Masson. b) Résultats de la segmentation (matrice extra cellulaire en blanc).

En moyenne, la matrice extracellulaire avait un taux d'occupation de surface biopsique de 9,4% (+/-9,7) sur les biopsies sans œdème (**Figure 12**), et de 21,9% (+/- 18,0) sur les biopsies avec un œdème fort (**Figure 11**).

5.2 Comparaison de la segmentation avec les images annotées manuellement (performance de la segmentation automatique)

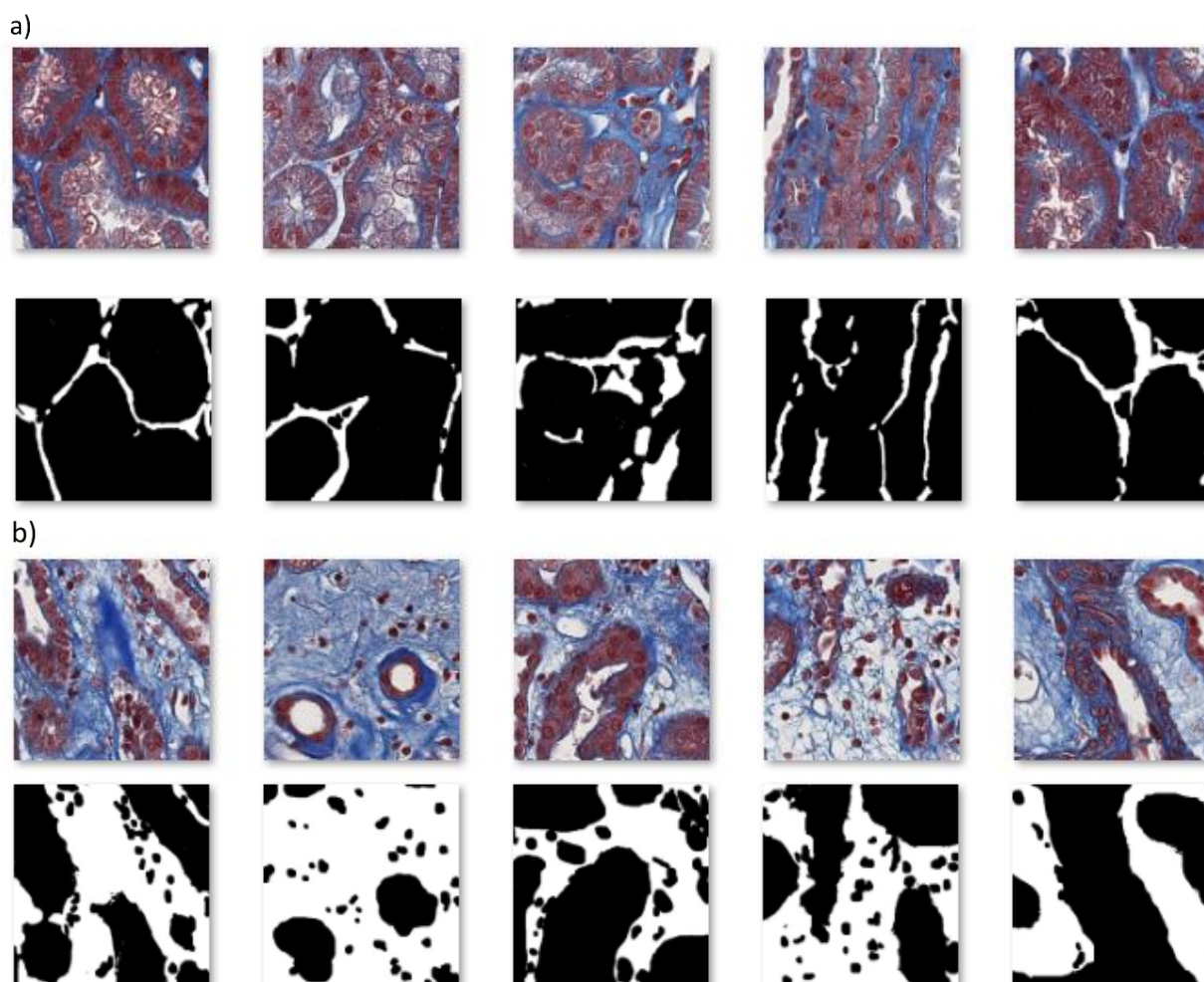


Figure 13 Exemple d'annotation manuelle de cinq patches sans œdème (a) et cinq patches avec œdème fort en (b)

Une fois les processus d'annotation et de segmentation automatisée validés, vingt patches de 500x500 pixels pris au hasard ont été entièrement annotés par l'expert. Dix patches de cas sans œdème et dix patches de cas avec œdème fort ont été sélectionnés (**Figure 13**).

Ces 20 patches complètement annotés manuellement (patches contrôles) ont été comparés aux résultats de la segmentation automatisée. Chaque pixel bien annoté comme « matrice extracellulaire » était considéré comme un vrai positif (VP), les pixels représentant la surface des structures rénales histologiques, inflammatoires ou vasculaires bien annotés étaient considérés comme vrai négatif (VN). La discordance entre l'annotation contrôle et la segmentation automatisée était considérée comme faux positif si le pixel du groupe

« structures rénales et inflammatoires » était reconnu dans le groupe matrice extracellulaire (FP). Le pixel faussement reconnu comme « structures rénales et inflammatoires » était classifié en faux négatif (FN). La matrice de confusion (matrice mesurant la qualité d'un système de classification en apprentissage automatique supervisé) des 20 patchs annotés est reportée dans le **tableau XIV**. Vingt patchs de 500 x 500 pixels correspondaient ainsi à 5 millions de pixels.

Tableau XIV Matrice de confusion des 20 patchs contrôles comparés aux 20 patchs segmentés automatiquement (en pixel)

		Annotation manuelle contrôle	
		Positive	Négative
Segmentation automatisée	Positive	VP= 886123	FP= 135043
	Négative	FN= 438113	VN=3540721

D'après le matrice de confusion, la segmentation automatisée avait une spécificité à 96% et une sensibilité à 59%. Le F1 score est une moyenne harmonique de la valeur prédictive positive et de la sensibilité. Il mesure la capacité du système à donner toutes les solutions pertinentes et à refuser les autres. Cette mesure correspond ainsi à un compromis de la sensibilité et valeur prédictive et donne la performance du système. Avec notre segmentation automatisée, la valeur de F1 score était de 0,67, calculée à partir de la moyenne de 20 patchs de contrôle annotés manuellement (**Tableau XV**).

Tableau XV Performance de la segmentation automatisée par rapport à l’annotation manuelle de contrôle sur 20 patches.

	Valeurs moyennes
F1-score	0,67
Sensibilité	0,59
Spécificité	0,96
Valeur prédictive positive	0,83

DISCUSSION

1. Étude de l'œdème au microscope optique

Pour *Devaux et al.*(20), un œdème interstitiel majeur était défini comme une zone corticale dans laquelle au moins 10 tubules adjacents étaient séparés par des espaces inter tubulaires de plus d'un diamètre tubulaire de largeur et dépourvus de cellules mononucléées. Cette étude ne tenait pas compte de l'œdème lorsqu'il était léger ou modéré. Enfin, elle n'évaluait pas la reproductibilité de l'œdème.

La reproductibilité des critères de Banff a bien été démontrée (26) (27) 28) mais l'œdème n'y est pas pris en compte.

Dans notre étude, la présence d'un infiltrat inflammatoire, présent sur la plupart des biopsies ne permettait pas l'utilisation de la définition proposée par *Devaux* (20).

Les estimations semi-quantitatives de l'œdème présentaient une variabilité inter-observateur satisfaisante avec un kappa de Fleiss à 0,71. La concordance était cependant plus faible pour le groupe d'œdème « faible à modéré » ($\kappa = 0,62$) car la limite entre « faible œdème » et absence d'œdème était parfois difficile à évaluer. La concordance était toutefois excellente pour les œdèmes « fort » ($\kappa = 0,82$).

2. Limites de l'étude

Au total, quatre-vingt-quinze biopsies ont été incluses dans l'étude pour soixante-treize patients. Dix-huit patients ont bénéficié de deux ou trois biopsies. Certaines biopsies étaient réalisées pour persistance d'une insuffisance rénale. Les patients avaient ainsi déjà reçu un traitement immunosuppresseur avec notamment des corticoïdes au moment de la deuxième ou de la troisième biopsie. L'analyse anatomopathologique était conduite de façon indépendante par rapport aux biopsies antérieures. Ces cas ont ainsi été traités indépendamment dans l'analyse statistique.

Les grades de rejet cellulaire et le rejet de type humoral ne ressortaient pas comme facteur significatif quant à l'intensité du rejet aigu et à la récupération de la clairance rénale à trois et douze mois. Il s'agit probablement d'un manque de puissance statistique. Les rejets aigus humoraux sont classiquement reconnus de plus mauvais pronostic que les rejets cellulaires, particulièrement lorsqu'ils sont mixtes avec une composante vasculaire (29). De plus, seulement 10 biopsies avec composante vasculaire ont été incluses dans notre étude et fusionnées en un seul groupe quel que soit leur grade pour des besoins statistiques.

3. L'œdème comme facteur de pronostic indépendant de la classification de Banff

Absent de la classification de Banff, plusieurs études ont montré cependant la valeur péjorative de la présence d'un œdème sur biopsie rénale quant au pronostic du greffon.

En 1996, *Kooijmans-Coutinh et al.* (22), a montré que l'œdème était significativement plus important dans les biopsies avec rejet dit « vasculaire » (humoral) et « thrombosé » (hyperaigu) par rapport au rejet dit « tubulo-interstitiel » (cellulaire) (50% et 86% versus 31% $p=0,0012$) utilisé par la classification de Banff de 1993. La présence de fibrose interstitielle n'était pas statistiquement différente dans les trois groupes ($p=0,33$).

En 1998, *Kazi et al.*(21) a proposé l'utilisation d'un logiciel pour estimer la présence de rejet aigu sur vingt-et-une biopsies rénales de greffon. Les données du Banff, ainsi que d'autres critères histologiques dont l'œdème, étaient recueillis et inscrits dans le logiciel par deux observateurs indépendants. L'œdème interstitiel était évalué au microscope optique par un pathologiste en pourcentage de la surface totale de la biopsie à faible grossissement. Le logiciel estimait alors le risque de rejet en fonction de l'aire d'œdème sur les biopsies. La probabilité qu'un rejet aigu soit diagnostiqué selon les critères de la classification de Banff était de 22,5% lorsque l'œdème représentait plus de 75% de la surface de la biopsie et de 20% lorsque la surface de l'œdème était comprise entre 50 et 75%. A contrario, le risque de rejet était de

2,5% lorsque l'œdème représentait moins de 25% de la biopsie (21). Les auteurs de cet article ont fait de l'œdème un critère mineur, pouvant aider au diagnostic de rejet.

Desvaux et al.(20) a étudié l'impact d'un œdème interstitiel associé avec un infiltrat inflammatoire plasmocytaire (défini comme la présence de plasmocytes en proportion de plus de 10% de la population inflammatoire de l'échantillon), lésion appelée OPcR (Œdema Plasma cell Rich).

Quatorze biopsies de douze patients répondaient à ces critères ; onze étaient des rejets aigus de grade I de Banff et trois étaient « borderline ». Tous les patients ont reçu un traitement contre le rejet aigu. Le délai médian avant survenue d'une OPcR était de 187 jours après la transplantation. Tous les épisodes de rejet étaient résistants aux stéroïdes.

Après diagnostic de rejet avec OPcR, le taux de survie du greffon (viabilité du greffon si créatininémie < 200 µmol/L) était de 40% à 1 an et la durée de survie moyenne du greffon était de 280 jours.

Cette étude suggérait ainsi qu'un œdème important associé à un infiltrat inflammatoire plasmocytaire était un critère de mauvais pronostic, indépendant de la classification de Banff.

Notre étude est difficilement comparable à celle de *Desvaux et al.*(20) car nous n'avons pas tenu compte du degré et de la nature de l'inflammation cellulaire pouvant être associés à l'œdème.

Dans notre cohorte de 95 patients, nous avons observé une corrélation statistiquement significative entre la sévérité du rejet et l'intensité de l'œdème. Les patients sans œdème du greffon avaient une fonction rénale moins altérée lors du rejet aigu et une meilleure récupération de la fonction rénale à 3 mois et 12 mois que les patients avec un fort œdème du greffon, mais aussi que les patients avec un œdème faible à modéré. La corrélation statistique est particulièrement forte ([-1 ; -0,5]) entre le groupe « œdème fort » et le groupe « sans

œdème ». Ces résultats étaient indépendants du type de rejet, du grade de rejet cellulaire, de l'inobservance, du sexe et de la présence d'une transplantation antérieure.

En outre, une relation statistiquement significative a été observée entre la survie du greffon et l'intensité de l'œdème au moment de la biopsie.

4. L'œdème présent dans les rejets humoraux de mauvais pronostic

En 2007, *Lefaucheur et al.* (23) a étudié l'incidence et l'évolution du rejet humoral dans une cohorte de 237 patients transplantés rénaux suivis pendant trente mois. Parmi ceux-ci, trente-deux patients étaient considérés comme à risque de rejet humoral et ont reçu des immunoglobulines intraveineuses (IgIV), soit en préventif avant la greffe (groupe A, n = 18) soit au moment de la transplantation (groupe B, n = 14). La prévalence du rejet humoral était de 27,8% dans le groupe A, 57,1% dans le groupe B contre 3,9% dans le reste de la population de l'étude.

Parmi les rejets humoraux, un groupe présentant des critères de mauvais pronostic a été identifié par rapport à un autre de groupe avec une fonction rénale comparable à celle de la population globale transplantée (n=13).

Les critères de mauvais pronostic étaient :

- Immunologiques : présence et / ou persistance d'anticorps anti-HLA spécifiques au donneur après la transplantation.
- Histologiques :
 - o Œdème interstitiel, glomérulite neutrophile, dilatation capillaire péritubulaire avec infiltrats de neutrophiles au moment de biopsie initiale.

- Lésions de rejet vasculaire et infiltrats de monocytes/ macrophages dans les glomérules et capillaires péri-tubulaires dilatés au moment de la biopsie, à 3 mois, à 6 mois après le diagnostic de rejet.
- La persistance de C4d ne prédisait pas le résultat.

Cette étude ne présentait cependant pas de définition de l'œdème interstitiel.

Dans la cohorte de *Desvaux et al.* (20), les patients avec œdème significatif présentaient un rejet plutôt de type humoral : des anticorps circulants réactifs soit au HLA du donneur, soit aux cellules endothéliales, étaient présents chez huit des douze patients et un dépôt C4d généralisé dans les capillaires péri-tubulaires était présent chez trois des cinq patients étudiés.

Parmi les douze cas du groupe fort œdème de notre étude, cinq greffons présentaient une part humorale dans le rejet aigu dont deux avec un rejet vasculaire associé (IIa). Trois patients ont subi un retour en dialyse dans les 24 mois.

5. L'œdème prédictif de la résistance aux traitements de rejet

Les douze patients de la cohorte de *Devaux et al.* présentaient tous une résistance aux corticoïdes lors de la mise en route du traitement anti-rejet aigu (METHYLPREDNISOLONE à des doses progressivement décroissantes). Les patients ont alors bénéficié d'un traitement par immunoglobulines polyclonales anti-thymocytes ou par des OKT3 (anti-lymphocytes T monoclonaux).

En 2007, *Lerut et al.* a comparé les données histologiques et morphométriques de patients compliants versus patients non compliants aux traitements immunosuppresseurs sur une cohorte de quatre-vingt-dix patients (soixante-et-un patients compliants, et vingt-neuf patients non compliants) avec les taux plasmatiques de CICLOSPORINE A.

L'œdème était analysé avec un outil informatique par morphométrie et les différents *critères du Banff* par analyse histologique au microscope optique.

Dans cette cohorte, les lésions de rejet cellulaire aigu étaient significativement plus importantes dans le groupe non compliant (15/29 patients : 51.7% contre 11/62 patients : 18.0%, $p = 0,0023$). De plus, les lésions de tubulite ($p = 0,008$) d'infiltrats inflammatoires interstitiels ($p = 0,0014$), de dépôts de Cd4 ($p = 0.0092$), et de capillarites péritubulaires ($p = 0.0070$) étaient notamment plus sévères chez les patients non compliants.

Cependant, il est apparu que l'œdème était significativement plus important chez les patients compliants par rapport aux patients non compliants : 23,27% versus 5,18% ($p = 0,0165$). Les auteurs proposaient comme hypothèse physiopathologique à cette différence de surface d'œdème, une reprise de corticostéroïdes par les patients avant une consultation médicale ou un contrôle biologique (30).

6. Etude morphométrique de l'œdème dans les biopsies rénales

A partir de lames numérisées, *Lerut et al.* (30) a déterminé avec la coloration trichrome de Masson la surface de la matrice interstitielle (surface de l'œdème et de la fibrose), champ par champ, en utilisant un grossissement x100. Les structures glomérulaires et vasculaires ont été délimitées et supprimées des images par interaction manuelle par un pathologiste. Un programme informatique d'analyse d'images avec une formule de soustraction numérique des couleurs (bleu versus rouge) a permis la discrimination de l'espace interstitiel. La surface de l'œdème et de la fibrose a ensuite été convertie en pourcentage de tubulo-interstitium (correspondant à la surface corticale totale moins les structures glomérulaires et vasculaires).

La surface de la fibrose a été mesurée par la même méthode sur le Picro Sirius, mais sur une seule section colorée au rouge Sirius, champ par champ, en utilisant un grossissement X100.

La différence entre les deux surfaces (surface avec fibrose et œdème par rapport à la fibrose seule) a permis l'obtention de la surface de l'œdème.

Pour mesurer la densité de l'infiltrat inflammatoire dans l'espace interstitiel, un comptage manuel a été réalisé dans les corticales non atrophiques avec une coloration argentique et n'entrait pas en compte dans le calcul de la surface de la matrice extracellulaire.

Dans notre étude, le programme informatique Ilastik© utilisé a permis une automatisation de l'analyse d'images via des segmentations visant à discriminer les différentes structures rénales sur le Trichome de Masson.

Les images numérisées à haute résolution (X400) avec le scanner de lames apportaient la meilleure résolution technique possible pour l'évaluation de l'œdème par microscopie optique (4220 X 3076 pixels). Un découpage des images a été nécessaire pour permettre l'analyse informatique en « patch » de 500 pixels par 500 pixels pour pallier le défaut de puissance informatique. Les annotations (segmentations manuelles) ont été réalisées sur plusieurs lames 'témoins', en les séparant en 'patches' : zones où les régions d'intérêt étaient définies. Ces annotations collectées ont ensuite permis d'extrapoler le processus de segmentation, cette fois-ci de manière automatisée sur les lames suivantes.

Cependant, plusieurs difficultés sont apparues au cours des segmentations.

Des variations de contraste et couleur, intrinsèques à la coloration au trichrome de Masson ont été observées. Ces variations, même minimales, obligeaient à réaliser de nouvelles segmentations sur certains cas de l'étude afin que l'algorithme soit applicable aux plus grands nombres d'images. Il fallait donc sélectionner manuellement les lames présentant les mêmes

caractéristiques techniques. De plus, la vitesse de segmentations dépend de la puissance de calcul des ordinateurs utilisés (jusqu'à plus d'une heure pour une segmentation d'une lame biopsique).

Dans un premier temps, le but était de différencier les structures histologiques rénales, les vaisseaux, l'inflammation, la fibrose et l'œdème. De nombreuses erreurs lors des segmentations sont apparues pour discriminer la fibrose de l'œdème. Les noyaux des cellules inflammatoires étaient eux aussi difficilement identifiés séparément par le logiciel, par rapport aux noyaux des cellules structurelles rénales.

Face à ces difficultés à discriminer ces structures, dans un second temps, le logiciel a été paramétré pour ne rechercher que deux zones distinctes sur la corticale rénale (surface non optiquement vide) : une zone à éliminer comprenant les structures histologiques avec les cellules inflammatoires et une zone d'intérêt de matrice extracellulaire avec fibrose et œdème. L'étude a ensuite été spécifiquement dédiée à des cas choisis de greffons avec œdème fort.

Ensuite, le risque d'erreur du logiciel (reconnaissance erronée) a été mesuré en comparant plusieurs patches (20 patches en tout) pris au hasard avec une annotation manuelle de contrôle. Cette étape fût assez longue (30 à 45 min par patch) car elle nécessitait une précision au pixel près. La performance de notre segmentation (F1 score à 0,67) était moyenne. Ce chiffre est expliqué par une sensibilité basse de 59%. En effet, de nombreux pixels ont été classés dans le groupe tissu rénal et inflammatoire alors qu'il s'agissait de matrice extracellulaire. Un nombre plus important d'images annotées serait nécessaire pour améliorer l'apprentissage et la précision de la segmentation automatisée. Le *deep learning* nécessiterait notamment plusieurs centaines d'image annotées.

Enfin pour une automatisation plus poussée, la problématique de la distinction de la fibrose versus l'œdème de la matrice extracellulaire nécessiterait un travail sur les différents contrastes et couleurs. Cette discrimination risque de se heurter, en pratique, à la variabilité de

la coloration au Trichrome. L'œil du pathologiste semble pouvoir être encore un certain temps plus performant que la machine pour reconnaître les lésions d'œdème tissulaire.

CONCLUSION

Au cours des rejets aigus de greffon rénal, l'œdème n'est pas une lésion rare et son intensité peut être évaluée par l'examen anatomopathologique avec une reproductibilité correcte. La classification de Banff utilisée pour diagnostiquer les rejets et grader leur sévérité ne tient pas compte de l'œdème. Notre étude, avec toutes les limites d'un travail rétrospectif sur une cohorte monocentrique de moins de cent patients, montre que l'œdème a un impact pronostique indépendant sur la récupération de la clairance rénale après un épisode de rejet aigu et, à terme, un impact pronostique péjoratif sur la durée de vie du greffon.

Dans un futur déjà proche, le diagnostic anatomopathologique va être aidé d'outils informatiques. Nous avons montré qu'une segmentation automatisée de la matrice extracellulaire était réalisable. L'étape suivante devrait être une discrimination automatisée des lésions d'œdème et de fibrose de la matrice extracellulaire dans les biopsies rénales.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, et al. Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(23):1725-30.
2. Agence de Biomédecine, Données de l'application internet « Cristal ».
3. Bottomley MJ, Harden PN. Update on the long-term complications of renal transplantation. *British Medical Bulletin*. 2013;106:117-34.
4. Cai J, Terasaki PI. Human Leukocyte Antigen Antibodies for Monitoring Transplant Patients. *Surgery Today*. 2005;35(8):605-12.
5. Cai J, Terasaki PI. Humoral Theory of Transplantation: Mechanism, Prevention, and Treatment. *Human Immunology*. 2005;66(4):334-42.
6. Port FK, Dykstra DM, Merion RM, Wolfe RA. Organ donation and transplantation trends in the USA, 2003: Donation and transplantation trends. *American Journal of Transplantation*. 2004;4:7-12.
7. Marks R, Finke J. Biologics in the prevention and treatment of graft rejection. *Springer Seminar in Immunopathology*. 2006;27(4):457-76.
8. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. Schwartz RS, éditeur. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(15):1451-62.
9. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2008;3(1):189-220.
10. Platt J, LeBien T, Michael A. Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies in tissue sections. *The Journal of Experimental Medicine*. 1982;155(1):17-30.
11. Hall BM, Bishop GA, Farnsworth A, Duggin GG, Horvath JS, Sheil AGR, et al. Identification of the cellular subpopulations infiltrating rejecting cadaver renal allografts: Transplantation. 1984;37(6):564-70.
12. Hancock WW, Thomson NM, Atkins RC. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts: Transplantation. 1983;35(5):458-62.
13. Fuggle SV. Immunophenotypic analysis of leukocyte infiltration in the renal transplant. *Immunology Letters*. 1991;29(1-2):143-6.
14. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *American Journal of Transplantation*. 2018;18(2):293-307.

15. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International*. 1993;44(2):411-22.
16. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *American Journal of Transplantation*. 2003;3(6):708-14.
17. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American Journal of Transplantation*. 2014;14(2):272-83.
18. Inserm (dir.). *Transplantation d'organes: quelles voies de recherche? Synthèse et recommandations*. Paris: Les éditions Inserm, 2009, XIII- 79p. In. Disponible sur: <http://hdl.handle.net/10608/94>
19. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Voigt J-J. *Anatomie pathologique bases morphologiques et physiopathologiques des maladies*. Padoue: Piccin; 2000.
20. Desvaux D, Le Gouvello S, Pastural M, Abtahi M, Suberbielle C, Boeri N, et al. Acute renal allograft rejections with major interstitial oedema and plasma cell-rich infiltrates: high - interferon expression and poor clinical outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004;19(4):933-9.
21. Kazi JI, Furness PN, Nicholson M. Diagnosis of early acute renal allograft rejection by evaluation of multiple histological features using a Bayesian belief network. *Journal of Clinical Pathology*. 1998;51(2):108-13.
22. Kooijmans-Coutinho MF, Hermans J, Schrama E, Ringers J, Daha MR, Bruijn JA, et al. Interstitial rejection, vascular rejection, and diffuse thrombosis of renal allografts: Predisposing Factors, Histology, Immunohistochemistry, and Relation to Outcome¹. *Transplantation*. 1996;61(9):1338-44.
23. Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, Suberbielle-Boissel C, Antoine C, Charron D, et al. Determinants of Poor Graft Outcome in Patients with Antibody-Mediated Acute Rejection. *American Journal of Transplantation* 2007;7(4):832-41.
24. Medistica. pvalue.io, a graphic user interface to the R statistical analysis software for scientific medical publications., 2020. Available on: <https://www.pvalue.io>.
25. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
26. Marcussen N, Olsen TS, Benediktsson H, Racusen L, Solez K. Reproducibility of the banff classification of renal allograft pathology: Inter- and Intraobserver Variation. *Transplantation*. 1995;60(10):1083-9.
27. Solez K, Hansen HE, Kornerup HJ, Madsen S, Sørensen AW, Pedersen EB, et al. Clinical validation and reproducibility of the Banff schema for renal allograft pathology. *Transplant Proceedings*. 1995;27(1):1009-11.

28. Liapis H, Gaut JP, Klein C, Bagnasco S, Kraus E, Farris AB, et al. Banff Histopathological Consensus Criteria for Preimplantation Kidney Biopsies. *American Journal of Transplantation*. 2017;17(1):140-50.
29. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen J-P, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet*. 2013;381(9863):313-9.
30. Lerut E, Kuypers DR, Verbeken E, Cleutjens J, Vlamminck H, Vanrenterghem Y, et al. Acute rejection in non-compliant renal allograft recipients: a distinct morphology. *Clinical Transplant*. 2007;21(3):344-51.

LISTES DES FIGURES

Figure 1 Histologie de la corticale et de la médullaire rénale.....	4
Figure 2 Lésions histologiques et immuno-histochimiques de rejet aigu.....	9
Figure 3 Exemple d'un œdème faible à modéré (cotation 1 (X100)).....	17
Figure 4 Exemple d'une biopsie avec fort œdème (cotation 2) (X100)	18
Figure 5 Division de l'image initiale en patchs de 500 x 500 pixels	20
Figure 6 Exemples de filtres appliqués à la segmentation.....	21
Figure 7 Annotation manuelle des structures rénales. En jaune : le groupe des structures rénales et de l'infiltrat inflammatoire ; en bleu le groupe matrice extracellulaire.....	21
Figure 8 Schéma global de la segmentation et d'analyse des images	23
Figure 9 Diagramme de flux.....	26
Figure 10 Analyse de survie avec la régression de Cox selon les différents groupes d'œdème	38
Figure 11 Résultats après segmentation du cas n°3 avec fort œdème	40
Figure 12 Résultats après segmentation du cas n°14 sans œdème	41
Figure 13 Exemple d'annotation manuelle de cinq patchs sans œdème et cinq patchs avec œdème fort	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I Classification de Banff : lésions élémentaires	Erreur ! Signet non défini.
Tableau II Caractéristiques anatomocliniques des patients.....	27
Tableau III Caractéristiques anatomocliniques des 10 patients avec fort œdème.	28
Tableau IV Rapport moyen entre le DFG au moment de la biopsie, à 3 mois, à 12 mois et le DFG de base.	30
Tableau V Analyses univariées.	31
Tableau VI Analyse de la régression linéaire multiple sur le retentissement immédiat du rejet aigu sur la fonction rénale selon l'œdème, le sexe, la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.....	33
Tableau VII Analyse de la régression linéaire multiple sur la récupération de la clairance rénale à 3 mois en fonction de l'œdème, du sexe, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.....	34
Tableau VIII Analyse de la régression linéaire multiple sur la récupération de la clairance rénale à 12 mois en fonction de l'œdème, du sexe, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.....	35
Tableau IX Analyse de la régression linéaire multiple sur le retentissement immédiat du rejet aigu sur la fonction rénale en fonction de l'œdème, du sexe, du grade de rejet cellulaire, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.	36
Tableau X Analyse de la régression linéaire multiple sur la récupération de la clairance rénale à 3 mois en fonction de l'œdème, du sexe, du grade de rejet cellulaire, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.....	36
Tableau XI Analyse de la régression linéaire multiple sur la récupération de la clairance rénale à 12 mois en fonction de l'œdème, du sexe, du grade de rejet cellulaire, de la présence d'une transplantation antérieure, l'inobservance et le type de rejet.....	37

Tableau XII Analyse Cox univariée de la survie du greffon.....	38
Tableau XIII Score de concordance Kappa de Fleiss réalisé avec les 95 biopsies de la cohorte.	39
Tableau XIV Matrice de confusion des 20 patchs contrôles comparés aux 20 patchs segmentés automatiquement (en pixel)	43
Tableau XV Performance de la segmentation automatisée par rapport à l’annotation manuelle de contrôle sur 20 patchs.	44

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
PREAMBULE : connaissances générales sur la transplantation rénale	3
1. La transplantation rénale.....	3
2. L'histologie rénale	3
3. Le rejet de greffon rénal	4
3.1 Le rôle du Complexe Majeur d'Histocompatibilité	4
3.2 Le rejet hyper aigu	5
3.3 Le rejet aigu	5
4 Le diagnostic de rejet	7
5. Stratégies thérapeutiques du rejet aigu.....	10
5.1 Prévention du rejet.....	10
5.2 Le rejet aigu cellulaire	10
5.3 Le rejet aigu humoral	10
6. Mécanismes physiopathologiques de l'œdème au cours de l'inflammation	11
INTRODUCTION : hypothèses et objectifs	13
METHODOLOGIE.....	14
1. Type d'étude	14
2. Population	14
3. Échantillons biopsiques	14
4. Evaluation de la fonction rénale au diagnostic de rejet aigu et de la récupération fonctionnelle du greffon après le rejet aigu	15
5. Protocole et éthique.....	16
6. Analyse morphologique de l'œdème sur le tissu interstitiel rénal	16
7. Analyse informatique sur lames numérisées colorées au trichrome de Masson ..	18
7.1 Problématique	18
7.2 Numérisation et sélection des images	18
7.3 Segmentation avec le logiciel Ilastik©	19
7.3.1 Division de l'image en patches	20
7.3.2 Etape manuelle : annotation et apprentissage des régions analysées.....	20
7.3.3 Etape automatisée : utilisation de l'annotation d'images représentatives pour étendre les segmentations à d'autres images (<i>Batch Processing Mode</i>)	22
7.3.4 Correction et validation des segmentations	22
7.3.5 Calcul de la performance de segmentation et de quantification	22
8. Analyses statistiques	23

RESULTATS	25
1. Caractéristiques des patients et des greffons	25
2. Evaluation de l'impact pronostique de l'œdème	29
2.1 Variables quantitatives	29
2.2 Analyses univariées	30
2.3 Analyses multivariées : influence de l'œdème sur la fonction rénale lors du rejet aigu	32
2.4 Analyses multivariées : influence de l'œdème sur la récupération de la clairance à trois mois et douze mois	33
2.5 Analyses multivariées en sous-groupes : influence de l'œdème sur la fonction rénale et sa récupération à 3 mois et 12 mois selon le grade de rejet cellulaire	35
3. Analyse de la survie du greffon en fonction de l'œdème	37
4. Reproductibilité de l'analyse morphologique de l'œdème	38
5. Analyses informatiques de lames numérisées	39
5.1 Segmentation automatisée des images : quantification de la surface biopsique occupée par l'œdème	39
5.2 Comparaison de la segmentation avec les images annotées manuellement (performance de la segmentation automatique)	41
DISCUSSION	45
1. Étude de l'œdème au microscope optique	45
2. Limites de l'étude	45
3. L'œdème comme facteur de pronostic indépendant de la classification de Banff	46
4. L'œdème présent dans les rejets humoraux de mauvais pronostic	48
5. L'œdème prédictif de la résistance aux traitements de rejet	49
6. Etude morphométrique de l'œdème dans les biopsies rénales	50
CONCLUSION	54
BIBLIOGRAPHIE.....	55
LISTES DES FIGURES	58
LISTE DES TABLEAUX	59
TABLE DES MATIERES	61
ANNEXES.....	63

ANNEXES

Méthode d'analyse avec forêts aléatoires et arbres décisionnels

Cet algorithme utilise les concepts de sous espaces aléatoires et de « bagging » (rééchantillonnage des patches à étudier et application à tous les patches). Chaque pixel est classé suite à une série de test (**Figure 1 bis**). Le premier niveau correspond au nœud initial (racine). Chaque niveau contient plusieurs nœuds intermédiaires (taille, texture, couleur...) avec les branches correspondant à des alternatives au test (type de contour, couleurs, etc.). Chaque classe d'une feuille (matrice extracellulaire ou structure rénale) est une classe majoritaire parmi les exemples d'apprentissage de cette feuille.

L'algorithme utilisé par Ilastik© est constitué de forêts d'arbres décisionnels permettant un apprentissage sur de multiples arbres de décision entraînés sur des sous-ensembles de données légèrement différents.

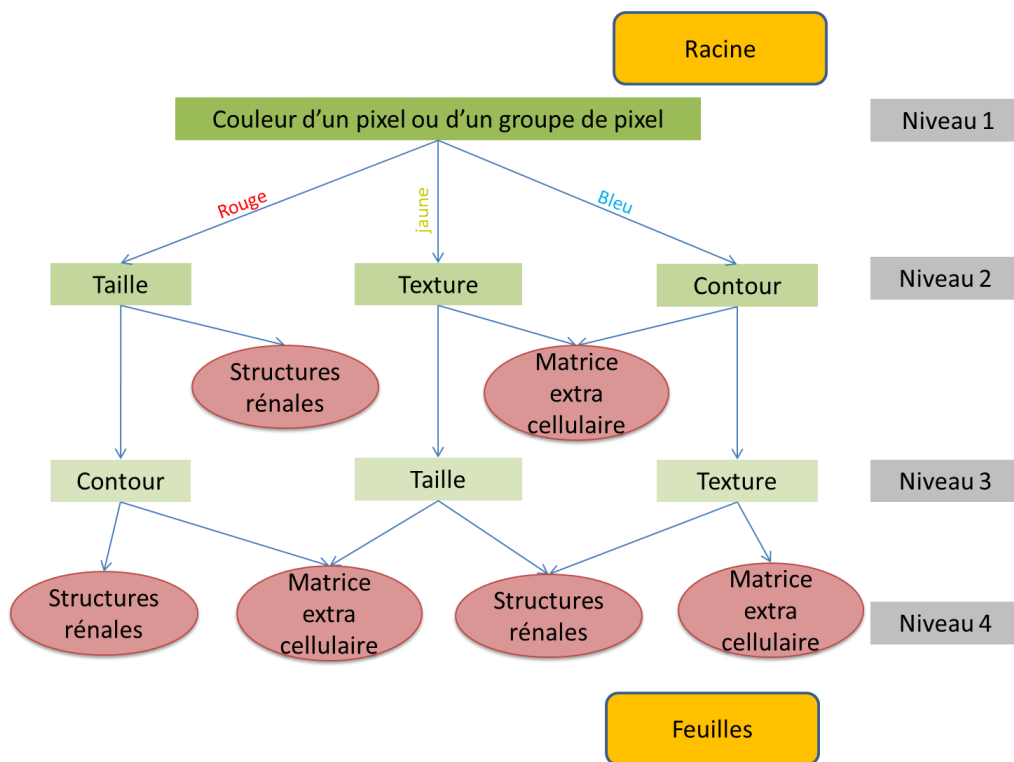


Figure 1 bis Exemple d'arbre décisionnel utilisé par l'étude de la matrice extracellulaire.

Tableau I bis Evaluation de la surface matrice extracellulaire sur les 10 cas avec œdème fort après segmentation automatisée.

Cas oedème fort	Echantillon	Pourcentage de matrice extracellulaire (%)
Cas n°1	1	16.9
	2	26.9
Cas n°2	1	24.5
	2	34
Cas n°3	1	31.2
	2	33.4
Cas n°4	1	23.4
	2	23.1
Cas n°5	1	34.2
	2	26.3
Cas n°6	1	34.9
	2	23.7
Cas n°7	1	22.3
	2	23.7
Cas n°8	1	35.2
	2	34.9
Cas n°9	1	17.3
	2	16.5
Cas n°10	1	25.8
	2	14.9
Moyenne		21.9 %

Tableau II bis Evaluation de la surface matrice extracellulaire sur les 5 cas témoins sans œdème après segmentation automatisée.

Cas normal	Echantillon	Pourcentage d'œdème (%)
Cas n°11	1	10.6
	2	21.4
Cas n°12	1	5.3
	2	5.5
Cas n°13	1	26.9
	2	30.1
Cas n°14	1	4.2
	2	6.2
Cas n°15	1	9.9
	2	11.2
	MOYENNE	9.4 %

IMPACT PRONOSTIQUE DE L'ŒDEME DANS LES BIOPSIES DE GREFFONS RENAUX AU COURS DES REJETS AIGUS

RÉSUMÉ

Introduction : Plusieurs études portant sur les greffons rénaux suggèrent que l'œdème serait un élément pronostique histologique péjoratif, toutefois sans en apporter la preuve statistique et la classification de Banff ne tient pas compte de l'œdème. Notre objectif principal était d'évaluer la valeur pronostique immédiate et à long terme de l'œdème du greffon lors d'un rejet aigu. Notre objectif secondaire était de mettre au point une méthode automatisée d'évaluation objective de l'œdème par analyse bio-informatique. **Matériels et méthodes :** Cette étude de cohorte, observationnelle, analytique, rétrospective et monocentrique a inclus les biopsies rénales avec rejet aigu diagnostiquées au Centre Hospitalier Universitaire d'Angers. L'évaluation semi-quantitative de l'intensité de l'œdème en trois groupes était réalisée au microscope par trois observateurs afin de rechercher un lien statistique entre l'œdème, la modification du débit de filtration glomérulaire et un éventuel retour en dialyse. Un logiciel de segmentation a été évalué sur sa fiabilité à reconnaître la matrice extracellulaire sur lames numérisées de tissu rénal. **Résultats :** De 2009 à 2018, quatre-vingt-quinze biopsies ont été incluses, quarante-et-une biopsies : groupe « sans œdème », quarante-deux biopsies : groupe « œdème faible ou modéré », douze biopsies : groupe « fort œdème ». En analyse univariée, l'évolution de la clairance rénale était défavorable ($p < 0,001$) et le risque de retour en dialyse était augmenté dans les groupes avec œdème (« faible à modéré » : HR=3,50 [1,14; 10,8], $p=0,029$; « fort œdème » : HR=5,5 [1,61; 18,8] $p < 0,01$). L'intensité de l'œdème était aussi corrélée avec le grade et le type de rejet aigu, la présence d'anticorps anti-C4d, et l'inobservance. En analyses multivariées incluant ces facteurs, comparativement au groupe « sans œdème », il existait une corrélation négative entre présence d'un « fort œdème » et récupération de la clairance rénale après l'épisode de rejet aigu à 3 mois ($r = -0,430$ [-0,597; -0,263]; $p < 0,001$) et à 12 mois ($r = -0,557$ [-0,772; -0,341]; $p < 0,001$). Cette corrélation était également observée dans le groupe « œdème faible à modéré » ($p < 0,05$). Parallèlement, la segmentation automatisée a été réalisée sur les biopsies avec fort œdème en utilisant des témoins sans œdème. Dix biopsies étaient exploitables. La segmentation avait une spécificité de 96%, une sensibilité de 59% et un F1 score de 0,67. **Conclusion :** L'intensité de l'œdème a un impact pronostique péjoratif sur la récupération de la clairance rénale après un rejet aigu, indépendamment du type et du grade de rejet. La segmentation automatisée de la matrice extracellulaire œdémateuse est possible mais nécessite un grand nombre de lames annotées pour augmenter la performance diagnostique.

Mots-clés : Œdème, Analyse d'image, Rejet aigu, Greffon rénal, Biopsie, Banff

PROGNOSTIC IMPACT OF EDEMA IN RENAL GRAFTS BIOPSIES DURING ACUTE REJECTION

ABSTRACT

Introduction: Several kidney transplant studies suggest that edema is a histological factor of poor prognosis, although a lack of statistical evidence. Besides, edema is not mentioned in the Banff classification. Our main objective was to assess immediate and long-term prognostic value of graft edema in acute rejection. Our secondary objective was to develop an automated segmentation method to provide an objective assessment of edema by bioinformatics analysis. **Materials and methods:** This observational, analytical, retrospective, single-center cohort study included renal biopsies with acute rejection, diagnosed at University Hospital of Angers. Semi-quantitative edema evaluation was carried out by three observers. Three edema groups were formed in order to search for a statistical link between edema, glomerular filtration rate variation, and coming back to dialysis. Automatic segmentation was performed on digital histological slides of kidney transplant. Software accuracy was assessed on extracellular matrix recognition. **Results:** From 2009 to 2018, ninety-five biopsies were included, forty-one biopsies: "without edema" group, forty-two biopsies: "slight or moderate edema" group, twelve biopsies "strong edema" group. In univariate analysis, renal clearance variation was adverse ($p < 0,001$) and coming back for dialysis was higher in the groups with edema ("mild to moderate edema" group: HR=3.50 [1.14; 10.8], $p=0.029$; "strong edema" group: HR=5.5 [1.61; 18.8], $p < 0.01$). Edema intensity was associated with grade and type of rejection, anti-C4d antibodies presence, and non-compliance. In multivariate analyzes, including these factors, compared to "no edema" group, there was a negative correlation between the "strong edema" and renal clearance recovery at three months after acute rejection ($r = -0.430$ [-0.597; -0.263]; $p < 0.001$) and at twelve months ($r = -0.557$ [-0.772; -0.341]; $p < 0.001$). This correlation was also observed in the "mild to moderate edema" group ($p < 0.05$). Automated segmentation was performed on biopsies with severe edema and control samples. Ten biopsies with severe edema were assessable. This screening method had a specificity of 96%, a sensitivity of 59% and an F1 score of 0.67. **Conclusion:** Independently of acute rejection type or grade, edema intensity has a poor prognostic impact on renal clearance recovery. Extracellular matrix automated segmentation is feasible on renal graft biopsies but requires a large number of annotated slides, in order to increase the diagnosis performance.

Keywords : Edema, Image analysis, Acute rejection, Kidney transplant, Biopsy, Banff