

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Soutenue publiquement le 13 octobre 2017
Par M^{lle} Rébecca VOREUX

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990

Tient lieu de

**THÈSE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

**MISE EN PLACE D'UNE STRATEGIE D'IDENTIFICATION
DES ANTICORPS ANTI-« HLA DENATURE »
AU LABORATOIRE D'HISTOCOMPATIBILITE DU CHRU DE LILLE**

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Annabelle DUPONT (CHRU de Lille)

Assesseur(s) : Madame le Professeur Myriam LABALETTE (CHRU de Lille)
Monsieur le Professeur Marc HAZZAN (CHRU de Lille)

Membre(s) extérieur(s) : Monsieur le Docteur Jonathan VISENTIN (CHU de Bordeaux)

Directeur de mémoire : Madame le Docteur Isabelle TOP (CHRU de Lille)

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

**Soutenu publiquement le 13 octobre 2017
Par M^{lle} Rébecca VOREUX**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
Tient lieu de**

**THÈSE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE**

**MISE EN PLACE D'UNE STRATEGIE D'IDENTIFICATION
DES ANTICORPS ANTI-« HLA DENATURE »
AU LABORATOIRE D'HISTOCOMPATIBILITE DU CHRU DE LILLE**

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Annabelle DUPONT (CHRU de Lille)

Assesseur(s) : Madame le Professeur Myriam LABALETTE (CHRU de Lille)
Monsieur le Professeur Marc HAZZAN (CHRU de Lille)

Membre(s) extérieur(s) : Monsieur le Docteur Jonathan VISENTIN (CHU de Bordeaux)

Directeur de mémoire : Madame le Docteur Isabelle TOP (CHRU de Lille)



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur-Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice-présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Éric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Murielle GARCIN Professeur Annabelle DERAM Professeur Muriel UBEDA SAILLARD M. Ghislain CORNILLON M. Pierre RAVAUX M. Larbi AIT-HENNANI M ^{me} Nathalie ETHUIN M ^{me} Ilona LEMAITRE
Directeur général des services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie STANDAERT
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia MELNYK
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe BOCHU
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe CHAVATTE
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas MORGENROTH
Chef des services administratifs :	M. Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M ^{me}	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M ^{me}	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M ^{me}	RENNEVILLE	Aline	Hématologie
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
M ^{me}	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco- et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
M ^{me}	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M ^{me}	DEPREZ	Rebecca	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
M ^{me}	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
M ^{me}	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
M ^{me}	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
M ^{me}	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
M ^{me}	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
M ^{me}	PERROY	Anne Catherine	Législation
M ^{me}	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
M ^{me}	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
M ^{me}	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M	TARTAR	André	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WILLAND	Nicolas	Laboratoire de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M ^{me}	BALDUYCK	Malika	Biochimie
M ^{me}	GARAT	Anne	Toxicologie
M ^{me}	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
M ^{me}	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M ^{me}	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
M ^{me}	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M ^{me}	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
M ^{me}	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M ^{me}	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M ^{me}	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
M ^{me}	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
M ^{me}	CHABÉ	Magali	Parasitologie
M ^{me}	CHARTON	Julie	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
M ^{me}	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
M ^{me}	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
M ^{me}	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M ^{me}	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M ^{me}	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco- et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco- et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
M ^{me}	FLIPO	Marion	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M ^{me}	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M ^{me}	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
M ^{me}	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
M ^{me}	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
M ^{me}	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
M ^{me}	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
M ^{me}	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
M ^{me}	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
M ^{me}	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco- et Neurochimie
M ^{me}	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
M ^{me}	LEHMANN	Hélène	Législation
M ^{me}	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
M ^{me}	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique

M ^{me}	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M ^{me}	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
M ^{me}	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
M ^{me}	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
M ^{me}	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
M ^{me}	RAVEZ	Séverine	Onco- et Neurochimie
M ^{me}	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
M ^{me}	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M ^{me}	SEBTI	Yasmine	Biochimie
M ^{me}	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
M ^{me}	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco- et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M ^{me}	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M ^{lle}	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Économie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences Associés - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M ^{me}	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Économie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M ^{me}	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur-Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de thèse,

Madame le Docteur Isabelle TOP

*Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Immunologie – HLA Transplantation
CHRU de Lille*

Pour avoir accepté de m'encadrer tout au long de ce travail, pour tes encouragements et tes mots rassurants lorsque je perdais espoir face aux résultats. Sache que je suis honorée d'être la première étudiante que tu encadres, et que j'espère avoir l'occasion de travailler à nouveau avec toi. Merci pour ton optimisme à toute épreuve !

Merci à mes assesseurs,

Madame le Professeur Myriam LABALETTE

*Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Chef de service de l'Institut d'Immunologie
CHRU de Lille*

Pour m'avoir accueillie au sein de votre Institut d'Immunologie, et m'avoir donné l'occasion d'y réaliser un projet de thèse. Merci pour votre bienveillance.

Monsieur le Professeur Marc HAZZAN

*Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Service de Néphrologie
CHRU de Lille*

Pour avoir accepté sans hésitation et avec enthousiasme de faire partie du jury de cette thèse. Merci de l'intérêt que vous portez à ce travail.

Monsieur le Docteur Jonathan VISENTIN

*Maître de Conférences Universitaire
Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique
CHU de Bordeaux-GH Pellegrin*

Pour votre aide précieuse depuis l'autre bout de la France au début du projet, et vos encouragements durant la dernière ligne droite. Merci de vous être déplacé pour juger ce travail.

Et enfin, merci à mon président de thèse,

Madame le Professeur Annabelle DUPONT

*Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hémostase
CHRU de Lille*

Pour avoir accepté de présider ce jury. J'ai beaucoup apprécié ton sérieux et ta douceur lors de mon stage au laboratoire d'hémostase : travailler avec toi était très agréable ! Je suis heureuse de pouvoir soutenir ma thèse devant toi.

À ceux que j'ai rencontrés depuis le début de mon internat, et qui ont participé, de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse (écrire un mot à chacun serait trop long mais j'espère avoir l'occasion de vous remercier de vive voix !) :

Mes remerciements vont plus particulièrement à

Cécile, pour m'avoir aidée à apprivoiser le Luminex 100 (qu'il repose en paix) ;

Vincent, pour les cours d'introduction au HLA et pour ta première relecture soignée ;

Pauline, pour ton compagnonnage bienveillant ;

Olivier, à qui j'ai trop souvent volé le bureau ;

Virginie pour ton aide technique ;

Olivier et Maximilien, mes co-internes de Valenciennes, qui m'ont dégagé du temps afin que je puisse rédiger en toute sérénité ;

Guillaume pour tes illustrations personnalisées et ta maîtrise de Photoshop.

Merci à l'ensemble du Laboratoire d'Immunologie,

À ceux qui m'ont patiemment transmis leurs connaissances : Sylvain, Anne-Sophie, Séverine, Benjamin, Guillaume ;

À l'équipe du HLA : Céline, Ève-Marie, Tiffanie, Sylviane, Dominique, Antoine, Cédric, les deux Pascale ;

Aux techniciens et aux secrétaires avec qui j'ai beaucoup apprécié travailler.

Aux biologistes qui m'ont appris l'amour du travail bien fait, et toujours dans une bonne ambiance (Thomas, Emmanuelle, Christophe, Anne, Antoine, Sylvie, Catherine, Amel, Benoît...) et à celle qui me formera au prochain semestre à Nancy.

Aux membres de la goutte épaisse : Nicolas, Audrey, Malicka, Caroline. Je vous souhaite le meilleur pour les années à venir ! J'espère pouvoir bientôt vous encourager pour votre thèse.

Aux joyeux trublions du semestre d'hiver 2017 : Zoë, Stéphanie, Belkacem, Jean-Baptiste.

À tous ceux qui m'ont appelée Déborah durant mes stages.

À mes parents,

Merci de m'avoir faite avec des yeux en bon état pour lire toutes les publications utiles à ce travail, et avec un cerveau capable de les comprendre.

À nos prochaines vacances en famille (pour mes 30 ans !)

À mes deux petites sœurs chéries, qui me manquent tous les jours.

À ma famille (les Ch'tis et les Lorrains !) à qui je n'arrive toujours pas clairement à expliquer mon futur métier.

Merci à ceux qui ont fait le déplacement et à ceux qui n'ont pas pu le faire.

Et un grand merci à ma tante, Pascale, je vais devenir ta consœur et j'en suis fière (même si ça ne nous rajeunit pas...)

À mes amis nancéiens : Enguerrand, Guillaume, Nina, Ninon, Anthony, Marie-Eugénie, Caroline, Marion. Et à Émilie sans qui je n'aurais jamais aussi bien réussi mon concours de l'internat.

À Raoulette, mon chat, grâce à qui les réveils étaient matinaux et propices à l'écriture.

À JiDé, mon amour,

Pour ta force et ta bonne humeur.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	17
A. <i>Human Leukocyte Antigen</i>	17
1. Généralités	17
2. Quelques notions de nomenclature	18
3. Expression et fonction des molécules HLA	19
a) HLA de classe I	20
b) HLA de classe II	20
4. Structure des molécules HLA	21
a) HLA de classe I	22
b) HLA de classe II	23
5. HLA et greffe d'organes	24
a) Physiologie de la reconnaissance du CMH par le TCR	24
(1) Interaction CMH-peptide	24
(2) Interaction CMH-TCR.....	25
b) Le rejet de greffe	27
B. Les anticorps anti-HLA	30
1. Origine, immunisation, synthèse	30
a) Grossesse.....	31
b) Transfusion	31
c) Transplantation	32
d) Anti-HLA naturels	32
2. Structure.....	32
3. Épitopes et éplets.....	34
4. Pathogénicité	36
5. Les anticorps anti-« HLA dénaturé ».....	38

C. Dépistage et identification des anticorps anti-HLA	40
1. Techniques disponibles	40
a) La microlymphocytotoxicité	41
b) La cytométrie en flux (CMF)	41
c) ELISA	42
d) Luminex	42
(1) Principe.....	42
(2) Avantages et inconvénients	44
e) Comparaison des méthodes.....	47
2. Stratégie employée au laboratoire de Lille.....	47
3. Difficultés rencontrées au laboratoire.....	49
D. Objectifs de notre travail	50
II. MATERIELS ET METHODES	52
A. Population étudiée	52
1. Suspicion d'anti-dHLA de classe I.....	53
2. Suspicion d'anti-dHLA de classe II.....	53
B. Sérums témoins de Bordeaux.....	53
C. Réactifs et protocole technique	54
1. <i>Single Antigen</i> classique.....	54
a) Prétraitement des sérums.....	54
b) Réalisation du SA dans les conditions classiques.....	54
(1) Dépôt des billes dans les puits et préparation de la solution de lavage.....	55
(2) Dépôt des sérums et ajout du conjugué	55
2. Protocole de dénaturation à l'acide	56
a) Préparation du tampon de dénaturation.....	56
b) Dénaturation et préparation des billes témoin	56
3. Protocole de dénaturation à la chaleur	57

D. Luminex.....	57
E. Post-analytique.....	57
1. Analyse via le logiciel HLA Fusion	57
a) Validation du bon déroulement du test.....	57
b) Interprétation des résultats du sérum	58
2. Définition d'un Ac anti-dHLA de classe I et II.....	59
3. <i>HLA Matchmaker</i>	59
4. Crossmatch par cytométrie en flux.....	60
5. Méthodes statistiques.....	61
III. RESULTATS.....	62
A. Caractéristiques des échantillons étudiés pour la classe I	62
B. Validation du protocole technique	62
1. Utilisation de l' <i>Adsorb out</i>	62
2. Concordances obtenues avec des sérum témoins de Bordeaux (pour le protocole de dénaturation à l'acide)	63
3. Protocole de dénaturation à la chaleur	64
C. Impact sur les contrôles	65
D. Identification des anti-dHLA de classe I	67
1. Prévalence au sein de la population	67
2. Spécificités des anti-dHLA de classe I	68
3. Étude du dépistage	69
E. Identification des anti-dHLA de classe II	70
F. Matchmaker	71
G. Crossmatch en CMF	71
IV. DISCUSSION	72
A. Réflexions sur les billes SA1	72
B. Validation des lots de SA1.....	74

C. Dénaturation par la chaleur	75
D. Seuil proposé pour caractériser un anti-dHLA.....	75
E. Retrait des spécificités du logiciel CRISTAL	76
F. Identification des anti-dHLA : pour quels patients ?	77
G. Apports de l'étude dans la pratique du laboratoire de Lille	78
H. Forces et limites de notre travail.....	81
V. CONCLUSION	82
BIBLIOGRAPHIE.....	83
ANNEXES	93

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Position des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité sur le bras court du chromosome 6	18
Figure 2 : Représentation schématique et moléculaire du HLA de classe I	22
Figure 3 : Représentation schématique et moléculaire du HLA de classe II	23
Figure 4 : Interaction CMH-peptide	24
Figure 5 : Interaction CMH-TCR	25
Figure 6 : Implication des corécepteurs dans la liaison CMH-TCR	26
Figure 7 : Mécanismes du rejet de greffe	29
Figure 8 : Schéma classique d'un anticorps	33
Figure 9 : Survie du greffon rénal selon la présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le HLA du donneur (hors donneur vivant, 2009-2015)	37
Figure 10 : HLA de classe I sous forme native (à gauche) et sous forme dénaturée (à droite).....	39
Figure 11 : Principe de la technologie Luminex pour le SA	43
Figure 12 : Effet « prozone ».....	45
Figure 13 : Image obtenue par le logiciel HLA Fusion	58
Figure 14 : Bases structurales d'un mismatch HLA-B51	60
Figure 15 : Corrélations des valeurs obtenues par les deux protocoles testés.....	65
Figure 16 : Moyennes des MFI de la bille PC dans les conditions N et D.....	66
Figure 17 : Prévalence des anti-dHLA de classe I.....	67
Figure 18 : Image Luminex, patient 23	68
Figure 19 : Image Luminex, patient 4	68
Figure 20 : Spécificités des anti-dHLA de classe I	69
Figure 21 : Répartition des différentes catégories de billes.....	69
Figure 22 : Comparaison des résultats obtenus pour les différents fournisseurs	73
Figure 23 : Impact des anti-dHLA sur le TGI	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Allèles et protéines HLA	17
Tableau 2 : L'alloréactivité dans le rejet de greffe	27
Tableau 3 : Principales caractéristiques des immunoglobulines.....	34
Tableau 4 : Comparaison des techniques de recherche d'anticorps anti-HLA	47
Tableau 5 : Caractéristiques de la population étudiée.....	52
Tableau 6 : Caractéristiques de la population étudiée pour la classe I.....	62
Tableau 7 : Concordance des résultats entre Bordeaux et Lille	63
Tableau 8 : Comparaison des protocoles de dénaturation sur deux sérums.....	64
Tableau 9 : Moyennes de MFI obtenues pour les billes NC (Negative Control) et PC (Positive Control) dans les conditions N et D	65
Tableau 10 : Valeurs des billes de contrôle lors des manipulations effectuées pour l'identification des anti-dHLA de classe II	70

TABLE DES ABRÉVIATIONS

Ac : anticorps

ACm : anticorps monoclonal

ADCC : *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

Ag : antigène

Anti-dHLA : anticorps anti-« HLA dénaturé »

Anti-nHLA : anticorps anti-« HLA natif »

β 2m : bêta-2-microglobuline

BCR : *B Cell Receptor*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Conditions D : test réalisé avec des billes traitées à l'acide

Conditions N : test réalisé avec des billes non traitées

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DSA : *Donor Specific Antibody*

DTT : Dithiothréitol

EEQ : Évaluation Externe de la Qualité

Fab : Fragment "antigen binding"

Fc : Fragment "crystallizable"

HC : *Heavy Chain*

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

Ig : Immunoglobuline

LCT : Lymphocytotoxicité

LVAD : Left-Ventricular Assisted Device

MFI : *Mean Fluorescence Intensity*

PRA : *Panel Reactive Antibody*

SA : *Single Antigen*

SFHI : Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique

TCR : *T Cell Receptor*

TGI : Taux de Greffons Incompatibles

I. Introduction

A. Human Leukocyte Antigen

1. Généralités

L'une des bases du fonctionnement du système immunitaire adaptatif est la reconnaissance, par les lymphocytes T, du « soi » et du « non-soi ». Cette reconnaissance se fait via une interaction entre le récepteur du lymphocyte T (TCR) et une molécule présentant un antigène de nature peptidique : le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).

Le CMH humain, aussi dénommé HLA, « *Human Leukocyte Antigen* », a été mis en évidence dans les années 1950 par Jean Dausset¹. Il s'agit d'un système multigénique (plus de 200 gènes) dont l'une des principales caractéristiques est son polymorphisme (17 166 allèles à ce jour²).

Gène	Allèles	Protéines	Allèles nuls
<i>HLA-A</i>	3 968	2 781	181
<i>HLA-B</i>	4 828	3 501	146
<i>HLA-C</i>	3 579	2 490	128
<i>HLA-DRA</i>	7	2	0
<i>HLA-DRB1</i>	2 103	1 520	51
<i>HLA-DRB3</i>	145	119	4
<i>HLA-DRB4</i>	66	52	7
<i>HLA-DRB5</i>	54	48	3
<i>HLA-DQA1</i>	94	35	3
<i>HLA-DQB1</i>	1 142	774	31
<i>HLA-DPA1</i>	53	24	0
<i>HLA-DPB1</i>	894	641	22

Tableau 1 : Allèles et protéines HLA

D'après hla.alleles.org (m. à j. : juin 2017)²

Les gènes HLA sont localisés sur le bras court du chromosome 6 (Figure 1) et on différencie classiquement deux régions codant pour les molécules HLA : la région codant pour les molécules de classe I (HLA-A, -B et -C) et la région codant pour les molécules de classe II (HLA-DRA1, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 et -DPB1). Il existe d'autres locus pouvant avoir un intérêt dans les analyses d'histocompatibilité, mais leur impact en clinique n'est pas encore démontré.

Les gènes situés dans la région de « classe III » codent pour des protéines ayant des fonctions et structures différentes des molécules de classe I et II.

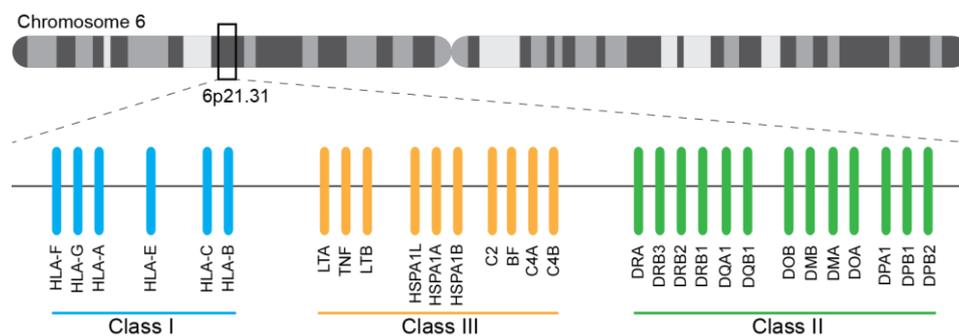


Figure 1 : Position des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité sur le bras court du chromosome 6

D'après Biorigami.com³

2. Quelques notions de nomenclature

Lors d'un typage obtenu par biologie moléculaire, l'écriture d'un allèle selon la nomenclature en vigueur se présente de la manière suivante (exemple) :

HLA-B*39:01:01:02L

On peut voir qu'il s'agit d'un gène codant pour une molécule du CMH (préfixe HLA-), du locus B, dont le typage a été obtenu par biologie moléculaire (symbole *). Les chiffres qui suivent représentent le niveau de résolution du typage (appelé *digits*). Chaque deux-points séparateur délimite un champ :

- Le premier champ correspond à un niveau de résolution « 2 digits » (résolution générique ou basse résolution) représentant un ensemble d'allèles codant pour des protéines reconnues par les mêmes anticorps. Ce niveau de résolution est obtenu soit par biologie moléculaire (symbole *), soit par sérologie et il est requis dans le cadre d'une greffe d'organe ;
- Le deuxième champ correspond à un niveau de résolution « 4 digits » représentant un ensemble d'allèles codant pour la même protéine ;
- Le troisième champ (« 6 digits ») permet de différencier les allèles HLA-B*39:01 présentant des mutations synonymes (la séquence ADN des exons est différente mais la séquence protéique est la même) ;
- Le quatrième champ (« 8 digits ») différencie les allèles HLA-B*39:01:01 selon leurs mutations introniques.

Enfin, une lettre peut apporter une précision supplémentaire, telle qu'une expression moins forte (L pour *low*), ou une non-expression (N pour allèle nul)².

La résolution dite « allélique » correspond au niveau le plus précis possible pour désigner un allèle. Selon la description plus ou moins complète et le polymorphisme de l'allèle, elle peut être notée en 4 champs (ex. : A*01:01:01:01), en 3 champs (ex. : B*38:01:01) ou en 2 champs (ex. : C*07:326).

La résolution dite « haute » correspond à un typage sans ambiguïté dans les exons-clefs (2+3 pour la classe I, 2 pour la classe II) et sans ambiguïté concernant un allèle nul. Il s'agit de la résolution exigée pour la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

3. Expression et fonction des molécules HLA

La transmission des gènes HLA se fait selon un modèle de codominance : chaque individu hérite « en bloc » d'un haplotype HLA maternel et d'un haplotype paternel qui s'expriment tous les deux et déterminent le groupage HLA. L'haplotype est un ensemble d'allèles situés sur un même chromosome.

Étant donné le grand polymorphisme allélique du système HLA, les individus sont majoritairement hétérozygotes pour chaque gène, et expriment alors de 12 à 14 protéines HLA différentes à la surface de leurs cellules (pour les principaux locus considérés)⁴. Les molécules du CMH présentent aux lymphocytes une partie d'un antigène protéique (un peptide), qui diffère selon l'allèle HLA exprimé. En effet, le peptide présenté est « enchâssé » au sein de la molécule HLA et provient d'une protéine (endogène ou exogène).

Ce polymorphisme trouve tout son intérêt dans la protection d'une population : comme les différences de groupe HLA impliquent la présentation d'un peptide propre à chacun, l'existence d'un grand nombre d'allèles assure qu'il subsistera au moins un membre d'une population qui sera capable de présenter un peptide microbien particulier et déclencher une réponse immunitaire efficace contre un agent pathogène responsable d'une épidémie⁵⁻⁷.

a) HLA de classe I

Les molécules HLA de classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme et des plaquettes, à des densités différentes selon le type de cellules ou le contexte cytokinique (inflammation)^{6,7}. Leur principal interlocuteur est le lymphocyte T CD8 et elles sont à l'origine du déclenchement du mécanisme effecteur de l'immunité médiée par ce dernier, grâce à leur fonction de présentation de peptides endogènes (protéines naturellement présentes dans la cellule, virales ou tumorales). Elles interagissent également avec les lymphocytes NK⁴.

b) HLA de classe II

L'expression des molécules HLA de classe II est limitée aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : cellules dendritiques, monocytes, macrophages, lymphocytes B ; aux lymphocytes T activés ; et aux cellules endothéliales. Là encore, la densité dépend de l'environnement cytokinique (interféron γ), mais aussi de l'état d'activation des CPA. Elles interagissent avec le lymphocyte T CD4 en présentant des peptides exogènes (peptides internalisés par la CPA)⁴.

4. Structure des molécules HLA

Les molécules du CMH ne se lient qu'à des antigènes de nature peptidique. Ceci est dû au fait que le peptide est un élément indispensable à la stabilité de la molécule à la membrane de la cellule et, par conséquent, l'étape d'assemblage avec le peptide se fait directement lors de la biosynthèse des molécules HLA⁵.

Les molécules HLA sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques. Elles sont composées de deux chaînes, et leur domaine distal est constitué d'un « sillon de présentation », permettant l'enchâssement du peptide présenté par la molécule. Leur conformation physicochimique dépend de l'allèle exprimé, et détermine la spécificité du peptide présenté. Une bonne complémentarité CMH-peptide est nécessaire pour l'expression des molécules HLA à la membrane cellulaire⁸.

Les molécules HLA de classe I et II diffèrent essentiellement par la structure de leur domaine extracellulaire.

a) HLA de classe I

Le domaine extracellulaire de la molécule HLA de classe I est composé de deux parties :

- La partie proximale qui comprend un domaine α_3 associé à la β_2 -microglobuline (protéine invariante n'appartenant pas au système HLA). La boucle α_3 est le domaine de liaison au CD8 du lymphocyte T⁵ ;
- La partie distale qui comprend un domaine α_1 et un domaine α_2 , composant le sillon de présentation du peptide : il se présente sous la forme d'un « plancher », qui est la région se liant directement au peptide via des résidus polymorphiques, et des côtés et sommets du sillon, qui entrent en contact avec le TCR ;
- Les trois domaines α_1 , α_2 et α_3 constituent la chaîne lourde (HC), codée par les locus HLA-A, B, C ; tandis que la β_2 -microglobuline constitue la chaîne légère. Elles sont liées entre elles de manière non covalente.

Le sillon des molécules HLA de classe I est fermé à ses deux extrémités et cette caractéristique de conformation a pour conséquence que seuls les plus petits peptides (en moyenne 9 acides aminés) peuvent venir s'accrocher dans le sillon⁸ (Figure2).

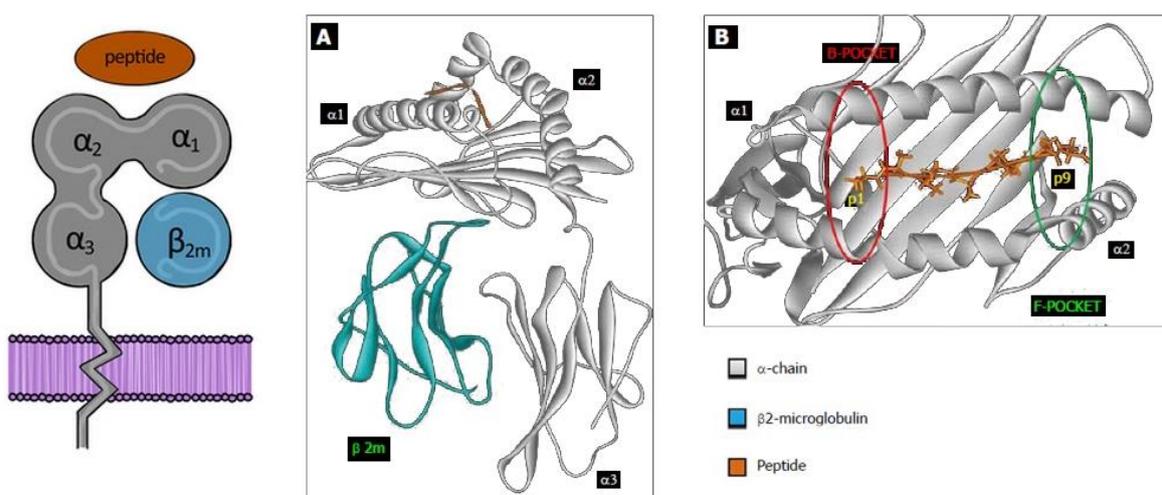


Figure 2 : Représentation schématique et moléculaire du HLA de classe I

D'après G. Fricaud et A. Grifoni⁹

b) HLA de classe II

Les molécules DR, DQ et DP sont chacune codées par deux gènes : DRA1 et DRB1, DQA1 et DQB1, DPA1 et DPB1. Les gènes "A" codent la chaîne α , les gènes "B" codent la chaîne β . Ces molécules comportent, comme la molécule HLA de classe I, deux parties :

- Le domaine proximal composé des régions α_2 et β_2 (β_2 constitue le site de liaison au corécepteur CD4 du lymphocyte T) ;
- Le domaine distal composé de α_1 et β_1 , déterminant le sillon de présentation du peptide. Il est constitué d'un plancher et de côtés ouverts ;
- Les chaînes α et β sont liées entre elles de manière non covalente (Figure 3).

Les gènes codant pour les chaînes α des molécules HLA de classe II sont moins polymorphes que celles codant pour les chaînes β (par exemple, la chaîne α du locus DR est considérée comme presque monomorphe)⁵.

Le sillon des molécules HLA de classe II est plus ouvert que celui des molécules de classe I, ce qui permet à des peptides plus grands (de 12 à 25 acides aminés) de venir s'enchâsser à l'intérieur de celui-ci. Cependant, seuls 9 à 10 acides aminés sont liés au plancher du sillon, et les autres dépassent des extrémités¹⁰.

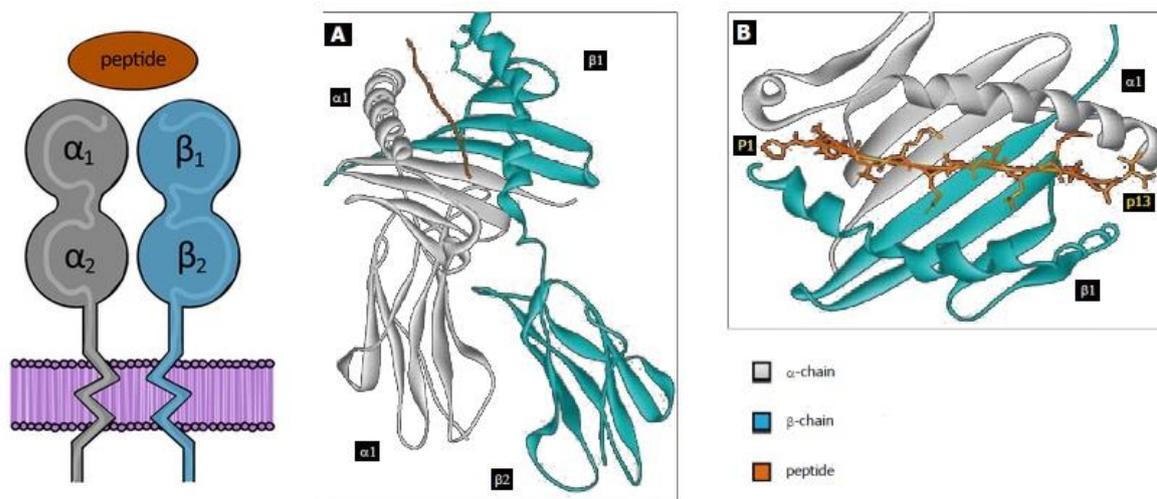


Figure 3 : Représentation schématique et moléculaire du HLA de classe II

D'après G. Fricaud et A. Grifoni⁹

5. HLA et greffe d'organes

a) Physiologie de la reconnaissance du CMH par le TCR

(1) Interaction CMH-peptide

Du fait de la structure du sillon, un seul peptide est présenté à la fois par la molécule du CMH, mais elle possède la propriété d'en présenter plusieurs variétés : en effet, le plancher du sillon comporte des poches qui se lient aux chaînes latérales des acides aminés du peptide. Ces poches sont les domaines les plus polymorphiques de la molécule. Elles sont au nombre de deux ou trois et ne reconnaissent que certaines propriétés physicochimiques particulières, ce qui explique que plusieurs peptides différents puissent s'enchaîner dans le sillon (Figure 4). On parle alors de spécificité large pour la liaison peptidique.

On comprend alors comment la multiplicité des peptides de l'organisme peut être présentée par seulement quelques molécules HLA différentes.

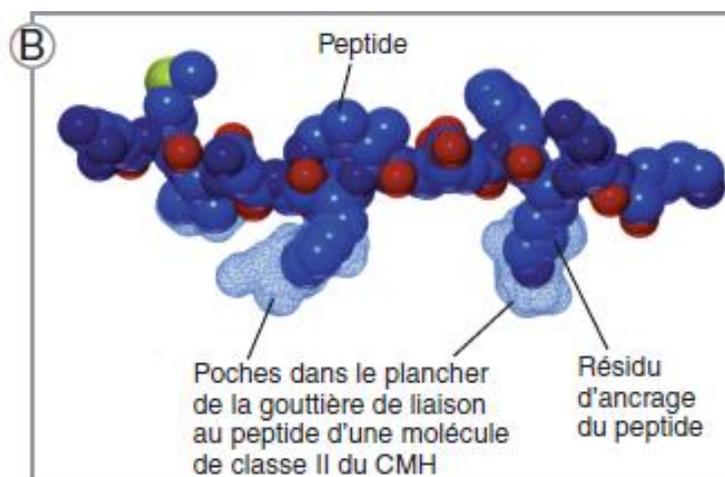


Figure 4 : Interaction CMH-peptide

D'après Scott « Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues »¹¹

(2) Interaction CMH-TCR

De son côté, le lymphocyte T possède une caractéristique nommée « restriction par le CMH » : les lymphocytes T CD8 ne reconnaissent que les peptides présentés par le CMH de classe I tandis que les lymphocytes T CD4 ne reconnaissent que les peptides présentés par le CMH de classe II (Figure 5).

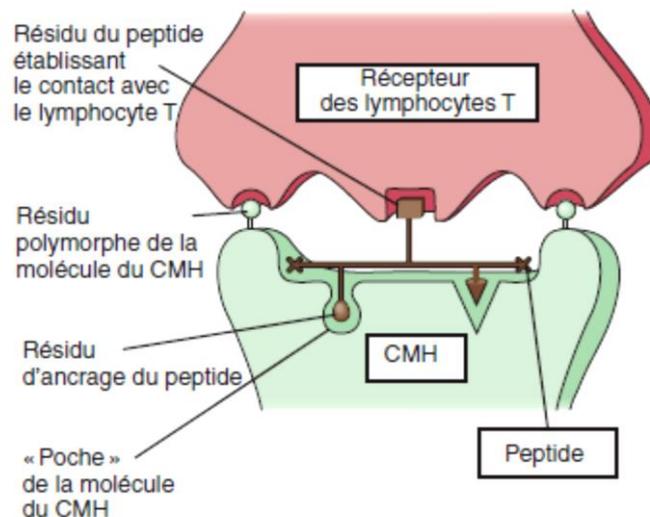


Figure 5 : Interaction CMH-TCR

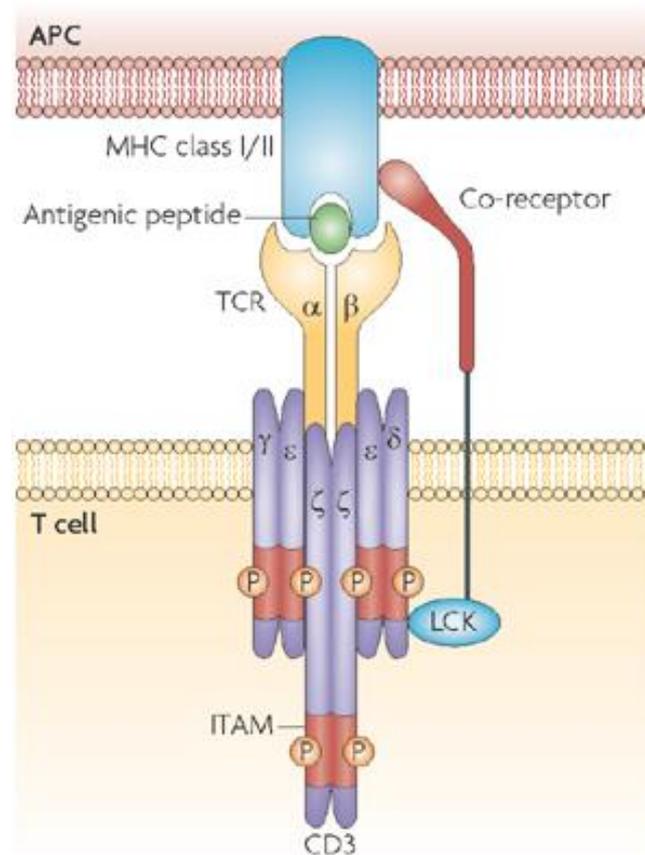
D'après « Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique »⁵

En réalité, lors de la reconnaissance des molécules CMH par le lymphocyte T, celui-ci reconnaît un ligand constitué de différentes parties :

- Des acides aminés du peptide antigénique présenté ;
- Des acides aminés des domaines distaux du HLA.

Cette présentation particulière explique que la même protéine puisse être présentée de deux manières par deux individus différents et est à l'origine des différences de réponses immunitaires et réponses vaccinales (bons et mauvais répondeurs qui seraient en fait « présentateurs » ou « non-présentateurs »)⁸.

Pour activer le lymphocyte T, il est nécessaire de faire intervenir un corécepteur : c'est le rôle des molécules CD4 et CD8, qui se lient aux domaines proximaux des molécules HLA. L'interaction TCR-CMH est également renforcée par les molécules d'adhérence et de costimulation (Figure 6).



Nature Reviews | Immunology

Figure 6 : Implication des corécepteurs dans la liaison CMH-TCR

D'après Gascoigne et al., « Do T cells need endogenous peptides for activation? »¹²

Les étapes de reconnaissance par le TCR et son corécepteur sont simultanées et constituent le premier signal induisant l'activation du lymphocyte T. Celle-ci se fait via les protéines CD3 et ζ , qui permettent la transmission des signaux biochimiques à l'intérieur de la cellule⁵.

b) Le rejet de greffe

Le rejet de greffe trouve son origine dans un conflit immunologique existant entre les cellules du donneur et celles du receveur : on parle d'alloréactivité. Cette réaction est observable depuis le début des transplantations. Elle est entraînée, à sa première étape, par les lymphocytes T alloréactifs du receveur¹³. Elle fait également intervenir des alloanticorps de haute affinité dont la production dépend des lymphocytes T auxiliaires⁵.

L'induction de la réponse immunitaire contre les greffons peut être classée en deux types :

- L'alloréactivité indirecte : les protéines allogéniques du donneur sont présentées par les CPA et le CMH du receveur aux lymphocytes T alloréactifs du receveur (qui peuvent être des lymphocytes T CD4 ou CD8) ;
- L'alloréactivité directe : les lymphocytes T alloréactifs du receveur reconnaissent les molécules du CMH du donneur sur les CPA du greffon⁵.

Il semblerait que la voie directe soit davantage impliquée dans les rejets aigus tandis que la voie indirecte jouerait un rôle dans les rejets plus tardifs⁵

Une troisième voie, appelée semi-directe, fait intervenir l'endocytose des complexes CMH-peptide par les CPA du receveur. Le lymphocyte T alloréactif reconnaîtra alors le CMH et peptide du donneur (Tableau 2).

Voie	TCR	CPA	CMH	Peptide
Indirecte	Receveur	Receveur	Receveur	Donneur
Semi-directe	Receveur	Receveur	Donneur	Donneur
Directe	Receveur	Donneur	Donneur	Donneur

Tableau 2 : L'alloréactivité dans le rejet de greffe

En transplantation d'organe, on distingue classiquement trois types de rejets en fonction de leur cinétique d'apparition et de leurs caractéristiques cliniques (Figure7) :

Le rejet hyperaigu : il survient en général dans les minutes à heures qui suivent la revascularisation du greffon et il est provoqué par des anticorps préexistants à la greffe (anticorps préformés dirigés contre le HLA du donneur ou IgM naturelles des groupes sanguins) qui reconnaissent des cibles situées sur les cellules endothéliales du greffon^{14,15}. Il s'ensuit alors une activation du complément, des lésions thrombotiques ainsi qu'une nécrose ischémique. Ce rejet est aujourd'hui largement évité grâce au suivi immunologique des patients en attente de greffe et à l'utilisation de techniques de crossmatch¹⁶.

Le rejet aigu : survenant du 4^e jour jusqu'à quelques mois suivant la transplantation, il est composé de quatre phases majeures qui sont la reconnaissance, l'activation, l'infiltration et la destruction du greffon¹³. Les thérapies immunosuppressives actuelles visent à empêcher la survenue de ce type de rejet, cependant il reste la principale cause des échecs précoces de transplantation. Le diagnostic peut être confirmé par l'étude anatomopathologique qui distinguera le rejet humoral (lésions vasculaires, dépôts de fractions du complément) et le rejet cellulaire (infiltration inflammatoire). Les deux types de rejets peuvent être simultanés. Par exemple, dans le cadre de la greffe de rein, le rejet aigu humoral est défini par la survenue d'une insuffisance rénale associée à des lésions anatomopathologiques ainsi qu'à la présence de *Donor Specific Antigen*¹⁷ (DSA, voir chapitre suivant).

Le rejet chronique : le mécanisme est moins bien compris et ce rejet apparaît entre plusieurs mois et plusieurs années suivant la greffe. Il est caractérisé par une dégradation progressive et inéluctable de la fonction de l'organe greffé avec survenue d'une fibrose. Ceci entraîne une vasculopathie chronique par obstruction. Ce type de rejet fait intervenir des facteurs immunologiques (dont la présence d'anticorps anti-HLA)¹⁶.

Les voies de pathogénicité des anti-HLA sont présentées plus loin dans cette introduction.

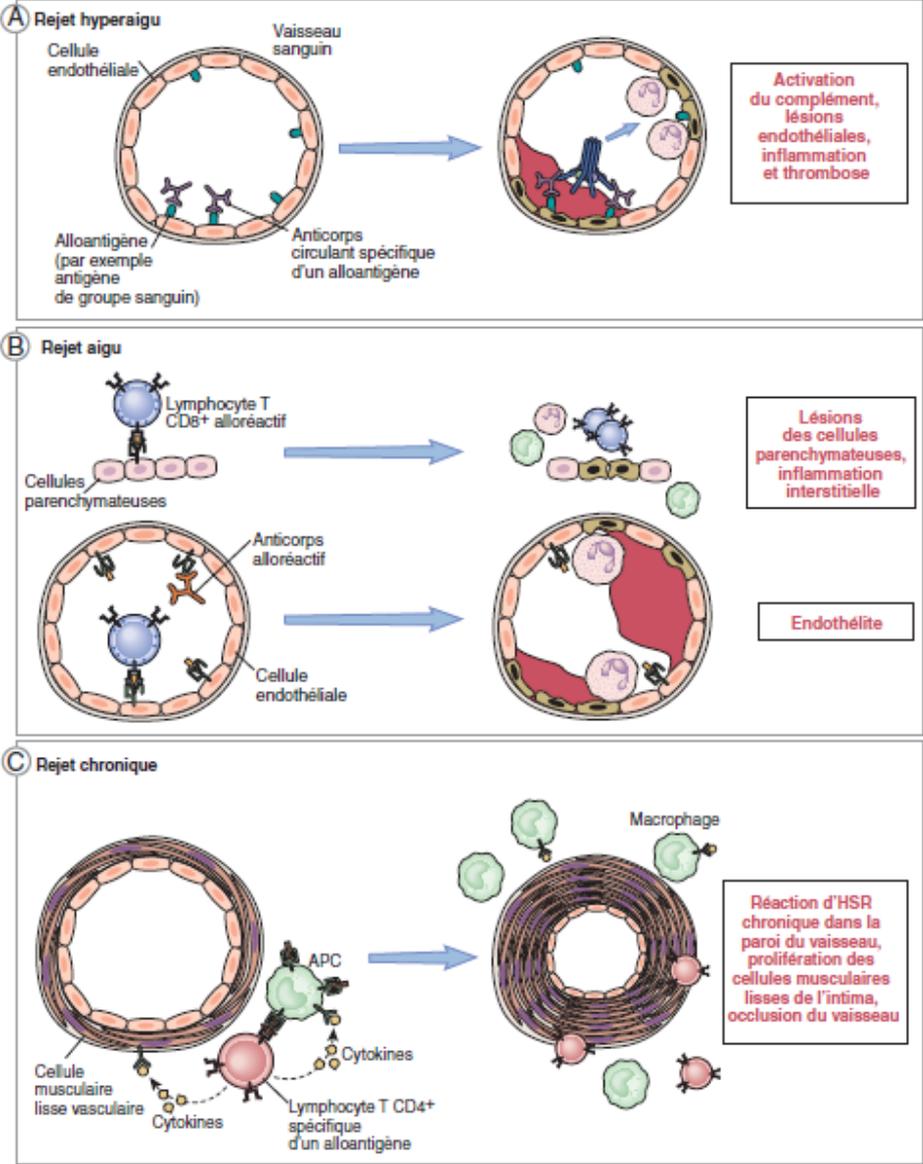


Figure 7 : Mécanismes du rejet de greffe

D'après « Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique »⁵

B. Les anticorps anti-HLA

1. Origine, immunisation, synthèse

L'immunisation anti-HLA est définie par la présence, dans le sérum d'un individu, d'anticorps dirigés contre les molécules du CMH. Les trois principales origines de l'immunisation anti-HLA sont la grossesse, la transfusion (principalement de concentrés plaquettaires) ainsi que la transplantation. Les principales étapes de la formation d'anticorps anti-HLA sont regroupées ci-dessous.

Tout commence par une exposition aux alloantigènes et l'activation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires via l'interaction BCR-antigène.

Puis, les lymphocytes B activés migrent dans la zone folliculaire où ils rencontrent les lymphocytes T CD4 activés : une interaction se crée via l'appui du CD40-CD40L et la sécrétion de cytokines. Ensuite, le lymphocyte B peut évoluer de deux manières :

- Migration vers les zones extrafolliculaires et production d'anticorps de faible affinité par les lymphocytes B différenciés en plasmablastes.
- Migration vers le centre germinatif et hypermutations somatiques avec switch isotypique puis sélection des clones les plus affins. Il s'ensuit une différenciation :
 - En lymphocytes B mémoires ;
 - Ou en plasmocytes qui secrètent des anticorps de haute affinité (à noter qu'une petite proportion de plasmocytes migrent dans la moelle osseuse où ils acquièrent une plus longue durée de vie et sont responsables de la sécrétion continue d'anticorps)^{18,19}.

Le contexte cytokinique intervient dans la coopération T-B, ce qui explique que certains individus réagissent différemment aux événements immunisants auxquels ils sont exposés.

Plusieurs études mettent en avant la transplantation comme évènement immunisant associé à la plus forte probabilité de développer un anti-HLA, suivie par la grossesse, puis la transfusion^{20,21}.

a) Grossesse

Lorsque l'on s'intéresse à la greffe de rein, la grossesse est le premier évènement immunisant auquel sont confrontés les patients sur liste d'attente. Il a été démontré que plus de 50 % des femmes développent un Ac anti-HLA après une grossesse, ceci concernant autant la classe I que la classe II, le facteur de risque majeur étant le nombre de grossesses²².

Le fœtus étant haploidentique à sa mère, l'immunisation se fait envers les antigènes du père, via l'existence d'un trafic cellulaire bidirectionnel entre le sang maternel et le sang fœtal²³. Les anticorps ainsi formés disparaissent quelques mois après l'accouchement, mais certains peuvent persister plus d'un an²⁴.

b) Transfusion

Les plaquettes et les cellules mononucléées expriment des antigènes HLA qui peuvent induire une immunisation chez le receveur, malgré les traitements de déleucocytation des produits sanguins. Des antigènes HLA libres ou adsorbés sur les globules rouges peuvent également être présents dans les produits sanguins transfusés^{25,26}. Ces réactions d'immunisation peuvent, par ailleurs, être la cause d'effets indésirables (réaction fébrile non hémolytique, état réfractaire)²⁷.

On considère qu'environ 10 % des patients peuvent développer un anticorps mesurable par technique solide directement après une transfusion, cependant les titres d'anticorps diminuent quelques mois après la transfusion et deviennent indétectables²⁸. Tout le monde n'est pas égal face à l'immunisation et il semblerait que le risque de développer un anti-HLA après transfusion dépende de plusieurs facteurs :

- L'âge : le risque est maximal chez l'enfant et diminue avec l'âge²⁹ ;
- Le nombre de transfusions : cette particularité affecte principalement les polytransfusés, comme les individus drépanocytaires³⁰ ;
- Le nombre de grossesses³¹ ;
- Une transplantation antérieure, et plus particulièrement, une détransplantation³².

c) Transplantation

Comme nous l'avons vu, la transplantation est associée à une très forte probabilité d'immunisation anti-HLA. L'incidence de survenue varie de 7 à 25 % selon les études³³⁻³⁵ et semblerait plus élevée dans la population pédiatrique³⁶.

Il est à noter que nous sommes actuellement de plus en plus confrontés au problème de la retransplantation et de son impact en termes d'immunisation HLA^{37,38}.

d) Anti-HLA naturels

En 2008, l'équipe de Morales-Buenrostro confirme l'existence d'anticorps anti-HLA naturels dans les sérums d'hommes n'ayant pas connu d'évènement immunisant. Ces anticorps proviendraient de réactivités croisées avec des microorganismes, des protéines ingérées lors de l'alimentation, ou des allergènes³⁹. Parmi les microorganismes impliqués, on peut citer le streptocoque⁴⁰ ainsi que certaines entérobactéries.

2. Structure

Sécrétés par les lymphocytes B, les anticorps (ou immunoglobulines) sont constitués de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, liées entre elles par des ponts disulfures (« immuno- » désigne la fonction et « -globuline » désigne la propriété électrophorétique). Physiologiquement, elles peuvent se trouver sous forme membranaire ou sous forme soluble. L'anticorps se présente classiquement sous la forme d'un « Y » dont la base constitue le fragment Fc (*crystallisable*) et les extrémités les fragments Fab (*antigen binding*).

- La région Fc est constituée uniquement des deux chaînes lourdes (Figure 8) et est à la base des fonctions effectrices et de l'activité physiologique de l'anticorps ;
- De son côté, la région Fab, constituée à la fois par une chaîne lourde et une chaîne légère, sert de site de liaison à l'antigène correspondant⁵ : l'anticorps reconnaît un épitope ou déterminant antigénique, c'est-à-dire la partie de l'antigène pouvant s'y associer par des liaisons non covalentes et réversibles ;
- Les chaînes lourdes et légères sont constituées à la fois de domaines constants (activité physiologiques non spécifiques de la liaison à l'antigène) et variables (fonction de liaison à l'antigène).

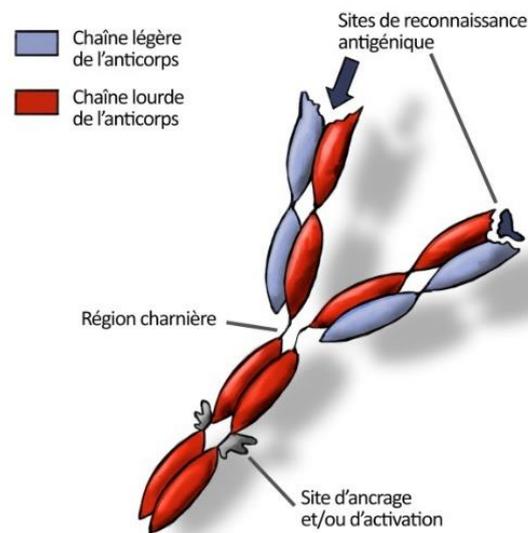


Figure 8 : Schéma classique d'un anticorps

D'après G. Fricaud

Il existe différents isotypes (classes) d'immunoglobulines, appelées IgG, IgA, IgM, IgD et IgE en fonction de la nature de leur chaîne lourde (γ , α , μ , δ , ϵ ,) et chaque classe présente des formes et des fonctions différentes. De plus, chaque chaîne lourde d'immunoglobuline possède la capacité de s'associer avec un des deux types de chaînes légères existantes (κ et λ). Au sein de certains isotypes et en fonction de leurs propriétés communes, on peut définir des sous-classes d'immunoglobulines. C'est le cas notamment pour les IgG (Tableau 3).

Isotype	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Chaîne lourde	γ	α	μ	δ	ϵ
Forme sécrétée	Monomère	Monomère ou dimère	Pentamère	Aucune	Monomère
Sous-classes	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	IgA1, IgA2	–	–	–
Fixation du complément	IgG1 : ++ IgG2 : \pm IgG3 : ++ IgG4 : –	–	+++	–	–
Concentration (g/L)	8-18	3,5-4,5	1-2	0-0,4	0,02-0,5
Fonctions	Oponisation, activation du complément, ADCC...	Immunité des muqueuses	Récepteur des LB* naïfs, activation du complément	Récepteur des LB* naïfs	Activation des mastocytes (hypersensibilité immédiate), défense antiparasitaire

Tableau 3 : Principales caractéristiques des immunoglobulines

*LB = lymphocyte B

3. Épitopes et éplets

Du fait de la grande taille d'un antigène par rapport à un anticorps, on sait que la portion Fab d'un anticorps ne reconnaît qu'une partie de l'antigène, appelée épitope. Comme nous l'avons vu précédemment, un épitope est une partie d'antigène pouvant s'associer au fragment Fab d'un anticorps. Il est constitué d'une séquence définie et très précise d'acides aminés, continue ou discontinue (épitope linéaire ou conformationnel). L'épitope conformationnel est constitué d'une séquence discontinue d'acides aminés, rapprochés dans l'espace grâce à des replis protéiques.

Dans les années 2000, l'équipe de Duquesnoy a défini la notion de « triplet », représentant un motif de 2 ou 3 acides aminés voisins dans la séquence des protéines du CMH et pouvant constituer un épitope immunogène⁴¹.

Par la suite, ce terme a été remplacé par « éplet », car un épitope peut aussi être constitué d'acides aminés voisins dans l'espace⁴². Actuellement, 300 épitopes de classe I et 292 de classe II sont décrits⁴³.

Ces notions sont à la base du développement de l'algorithme « *HLA Matchmaker* » qui a initialement été utilisé afin de permettre d'identifier des donneurs potentiels chez les patients poly-immunisés et de faciliter l'allocation d'organes. Plus l'immunisation est importante, plus il sera difficile de trouver un donneur « crossmatch négatif⁴⁴ ».

L'algorithme fonctionne grâce à deux idées de départ :

- Chaque antigène HLA représente un ensemble de triplets polymorphiques qui sont potentiellement immunogènes ;
- Un individu ne peut pas s'immuniser contre l'un de ses propres triplets⁴¹.

En considérant chaque allèle comme représentant une suite d'éplets et en alignant les séquences du donneur et du receveur, on peut définir les incompatibilités ou mismatches⁴⁵. Plusieurs études démontrent de manière intéressante, que chercher à respecter un match total des triplets n'aurait pas d'intérêt en terme de survie du greffon, cependant, un mismatch au niveau des triplets implique un impact délétère⁴⁵. Il est donc primordial de s'assurer que le nombre de mismatches (= charge épitopique), ne soit pas trop élevé.

Cette approche « épitopique » permet de disposer d'une analyse plus fine en termes d'attribution d'organes ou de suivi immunologique post-greffe et pourrait être utilisée dans les greffes de rein pédiatriques.⁴⁶ Elle permet également d'expliquer un phénomène connu depuis la fin des années 1960⁴⁷ et appelé « CREG » (*cross-reactive epitope groups*). Il a été observé qu'un anticorps anti-HLA pouvait réagir avec plusieurs molécules codées par des allèles différents. Cette réactivité est expliquée par le fait que les molécules HLA peuvent partager un même épitope (appelé épitope public, en opposition aux épitopes privés qui sont présents sur un seul Ag). Les anticorps dirigés contre les épitopes publics reconnaîtront alors tous les antigènes HLA qui portent cet épitope⁴⁸. Ceci peut expliquer que l'immunisation contre un antigène HLA donné, peut induire la synthèse d'Ac qui seront réactifs envers des Ag que l'individu n'a jamais rencontrés^{49,50}.

4. Pathogénicité

Lorsqu'on évoque les anticorps anti-HLA dans le cadre d'un rejet humoral, on emploie souvent le terme *Donor Specific Antibodies* (DSA). Les DSA sont une cause importante d'échec ou de rejet de greffe^{33,51} (Figure 9) et ils peuvent apparaître à deux moments différents :

- Soit ces anticorps existent avant la greffe, on parle alors de DSA préformés. Ils sont associés à un risque de rejet précoce du greffon, notamment le rejet hyperaigu^{52,53}.
- Soit ils apparaissent après la greffe⁵⁴, ce sont des DSA *de novo* ou néoformés, impliqués dans les rejets plus tardifs (aigus et chroniques). Ils sont souvent dirigés contre des locus de classe II, plus particulièrement le DQ⁵⁵. Leur apparition n'est pas systématique et peut être liée aux facteurs de risque suivants :
 - Nombre de mismatches important, notamment au locus DQ
 - Traitement immunosuppresseur mal équilibré ou inadéquat
 - Contexte inflammatoire (infection virale, rejet cellulaire, ischémie...)
- Cependant, il convient de considérer le rejet humoral comme une affection évolutive et chronique, liée à la présence des DSA^{4,56}. En effet, le rejet humoral infraclinique prépare au rejet humoral chronique par un continuum des lésions engendrées¹⁷.

Il est important d'identifier et de classer les DSA afin d'effectuer un suivi immunologique efficace du patient : en pré-greffe pour éviter l'attribution d'un greffon non compatible, et en post-greffe pour prédire le risque de lésions ou de rejet⁵⁷.

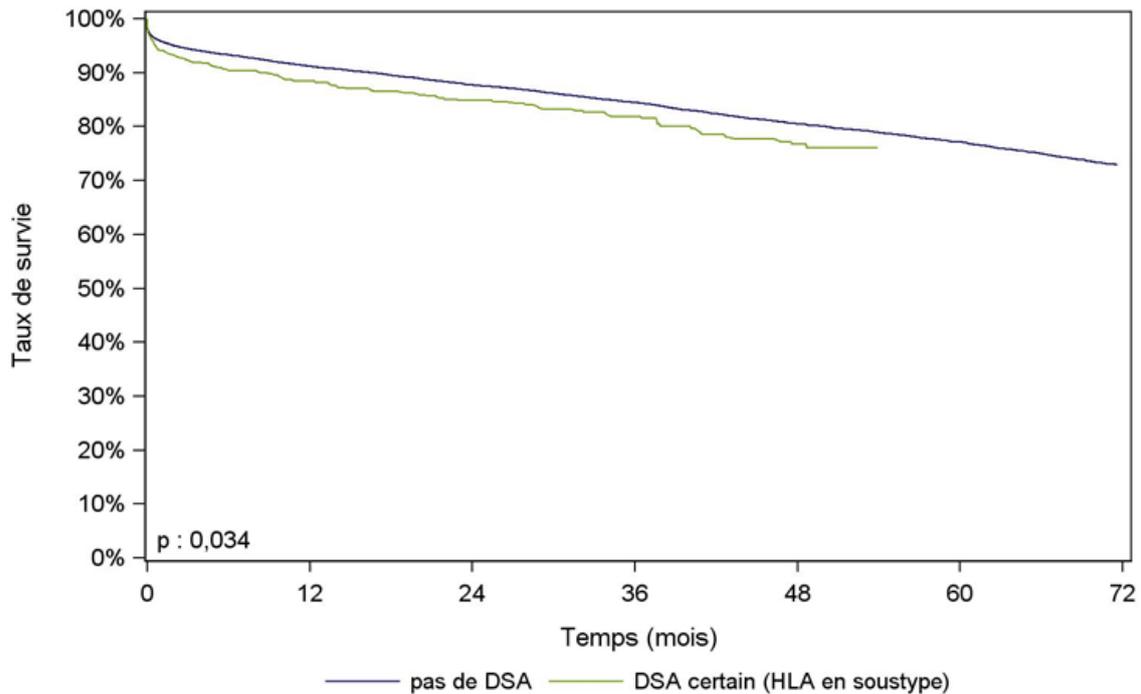


Figure 9 : Survie du greffon rénal selon la présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le HLA du donneur (hors donneur vivant, 2009-2015)

D'après le rapport de l'ABM 2016⁵⁸

Actuellement, on considère que les DSA de type IgM, malgré leur capacité à fixer le complément, ne sont pas délétères pour le greffon⁵⁹. Les IgM ne sont détectées au laboratoire que par la technique de lymphocytotoxicité. Cependant, il semblerait que les IgM soient prédictives de rejets de rein et de maladie coronaire du greffon cardiaque⁶⁰.

Les signes cliniques ainsi que la cinétique du rejet sont très fortement corrélés à la nature des DSA (sous-classe d'IgG, capacité à lier le complément). C'est pourquoi il est important d'étudier leurs caractéristiques.

Plusieurs études ont confirmé que les DSA néoformés ayant la capacité de fixer le C1q étaient associés à un risque plus élevé de rejet humoral et de lésions tissulaires^{61,62}. En 2016, une équipe de Bordeaux a étudié l'évolution de plusieurs greffes de rein sur dix ans et a montré que les DSA, qu'ils fixent le C1q ou non, sont associés au risque de rejet à long terme, avec toutefois un rejet plus précoce (de deux à cinq ans) pour les DSA fixant le complément³⁵.

Les sous-classes d'IgG n'ont pas toutes la même capacité à activer le complément et à recruter, via leur fragment Fc, des cellules effectrices de l'immunité. Classiquement, les IgG1 et 3 activent mieux le complément, notamment l'IgG3⁵⁷, qui a été décrite comme associée à des risque de rejets de rein et de foie^{63,64}. L'étude des sous-classes est possible grâce à l'utilisation de conjugués spécifiques.

Récemment, Viglietti *et al.*⁶⁵ ont montré que posséder les informations sur la sous-classe d'Ig et la capacité à lier le complément, en plus de l'intensité moyenne de fluorescence du DSA (voir le chapitre « Dépistage et identification »), pourrait permettre d'améliorer l'évaluation du risque de rejet chez plus de 60 % des patients en greffe rénale : ceci pourrait constituer un outil diagnostique non invasif, permettant la mise en route d'un suivi précoce ou l'indication d'une biopsie.

5. Les anticorps anti-« HLA dénaturé »

Nous avons vu que l'étude menée par Morales-Buenrostro en 2008 avait mis en évidence des anticorps anti-HLA naturels. L'observation d'une prévalence élevée de ces anticorps (plus de 60 %) avait mené à plusieurs hypothèses (confirmées par la suite)^{4,39} :

- Il existe deux formes d'anticorps anti-HLA de classe I naturels :
 - les uns reconnaissent des épitopes accessibles à la surface de la molécule HLA « native » (anti-nHLA) ;
 - les autres reconnaissent des épitopes cryptiques, accessibles uniquement lorsque la molécule HLA se trouve dans une conformation « dénaturée » (anti-dHLA)⁶⁶. Cette conformation peut apparaître après dégradation ou par malformation ;
 - cette distinction est également valable pour les anticorps allogéniques⁶⁷.

- Ces épitopes ont été décrits grâce à l'utilisation du traitement à l'acide, connu pour dénaturer les molécules HLA de classe I⁶⁸ : cette conformation dénaturée est appelée ainsi car la molécule HLA de classe I dénaturée est dépourvue de peptide et de β_2m ^{4,69}. Il ne subsiste alors que la chaîne lourde de la molécule, composée des trois domaines α (Figure 10).
- Les anti-dHLA ne sont pas pathogènes (contrairement aux anti-nHLA) et ne positivent pas les réactions de crossmatch⁶⁹⁻⁷².
- Les dHLA ne sont pas exprimés physiologiquement par les lymphocytes T et B de l'organisme, sauf en cas d'activation de ces derniers, par exemple en cas d'infection⁷³.

Par ailleurs, on sait que ces anti-dHLA sont la cause de réactions faussement positives observées en technique Luminex (voir le chapitre « Dépistage et identification »).

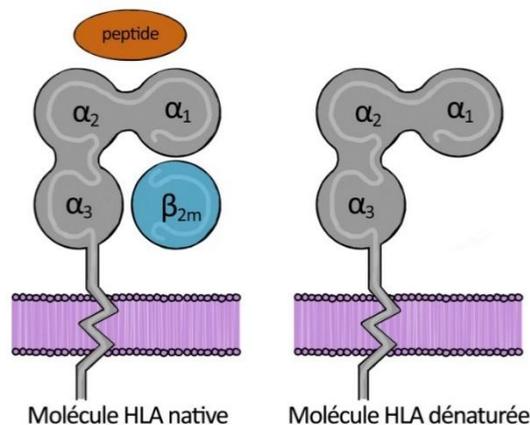


Figure 10 : HLA de classe I sous forme native (à gauche) et sous forme dénaturée (à droite)

*On observe le détachement de la bêta-2-microglobuline ainsi que du peptide
D'après G. Fricaud*

C. Dépistage et identification des anticorps anti-HLA

1. Techniques disponibles

L'intérêt du dépistage et de l'identification des anticorps anti-HLA est la bonne attribution du greffon au patient. Ceci permet de diminuer le risque de rejet, notamment hyperaigu.

Rappelons que l'Agence de Biomédecine recommande la « *recherche (dépistage) d'anticorps anti-HLA de classe I et de classe II sur au moins deux sérums à trois mois d'intervalle, par une technique sensible (cytométrie en flux, ELISA, Luminex, micropuces) et une fois par lymphocytotoxicité (LCT) sur lymphocytes T ou totaux, avec et sans DTT sur un panel représentatif* » en vue d'une inscription sur liste d'attente⁷⁴.

La stratégie appliquée est la suivante :

- Suivi immunologique trimestriel du patient, dès son inscription sur la liste de greffe. On peut alors rentrer les différentes spécificités contre lesquelles le patient est immunisé dans un logiciel d'attribution automatique des greffons (CRISTAL) et cela permet d'éviter de proposer à un patient un organe contre lequel il est immunisé. Ce suivi immunologique peut s'effectuer par microlymphocytotoxicité ou technologie de phase solide (ELISA, Luminex).
- Recherche immédiatement avant la greffe de DSA en utilisant le sérum du receveur et les lymphocytes du donneur : c'est le crossmatch. Il est réalisé par technique de microlymphocytotoxicité. Le crossmatch peut également être réalisé par cytométrie en flux, lors des greffes avec donneur vivant, et est alors effectué lors du bilan initial ainsi que dans la semaine qui précède la greffe.

a) La microlymphocytotoxicité

La microlymphocytotoxicité (LCT) reste la technique de référence pour le crossmatch⁷⁵ et peut également être utilisée pour le dépistage d'anticorps anti-HLA.

Concernant le dépistage, le sérum du patient est mis en contact avec un panel commercial de lymphocytes T et/ou B de typage connu auxquels est ajouté du complément de lapin, entraînant la lyse de la cellule en cas de formation d'un complexe antigène-anticorps. Cette lyse est évaluée grâce à l'utilisation de colorants vitaux et visualisée au microscope. À partir du panel de lymphocytes, on peut définir le « *Panel Reactive Antibody* » (PRA), rendu en %²⁷.

La sélection des lymphocytes T et/ou B est faite de manière à représenter la population. De ce fait, le PRA représente le degré d'immunisation du patient, et reflète la difficulté à trouver un donneur compatible.

La LCT est la seule technique de routine permettant de détecter des IgM, grâce à l'ajout de DTT (dithiothréitol). Cet agent possède la capacité de réduire les ponts disulfures qui permettent l'assemblage des IgM en pentamères et empêche alors la réaction de lyse. Ainsi, une réaction positive en LCT classique se négative en présence de DTT s'il s'agit d'IgM seules. De plus, la LCT représente un test fonctionnel et dépiste des anticorps pathogènes, puisqu'ils ont la capacité d'activer le complément. Cependant sa difficulté de standardisation et son manque de sensibilité ont conduit à l'élaboration d'autres techniques de dépistage et d'identification des Ac anti-HLA. Il est notamment difficile de déterminer la spécificité des anticorps anti-HLA mis en évidence.

b) La cytométrie en flux (CMF)

Cette approche a été développée dans les années 1980 pour pallier le problème de sensibilité de la LCT⁷⁶. Elle permet de détecter les anti-HLA de classe I et II dans le sérum du receveur, à l'aide de lymphocytes T et B du donneur marqués et l'ajout d'un conjugué (anti-IgG). Cette méthode est, là encore, difficilement standardisable. Cependant, son utilisation comme technique de crossmatch reste utile, notamment en pré-greffe avec donneur vivant²⁷.

c) ELISA

Il s'agit d'une technique réalisée en plaques. Les antigènes HLA sont fixés au fond de puits, puis on ajoute le sérum du patient. La réaction antigène-anticorps est détectée grâce à l'ajout d'IgG dirigées contre le fragment Fc des anticorps. Ces IgG sont couplées à une enzyme qui convertit un substrat incolore en produit coloré et la détection de cette coloration peut se faire par spectrophotométrie⁷⁷.

C'est une technique plus sensible et automatisable, ce qui représente un avantage par rapport à la LCT, cependant, le coût réactif est important. De plus, elle présente des délais de réalisation ne permettant pas sa mise en place pour des crossmatchs en urgence.

Elle est actuellement supplantée par une autre technologie de phase solide : le Luminex.

d) Luminex

(1) Principe

La technologie Luminex est une technique de fluorimétrie en flux utilisant des microbilles de polystyrène. Ces billes contiennent un mélange de deux fluorochromes dont le rapport permet une identification précise (code couleur propre à chaque bille). Les fluorochromes utilisés émettent dans le rouge (675 nm) et l'infrarouge (> 712 nm).

Lors d'un screening (SCR), c'est-à-dire un dépistage d'Ac anti-HLA, les microbilles sont recouvertes de plusieurs antigènes HLA naturels purifiés (bille polyspécifique). Elles sont mises au contact du sérum du patient : la fixation des IgG anti-HLA du patient est révélée par l'ajout de conjugué anti-IgG humaine. Ce conjugué est marqué par de la phycoérythrine, qui émet dans le vert (575 nm).

Les billes sont ensuite passées dans une veine liquide : un premier laser (633 nm) permet de séparer les billes en fonction de leur fluorescence propre, et un deuxième laser (532 nm) excite le fluorochrome porté par le conjugué. Deux informations sont ainsi obtenues : la présence d'une IgG et l'identité de la bille sur laquelle elle est fixée.

Lors d'une identification (*Single Antigen* : SA), c'est-à-dire la recherche des spécificités des anticorps anti-HLA mis en évidence lors du dépistage, le principe est le même mais les microbilles sont différentes : elles ne portent à leur surface qu'un seul type d'antigène HLA, d'origine recombinante (Figure 11). On peut ainsi étudier les réactivités spécifiquement dirigées contre le HLA de classe I ou de classe II.

Pour le SA, l'intensité de fluorescence obtenue après passage dans l'automate est normalisée sur un sérum négatif et est appelée *Mean Fluorescence Intensity* (MFI). Cette valeur permet de déterminer la présence de l'anticorps anti-HLA : pour une $MFI \geq 1\ 000$, le test est considéré comme positif et si la $MFI < 500$, le test est négatif. Entre ces deux valeurs, il existe une « zone grise » ne permettant pas de conclure quant à la présence d'anticorps anti-HLA.

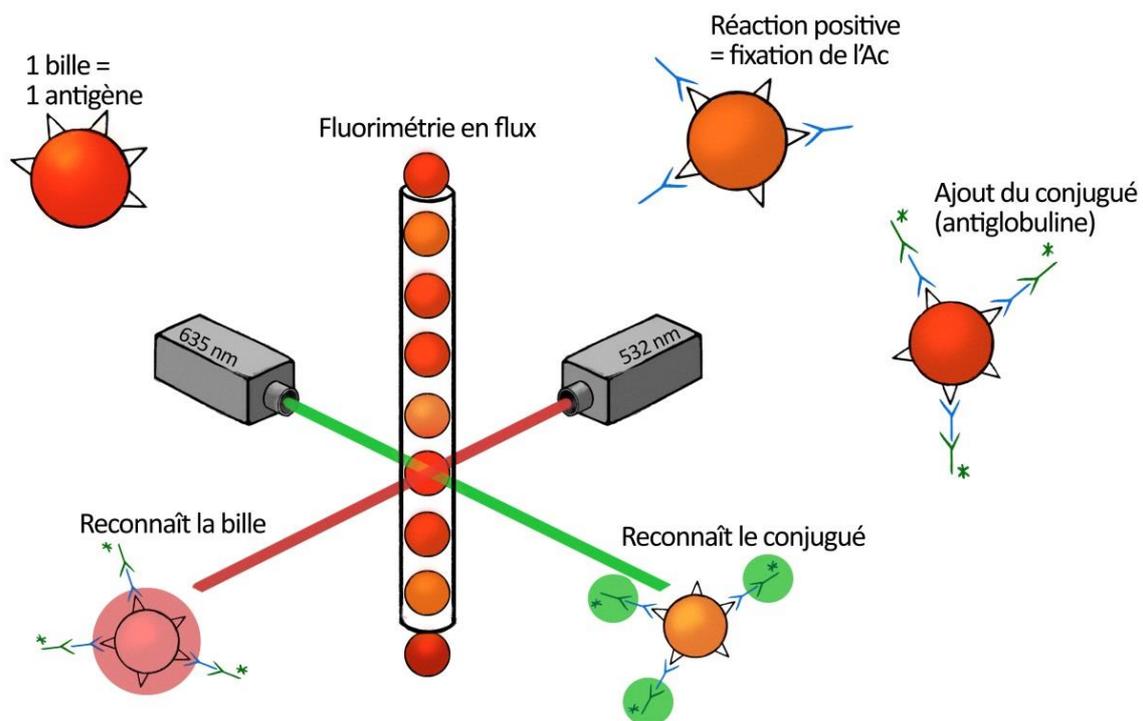


Figure 11 : Principe de la technologie Luminex pour le SA

D'après G. Fricaud

Un contrôle positif (PC) et un contrôle négatif (NC) sont présents dans chaque lot de billes pour affirmer la validité du test. Il s'agit de deux sortes de billes dont les caractéristiques sont les suivantes :

- une bille contrôle positif : bille PC recouverte de récepteurs d'immunoglobulines, dont la valeur de MFI attendue selon le fournisseur est > 500 ($> 1\,500$ pour le laboratoire de Lille)
- une bille contrôle négatif : bille NC dépourvue d'antigène HLA à sa surface, dont la valeur de MFI attendue selon le fournisseur est $< 1\,500$ ($< 1\,000$ pour le laboratoire de Lille)
- les billes PC et NC doivent également remplir le critère suivant : rapport PC/NC > 2

(2) Avantages et inconvénients

Outre ses grandes sensibilité et spécificité, cette technique présente de nombreux avantages : possibilité de multiplexage, appréciation de la « force » de l'Ac grâce à la MFI, lecture automatisée, utilisation possible pour le crossmatch virtuel, la détection précoce des DSA *de novo* et le suivi des protocoles de désimmunisation.

Depuis l'émergence de la technique Luminex, on n'utilise plus le PRA mais un calcul différent permettant d'obtenir le Taux de Greffons Incompatibles (TGI ou cPRA), qui se base sur la population des donneurs^{4,27}.

Il est cependant à noter que de nouvelles difficultés d'interprétation, inhérentes à cette technique, sont apparues :

- Des interférences négatives peuvent être observées par un effet improprement appelé « prozone » (Figure 12). Cet effet est lié aux fractions du complément qui entrent en compétition avec le conjugué. Ces fractions étant calcium-dépendantes, l'ajout d'EDTA permet de contourner ce phénomène^{78,79}.
- Il est également possible de générer de « faux positifs » dans plusieurs situations :

- La présence d'anti-HLA naturels reconnaissant des motifs peptidiques communs avec le HLA de classe I par réactivités inexplicées³⁹ ;
 - La présence d'anti-dHLA (qui n'auraient pas d'impact sur la survie du greffon⁸⁰). En effet, lors des procédés de fabrication des billes de réactifs pour le Luminex, les Ag HLA synthétisés peuvent se trouver dénaturés. Comme décrit précédemment, les molécules HLA dénaturées de classe I sont composées de la chaîne lourde du HLA dépourvue de peptide et de $\beta 2m$ et ceci a deux conséquences : l'exposition d'épitopes cryptiques (pouvant conduire à une réaction faussement positive) mais aussi la perte d'épitopes (conduisant à des réactions faussement négatives⁸¹).
- Une forte concentration d'IgM ou un contexte inflammatoire peuvent interférer avec les résultats du Luminex⁸². Certains traitements tels que la thymoglobuline, de fortes doses d'Ig par voie intraveineuse et les appareils d'assistance ventriculaire LVAD⁸³⁻⁸⁵ peuvent également être impliqués⁷⁸.
 - De plus, cette technique présente un coefficient de variation élevé car les paramètres influant sur la valeur de MFI sont nombreux (étape préanalytique manuelle, lot de billes, nature du conjugué utilisé⁸⁶ ...).

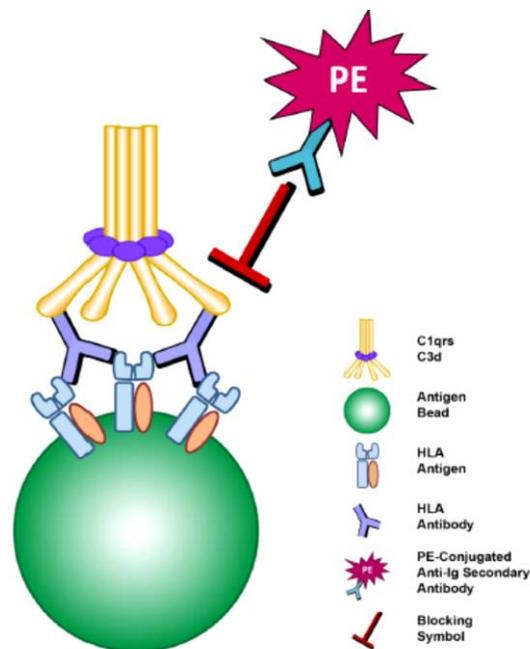


Figure 12 : Effet « prozone »

D'après Sullivan et al : « Understanding solid-phase HLA antibody assays and the value of MFI ». ⁷⁹

À ces réflexions s'ajoute la question de l'absence de standardisation de la méthode⁸⁷ et l'établissement d'une limite de MFI pertinente pouvant attester de la présence d'un anticorps. La MFI est un résultat semi-quantitatif qui n'est pas le reflet du titre en Ac de l'individu⁸¹ ; de plus, la densité antigénique des billes ne représente pas celle des cellules du corps humain⁸⁸ et toutes ces considérations posent le problème de la pertinence des Ac mis en évidence. En effet, il n'y a pas de concordance totale entre les DSA trouvés en Luminex et le résultat du crossmatch⁸⁹. Il est aujourd'hui admis que le crossmatch en cytométrie en flux est susceptible d'être positif pour une MFI supérieure à 3 000⁹⁰.

Ces considérations nous conduisent à interpréter les résultats du Luminex avec prudence afin de faire la part entre DSA et interférence : connaître le typage HLA du patient et ses éventuels évènements immunisants s'avère primordial.

Afin d'améliorer les performances de la méthode, plusieurs modifications ont vu le jour dans les dernières années, telles que la détection du C1q (fragment de complément) ou l'utilisation des *iBeads*.

Comme nous l'avons vu, les DSA ayant la capacité de fixer le complément ont un impact clinique important car ce sont les plus délétères pour le greffon^{61,91}. La fixation du C1q sur l'Ig étant la première étape d'activation de la cascade du complément, plusieurs kits permettant de distinguer les Ac fixant le complément ou non ont vu le jour, mais ils sont encore à l'étude car peu spécifiques.

Actuellement, la technique Luminex ne permet pas de discriminer les Ac anti-HLA selon leur nature (anti-nHLA ou anti-dHLA) car les billes de réactifs peuvent porter les deux types de molécule (native ou dénaturée) à leur surface. Pour résoudre ce problème, le fabricant OneLambda a proposé un nouveau type de billes : les *iBeads*^{80,92}. Elles sont dépourvues d'antigène dénaturé à leur surface et permettraient de s'affranchir des interférences causées par les anti-dHLA ; cependant, ce type de billes n'est pas disponible sur le marché à l'heure actuelle.

e) Comparaison des méthodes

Le tableau 4 présente les principales différences entre LCT et Luminex.

	LCT	Luminex
Isotypes détectables	<i>IgG + IgM</i>	<i>IgG</i>
Types d'Ac	<i>Ac cytotoxiques</i>	<i>Tous les Ac</i>
Ag cibles	<i>HLA et autres Ag</i>	<i>HLA</i>
Sensibilité	<i>+</i>	<i>+++</i>
Distinction classe I et II	<i>+/-</i>	<i>+</i>
Automatisation	<i>-</i>	<i>+</i>
Dépistage	<i>+</i>	<i>+</i>

Tableau 4 : Comparaison des techniques de recherche d'anticorps anti-HLA

2. Stratégie employée au laboratoire de Lille

Le CHRU de Lille dispose de l'autorisation de l'ARS pour effectuer les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH), de rein, de foie et de cœur (ainsi que de cornée et d'îlots de Langerhans). Au laboratoire d'histocompatibilité, différentes approches sont effectuées en fonction de la greffe envisagée. Elles sont exposées succinctement ci-dessous :

Greffe d'organe avec un donneur décédé :

- Typage HLA du receveur (et du donneur en urgence) ;
- Suivi immunologique du receveur pré- et post-greffe (selon les recommandations de l'ABM⁷⁴) ;
- Crossmatch par LCT en urgence, sur sérum du jour et sérums historiques pertinents, pour les greffes de rein et d'îlots ;
- Crossmatch par LCT avant la greffe pour les greffes de cœur ou de foie, mais l'attente du résultat du crossmatch ne doit pas empêcher la réalisation de la greffe.

Greffe d'organe avec donneur vivant (rein) :

- Typage HLA du donneur et du receveur ;
- Suivi immunologique du receveur pré- et post-greffe (selon les recommandations de l'ABM⁷⁴) ;
- Crossmatch en CMF et en LCT.

Les recommandations de l'Agence de la Biomédecine dictent la conduite à tenir pour la recherche d'anticorps anti-HLA⁷⁴. La stratégie à Lille est la suivante :

- Dépistage des Ac anti-HLA par LCT sur plaques de cellules congelées pour la première demande, avec et sans DTT afin de détecter l'éventuelle présence d'IgM :
 - La persistance d'une IgM ou sa commutation isotypique en IgG est documentée sur un deuxième sérum à distance ;
 - Par ailleurs, tout résultat de crossmatch en LCT évocateur de la présence d'IgM doit être investigué sur plaques commerciales avec le sérum correspondant ;
- Dépistage (SCR) par Luminex à la première demande, puis selon un calendrier défini par l'ABM :
 - Un prélèvement tous les 3 mois est recommandé et l'intervalle entre 2 prélèvements ne doit pas dépasser 6 mois⁷⁴ ;
 - Tout événement immunisant, en particulier transfusion, grossesse, greffe d'organe ou d'îlots pancréatiques impose de prélever du sérum à deux reprises après l'évènement (entre J15 et J21, et à J30)⁷⁴ ;
- Selon le résultat du dépistage observé (modification du profil par rapport au sérum antérieur ou augmentation des ratios), identification des spécificités présentes (SA) :
 - En pré-greffe d'organe, l'intérêt du SA est de pouvoir saisir des antigènes « interdits » dans la liste CRISTAL d'attribution des greffons. Cette saisie permet une attribution des greffons automatisée en fonction des compatibilités ;

- En post-greffe d'organe, on cherche le plus souvent l'émergence de DSA ;
- On peut également effectuer le suivi d'un protocole de désimmunisation (en pré- ou post-greffe).

3. Difficultés rencontrées au laboratoire

La principale difficulté rencontrée aujourd'hui au laboratoire du CHRU de Lille se situe à l'étape d'interprétation du bilan biologique obtenu. En effet, il apparaît que, dans certains cas, on ne peut pas expliquer la réactivité obtenue par un antécédent d'immunisation (hommes ou enfants non transfusés ni transplantés).

Tout le problème réside dans l'apparition d'un Ac anti-HLA chez un patient. Plusieurs questions peuvent alors se poser :

- Quelle est la nature de cet anticorps (anti-nHLA ou anti-dHLA) ?
- Est-il pathogène ?
- Lors d'un suivi post-greffe, cet anticorps est-il un signe précoce de rejet ?

Il est important de pouvoir faire la part des choses entre réactivité non spécifique, réactivité attribuable à un anticorps non pathogène et émergence ou présence de DSA (préformé ou néoformé).

La nature de l'anticorps peut apporter des renseignements sur sa pathogénicité. Il est spécialement intéressant de savoir reconnaître un anticorps anti-dHLA dans les cas suivants :

- Situation pré-greffe, en particulier chez le patient « naïf », ou pour un patient ayant un large panel d'immunisation avec un accès à la greffe réduit ;
- Situation post-greffe : apparition de DSA sans signe clinique associé.

D. Objectifs de notre travail

L'objectif principal de notre travail est de répondre à une recommandation de la Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique (SFHI) qui, à l'occasion d'un groupe de travail sur les anticorps anti-HLA en septembre 2016, mettait en avant la nécessité de faire la part entre les anti-« HLA natif » et les anti-« HLA dénaturé », en préconisant un traitement à l'acide des billes de Luminex ou la réalisation d'un crossmatch en CMF (si les valeurs de MFI le permettent). Pour y répondre, il est proposé de se baser sur un protocole de traitement à l'acide des billes de SA1 utilisé et validé à Bordeaux⁹³.

Afin d'atteindre l'objectif principal, il sera nécessaire d'adapter le protocole de Bordeaux pour garantir sa bonne mise en œuvre au laboratoire du CHRU de Lille. Les ajustements pourront concerner le traitement des échantillons (EDTA, *Adsorb out*), les méthodes de dénaturation (acide, chaleur) et l'étape post-analytique (utilisation du logiciel *HLA Matchmaker*).

La validation des ajustements se fera grâce à l'utilisation de sérums témoins provenant du laboratoire de Bordeaux et dont les identifications d'anticorps sont connues.

À partir des résultats obtenus, les objectifs secondaires sont l'établissement d'une stratégie d'identification des anti-dHLA pouvant être utilisée au laboratoire d'histocompatibilité du CHRU de Lille pour la classe I et la classe II, ainsi que l'apport de nouveaux éléments pouvant alimenter la réflexion sur les pratiques d'identification des Ac anti-HLA.

Ce travail permettra également de répondre à certaines interrogations, telles que :

- La dénaturation des billes impacte-t-elle les valeurs des billes de contrôle ? Cette question est intéressante dans la mesure où le calcul de MFI se base en partie sur les valeurs des contrôles.
- Peut-on prédire la présence d'anti-dHLA à partir des images et valeurs obtenues lors du dépistage des anticorps anti-HLA par méthode Luminex ?

- Une fois les anti-dHLA mis en évidence, peut-on les éliminer des antigènes « interdits » du logiciel CRISTAL ? Peut-on être sûr que, pour une réactivité anti-dHLA, on n'a pas une réactivité anti-nHLA sous-jacente ? L'hypothèse de départ qu'un anticorps anti-dHLA ne réagit pas contre un éplet exprimé physiologiquement doit être testée.

II. Matériels et méthodes

A. Population étudiée

Les échantillons inclus sont des sérums congelés dans la sérothèque du laboratoire d'Immunologie du CHRU de Lille sur une période allant du 22/09/2014 au 02/02/2017. Ces échantillons sont conservés dans des microtubes contenant un volume d'environ 2 mL, et sont stockés (conformément aux recommandations de l'Agence de Biomédecine) dans le but de réaliser des crossmatchs lors d'une demande de greffe, ou pour tout évènement ultérieur nécessitant de travailler sur un sérum précis. Un volume de 180 µL est prélevé pour la constitution de notre sérothèque servant de base à ce travail.

Le groupe de 30 échantillons étudiés appartient principalement à des hommes (67 %), il a pour âge médian 47,5 ans. Les bilans sont pour la plupart demandés dans le cadre d'un suivi immunologique pré-greffe (67 %), et concernent majoritairement des greffes de rein (63 %). Les caractéristiques principales des sérums inclus sont regroupées dans le Tableau 5 :

	Total
Femmes†	10 (33 %)
Âge (ans) °	47,5 [1 ; 74]
Type de greffe†	
<i>Rein</i>	19 (63 %)
<i>Cœur</i>	6 (20 %)
<i>Foie</i>	2 (7 %)
<i>Moelle</i>	2 (7 %)
<i>Autre : EEQ</i>	1 (3 %)
Inscription sur liste de greffe†	20 (67 %)
Évènement immunisant†	10 (33 %)
<i>Greffe</i>	7 (23 %)
<i>Transfusion</i>	2 (7 %)
<i>Grossesse</i>	1 (3 %)
Dépistage positif†	19 (63 %)
LVAD†	2 (7 %)

Tableau 5 : Caractéristiques de la population étudiée

†variable qualitative : effectifs, (pourcentage)

°variable quantitative : médiane [Q1 ; Q3]

EEQ : évaluation externe de la qualité

LVAD : dispositif d'assistance ventriculaire

1. Suspicion d'anti-dHLA de classe I

26 échantillons ont été analysés. Les critères d'inclusion sont :

- présence d'au moins une réactivité anti-HLA de classe I sans évènement immunisant pouvant permettre de l'expliquer ;
- présence d'une quantité suffisante de sérum (minimum 180 µL pour l'analyse).

Sur les 26 sérums, 25 proviennent de patients suivis au CHRU de Lille dont la plupart sont issus d'une précédente étude réalisée pour caractériser le seuil de dépistage du Luminex ; et le dernier correspond à une évaluation externe de la qualité (EEQ) de 2016.

Le recueil des données clinico-biologiques complémentaires est effectué à l'aide du logiciel de gestion de laboratoire MOLIS (CGM LAB) ainsi que du logiciel de gestion des dossiers médicaux SILLAGE (SIB).

2. Suspicion d'anti-dHLA de classe II

4 échantillons ont été analysés. Les critères d'inclusion sont similaires à ceux de la classe I. Sur les 4 sérums, tous proviennent de patients suivis au CHRU de Lille

B. Sérums témoins de Bordeaux

La validation du protocole est réalisée grâce à l'utilisation de 4 sérums provenant du laboratoire d'histocompatibilité de Bordeaux et caractérisés sur la présence d'Ac anti-dHLA et/ou d'Ac anti-nHLA de classe I. Les 4 sérums contiennent des anti-nHLA : 2 contiennent également des anti-dHLA de classe I (= témoins positifs) et les 2 autres n'en contiennent pas (= témoins négatifs).

Au moment où les sérums ont été testés, nous ignorions quels étaient ceux qui contenaient des anti-dHLA de classe I.

C. Réactifs et protocole technique

1. Single Antigen classique

a) Prétraitement des sérums

Un traitement systématique du sérum à l'EDTA (0,1 M ; pH 7,4) est requis pour toutes les recherches d'anticorps en technique Luminex afin de s'affranchir de l'interférence liée au complément : 10 µL d'EDTA sont ajoutés à 90 µL de sérum, et les sérums sont agités (10 min) puis centrifugés à 13 000 tours/minute durant 10 min.

Un second traitement, par *Adsorb out* (OneLambda, lot 023) est possible en cas de perturbation des valeurs de la bille NC (bruit de fond trop élevé). Pour cela, 3 µL du réactif sont ajoutés dans 30 µL de sérum, puis le mélange est incubé 30 min à température ambiante et sous agitation douce et enfin centrifugé à 13 000 tours/minutes durant 10 min. Les conditions d'utilisation de ce traitement sont décrites ci-après.

Un cas particulier concerne les sérums (n = 3) pour lesquels des MFI élevées ont été retrouvées lors de l'identification qui a permis leur sélection. En effet, lorsque la MFI est supérieure à 20 000, on est en conditions de saturation. Par conséquent, lorsque les MFI observées lors du premier SA étaient supérieures ou très proches de 20 000, les sérums correspondants sont dilués au 1/2 dans du PBS (tampon phosphate salin) car la réactivité est susceptible d'augmenter en condition dénaturée.

b) Réalisation du SA dans les conditions classiques

Les résultats de SA disponibles pour la sélection des sérums proviennent de manipulations réalisées dans les conditions habituelles du laboratoire d'histocompatibilité du CHRU de Lille (conditions détaillées ci-après).

Les billes utilisées sont les *LabScreen Single Antigen Class I* (OneLambda, LS1A04 lot 10 pour la classe I et LS2A01 lot 11 pour la classe II). La plupart des séries d'analyses se font sur 4 échantillons à la fois, ce qui correspond à 8 analyses en

réalité car on teste chaque échantillon en double : avec des billes témoins et avec des billes dénaturées. Les supports servant de base à la manipulation sont des plaques de 96 puits type ELISA dont le fond est constitué d'un filtre, permettant d'effectuer les étapes de lavage nécessaires à l'élimination des anticorps non fixés (remplissage du puits par une solution de lavage, puis aspiration par une pompe à vide pour plaque micropore). Toutes les étapes d'incubation, d'agitation et de centrifugation sont réalisées à l'abri de la lumière.

(1) Dépôt des billes dans les puits et préparation de la solution de lavage

Une première étape consiste à diluer le tampon de lavage *Wash Buffer* 10X (contenu dans le coffret de réactifs LS1A04 ou LS2A01) au 1/10^e dans de l'eau stérile.

Puis 4 µL de billes sont déposées dans chaque puits de la microplaque, préalablement hydratée. Ces billes sont photosensibles et cette étape ne doit pas être trop longue afin de ne pas altérer les mesures de fluorescence effectuées par le Luminex.

(2) Dépôt des sérums et ajout du conjugué

Une prise d'essai de 20 µL de sérum est déposée dans chaque puits. Puis on incube à température ambiante durant 30 min. Ceci permet la fixation des anticorps sur les antigènes portés par la bille. Ensuite, une série de 5 lavages est effectuée à l'aide de la solution préparée précédemment.

Puis on ajoute 100 µL de conjugué anti-IgG humaine dans chaque puits (*LabScreen PE conj. Goat Anti-Human IgG, OneLambda, lot B76*). Une deuxième étape d'incubation permet la fixation du conjugué aux anticorps du patient. Le conjugué étant photosensible, l'exposition des puits à la lumière ne doit pas être trop longue afin de ne pas perturber la fluorescence mesurée par l'automate. Une nouvelle série de 5 lavages est réalisée et, pour finir, on ajoute 80 µL de PBS par puits.

On passe ensuite à l'étape d'acquisition sur l'automate.

2. Protocole de dénaturation à l'acide

Afin d'obtenir des billes présentant uniquement des antigènes dénaturés à leur surface, une étape de dénaturation est nécessaire. Elle se base sur un protocole fourni par l'équipe de Visentin à Bordeaux et est réalisée en incubant les billes (de classe I uniquement) en milieu acide⁹³, ce qui induit le détachement de la bêta-2-microglobuline du CMH de classe I⁶⁸. Ce protocole est testé pour la classe I (n = 26) et pour les sérum témoins (n = 4).

a) Préparation du tampon de dénaturation

Il s'agit d'une solution constituée de 1 mL de glycine 0,1 M en milieu acide (Sigma-Aldrich) à laquelle on ajoute 100 µL de BSA 10 % (sérum albumine bovine). La BSA permet de diminuer le bruit de fond en saturant les sites de liaison aux protéines.

D'autre part, un pH de 2,5 est recommandé pour obtenir une dénaturation efficace des antigènes tout en évitant leur dégradation complète⁶⁸. L'ajustement se fait au pH-mètre à l'aide d'une solution de NaOH 10 mM (Volusol, VWR Chemicals).

b) Dénaturation et préparation des billes témoin

Un volume de billes correspondant à $n \times 4 \mu\text{L}$ de billes (n = nombre d'échantillons) est ajouté dans un tube, centrifugé à 3 000 tours/min pendant 5 min et repris dans le tampon de dénaturation. L'étape de dénaturation s'effectue à l'abri de la lumière et sous agitation pendant 30 min. À la fin de l'incubation, la solution est diluée au 1/3 dans du tampon de lavage puis centrifugée à 3 000 tours/min pendant 5 min. Enfin, le surnageant est éliminé puis les billes sont remises en suspension dans $n \times 150 \mu\text{L}$ de solution de lavage.

L'interprétation des résultats nécessite un travail en parallèle sur des billes que l'on dénature par l'acide, et des billes non dénaturées. Ces dernières sont traitées dans les mêmes conditions que les billes dénaturées, en remplaçant le tampon de dénaturation acide par du PBS. Sont ainsi définies la condition N (pour les billes non dénaturées) et la condition D (pour les billes dénaturées). Le volume de solution de billes ajouté dans chaque puits est alors de 150 µL. Le reste de la manipulation s'effectue comme un SA classique.

3. Protocole de dénaturation à la chaleur

Le protocole de dénaturation à la chaleur suit les mêmes étapes que le protocole de dénaturation à l'acide en remplaçant le tampon de dénaturation par un mélange de PBS à 0,1 % de BSA⁹⁴. L'étape de dénaturation des billes par la chaleur est effectuée en portant le mélange de billes à haute température dans un thermocycleur grâce à un programme élaboré pour le test (montée rapide jusqu'à 90 °C, puis descente brutale à 4 °C). Ce protocole est testé pour 10 sérums contenant des anti-dHLA de classe I et 4 sérums de classe II choisis selon les critères d'inclusion précités.

D. Luminex

L'ensemble des analyses présentées lors de ce travail est effectué sur l'automate Luminex 100, à une température variant entre +3 et -3 °C par rapport à la température de la dernière calibration. Les conditions de pression du liquide de gaine et de temps d'acquisition sont respectées.

Pour considérer une acquisition comme valide, un minimum de lecture de 50 billes pour chaque spécificité est attendu.

E. Post-analytique

1. Analyse via le logiciel HLA Fusion

a) Validation du bon déroulement du test

Après vérification du respect des paramètres techniques cités précédemment (notamment le nombre de billes lues), la validation du bon déroulement du test se fait selon les critères suivants :

- Bille NC < 1 000 : en cas de non-respect de cette condition, il est possible de recommencer la manipulation en adsorbant le sérum au préalable avec de l'*Adsorb out* ;
- Bille PC > 1 500 et rapport PC/NC > 2 : si ces conditions ne sont pas respectées, le test est à refaire ;
- Comparaison des résultats obtenus avec les résultats du dépistage Luminex (SCR = screening).

b) Interprétation des résultats du sérum

L'intensité de fluorescence obtenue après passage sur l'automate est normalisée sur un sérum négatif (témoin OLINS). Pour l'interprétation des données, seuls les anticorps dont la MFI est supérieure ou égale à 1 000 en conditions N sont analysés.

En réalité, une MFI inférieure à 500 est reconnue par l'Agence de Biomédecine pour considérer un antigène comme « permis ». Le seuil retenu pour considérer un antigène comme « interdit » est 2 000 selon les nouvelles recommandations de l'ABM (mais le seuil de 3 000 est souvent évoqué dans la littérature). Au laboratoire de Lille, une MFI inférieure à 500 permet de considérer un antigène comme permis, et les antigènes sont « interdits » pour un seuil de MFI de 1 000.

Le logiciel HLA Fusion permet l'étude des spécificités d'anticorps anti-HLA et l'attribution d'une valeur de MFI à une bille donnée : chaque bille possédant un antigène différent à sa surface, on sait donc faire la différence de spécificité d'anticorps. Pour chaque bille, on obtient une valeur de MFI propre, variant de 0 à plus de 20 000 (Figure 13).

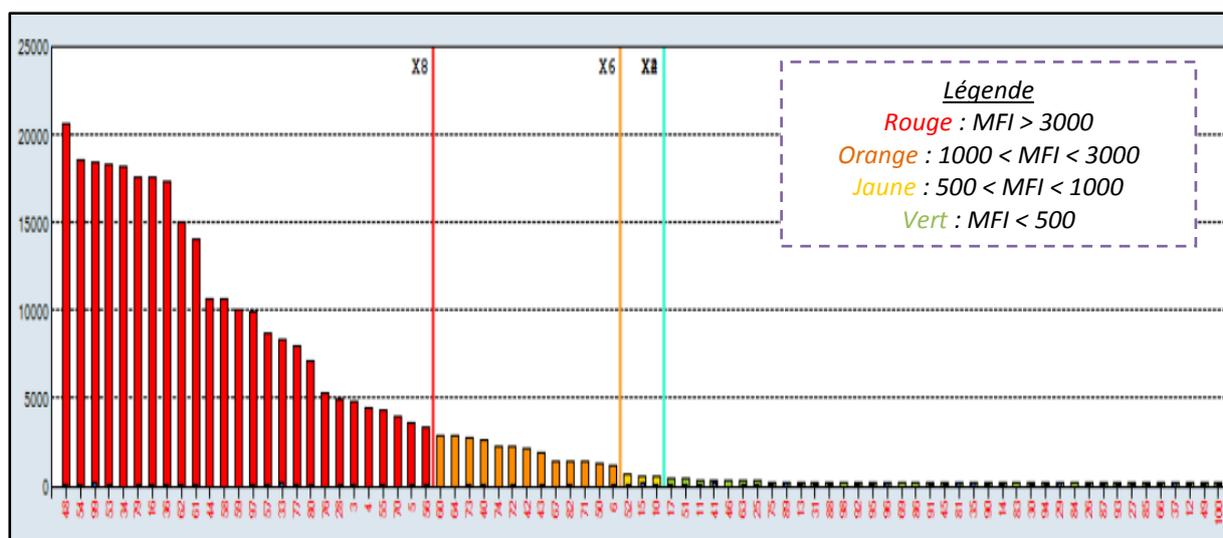


Figure 13 : Image obtenue par le logiciel HLA Fusion

À chaque numéro de bille (en abscisse) correspond la valeur de MFI (en ordonnée)

2. Définition d'un Ac anti-dHLA de classe I et II

Comme vu précédemment, la dénaturation des billes de Single Antigen amène à disposer de billes dont la densité en antigènes dénaturés est plus importante que sur une bille classique. La présence d'un anti-dHLA dans le sérum du patient conduit à une fixation importante d'anticorps à la surface des billes en conditions D, et par conséquent, à une MFI plus élevée que ce qu'on pourrait obtenir en conditions N. Cette augmentation de MFI nous permet de repérer la présence d'anti-dHLA dans les sérums des patients étudiés.

Le ratio de MFI en condition D sur MFI en condition N permet de qualifier l'aspect anti-« HLA dénaturé » de l'anticorps mis en évidence⁹³. Ces ratios sont comparés pour chaque spécificité positive dans chaque échantillon afin de caractériser les anticorps mis en évidence. Selon les seuils définis par Bordeaux, pour un rapport $D/N < 1,2$ on est en présence d'anti-nHLA et pour $D/N \geq 1,2$, on est en présence d'anti-dHLA.

3. HLA Matchmaker

Le logiciel *HLA Matchmaker* propose deux programmes indépendants qui sont l'*eplet matching* et l'*antibody analysis* servant respectivement à l'allocation des organes et à l'étude des épitopes impliqués dans la réactivité anti-HLA. C'est le programme d'analyse des anticorps qui a été utilisé⁹⁵ : à partir du profil obtenu en Luminex et du typage du patient, le programme renseigne les épitopes impliqués dans la réactivité observée (les épitopes impliqués ne sont pas les mêmes en fonction du typage du patient, voir Figure 14).

Le logiciel Matchmaker classe les épitopes en trois catégories :

- Les « antibody verified » correspondent à des épitopes connus pour leur immunogénicité et pour lesquels un anticorps a été décrit ;
- Les combinaisons d'épitopes, constituées de 2 épitopes ou plus ;
- Les « autres épitopes », pour lesquels aucun anticorps n'a été décrit jusqu'à présent.

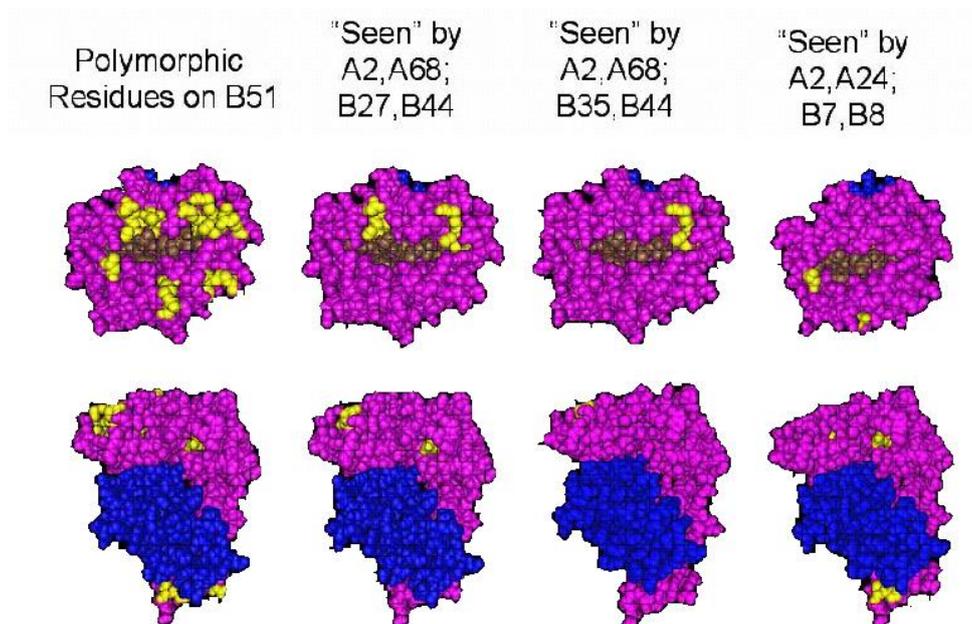


Figure 14 : Bases structurales d'un mismatch HLA-B51

Les résidus polymorphiques du B51 sont indiquées en jaune et sont « vus » différemment en fonction du typage de l'individu⁹⁶

Le logiciel nécessite de disposer du typage en 4 digits pour travailler, or la plupart du temps seul le typage en 2 digits était disponible. Un moyen de prédiction du typage en 4 digits à partir du typage en résolution générique est l'utilisation de l'outil Haplostats. Cet algorithme, développé par le *National Marrow Donor Program* (NMDP, registre états-unien de donneurs volontaires de moelle osseuse), permettait de proposer le ou les typages les plus probables selon la population étudiée.

4. Crossmatch par cytométrie en flux

Un crossmatch par CMF a été réalisé selon la fiche d'instruction disponible au laboratoire, en utilisant le sérum d'un patient contenant un anti-dHLA de classe I à une MFI supérieure à 3 000 (MFI capable de positiver la réaction de crossmatch en CMF) testé sur les cellules d'un donneur sain exprimant les antigènes correspondants.

5. Méthodes statistiques

Les variables quantitatives (MFI, âge...) sont décrites par leur moyenne associée à leur écart type ou, en cas de distribution ne suivant pas une loi normale, par leur médiane avec les 1^{er} et 3^e interquartiles. L'étude de la normalité est effectuée au moyen du test de Shapiro-Wilk et de la droite de Henry. Les variables qualitatives sont présentées par les effectifs et les fréquences en pourcentage.

Dans le but de comparer les prévalences et spécificités des anti-dHLA, plusieurs tests du khi-deux sont effectués, avec une correction de Yates lorsque cela est nécessaire. La vérification de la concordance entre le dépistage et l'identification des anti-HLA se fait également au moyen d'un test du khi-deux. Pour les variables quantitatives décrites par leur moyenne, un test paramétrique de comparaison de moyenne est utilisé.

L'étude des résultats obtenus via le logiciel Matchmaker nécessite l'emploi d'un test de comparaison de distribution non paramétrique (test de Mann-Whitney). Enfin, la comparaison des deux protocoles de dénaturation se fait grâce au test du kappa de Cohen.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel SPSS (*IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.*) et considérées comme significatives au risque de première espèce 5 % en bilatéral.

III. Résultats

A. Caractéristiques des échantillons étudiés pour la classe I

Deux groupes sont définis : les patients ayant des anti-dHLA de classe I dans leur sérum et ceux n'en ayant pas (Tableau 6).

	Total pour la classe I (n = 26)	Groupe sans anti-dHLA (n = 15)	Groupe avec anti-dHLA (n = 11)
Femmes†	9 (34 %)	6 (40 %)	3 (27 %)
Âge (ans) °	51 [6 ; 74]	57 [30 ; 74]	39 [6 ; 67]
Type de greffe†			
Rein	17 (65 %)	11 (73 %)	6 (55 %)
Cœur	6 (23 %)	3 (20 %)	3 (27 %)
Foie	1 (4 %)	-	1 (9 %)
Moelle	1 (4 %)	-	1 (9 %)
Autre : EEQ	1 (4 %)	1 (7 %)	-
Inscription sur liste de greffe†	16 (64 %)	9 (60 %)	7 (64 %)
Évènement immunisant†	10 (39 %)	5 (33 %)	5 (46 %)
Greffe	7 (27 %)	4 (27 %)	3 (28 %)
Transfusion	2 (8 %)	-	2 (18 %)
Grossesse	1 (4 %)	1 (7 %)	-
Dépistage positif†	18 (70 %)	10 (67 %)	8 (73 %)
LVAD†	2 (8 %)	1 (7 %)	1 (9 %)

Tableau 6 : Caractéristiques de la population étudiée pour la classe I

†variable qualitative : effectifs (pourcentage)

°variable quantitative : médiane [Q1 ; Q3]

B. Validation du protocole technique

1. Utilisation de l'Adsorb out

Au cours de la mise en place du protocole, il est apparu que 37,5 % des analyses présentaient des NC supérieures à 1 000. L'adsorption systématique des sérums a permis de réduire cette fraction à 12,1 %.

2. Concordances obtenues avec des sérums témoins de Bordeaux (pour le protocole de dénaturation à l'acide)

La concordance des résultats est évaluée comme bonne pour les sérums contenant un mélange anti-dHLA et anti-nHLA ($\kappa = 0,67$ et $0,60$) et excellente pour les sérums ne contenant que des anti-nHLA ($\kappa = 0,89$ et $0,93$). Les résultats sont exposés dans le Tableau 7.

		BORDEAUX				
LILLE	D001					kappa 0,67
	<i>Catégories</i>	<i>anti-dHLA</i>	<i>anti-nHLA</i>	<i>négatif</i>	<i>Total</i>	
	<i>anti-dHLA</i>	9	0	0	9	
	<i>anti-nHLA</i>	11	1	0	12	
	<i>négatif</i>	0	1	75	76	
	<i>Total</i>	20	2	75	97	
	D002					0,60
	<i>Catégories</i>	<i>anti-dHLA</i>	<i>anti-nHLA</i>	<i>négatif</i>	<i>Total</i>	
	<i>anti-dHLA</i>	3	0	0	3	
	<i>anti-nHLA</i>	5	0	2	7	
	<i>négatif</i>	0	0	87	87	
	<i>Total</i>	8	0	89	97	
	D003					0,89
	<i>Catégories</i>	<i>anti-dHLA</i>	<i>anti-nHLA</i>	<i>négatif</i>	<i>Total</i>	
	<i>anti-dHLA</i>	0	0	0	0	
	<i>anti-nHLA</i>	0	35	5	40	
	<i>négatif</i>	0	0	57	57	
<i>Total</i>	0	35	62	97		
D004					0,93	
<i>Catégories</i>	<i>anti-dHLA</i>	<i>anti-nHLA</i>	<i>négatif</i>	<i>Total</i>		
<i>anti-dHLA</i>	0	0	0	0		
<i>anti-nHLA</i>	0	63	3	66		
<i>négatif</i>	0	0	31	31		
<i>Total</i>	0	63	34	97		

Tableau 7 : Concordance des résultats entre Bordeaux et Lille

Pour chaque sérum (D001 à D004), on met en regard les résultats trouvés à Bordeaux (en colonne) et ceux trouvés à Lille (en ligne)

3. Protocole de dénaturation à la chaleur

Malheureusement, cette technique de dénaturation renvoie des résultats ininterprétables pour la classe II et pour 8 des 10 échantillons de classe I testés ; principalement car les NC sont > 1 500.

Néanmoins, il existe 2 échantillons de classe I interprétables et pour lesquels les réactivités retrouvées sont les suivantes (Tableau 8) :

	AC avec MFI \geq 1 000	anti-dHLA	fort anti-dHLA	Spécificités
Sérum 1 (dénaturation à l'acide)	10	9	8	B*15:02, B*15:03, B*15:11, B*15:12, B*40:01, B*40:02, B*41:01, B*45:01, B*48:01
Sérum 1 (dénaturation à la chaleur)	10	9	9	B*15:02, B*15:03, B*15:11, B*15:12, B*40:01, B*40:02, B*41:01, B*45:01, B*50:01
Sérum 2 (dénaturation à l'acide)	10	6	5	A*66:02, B*07:02, B*48:01, B*73:01, B*81:01, C*02:02
Sérum 2 (dénaturation à la chaleur)	4	4	4	A*66:02, B*07:02, C*02:02, C*17:01

Tableau 8 : Comparaison des protocoles de dénaturation sur deux sérums

Les différences de réactivité sont indiquées en gras

Le protocole de dénaturation à la chaleur présente une bonne concordance en termes de spécificités mises en évidence. Toutefois, des disparités sont observées : 6 anti-dHLA ne sont retrouvés que dans une seule des deux techniques proposées (2 pour le sérum 1 et 4 pour le sérum 2), 5 de ces 6 anti-dHLA présentent des rapports D/N > 1,6.

Le test de kappa renvoie une valeur de 0,67 pour le sérum 1 et 0,88 pour le sérum 2.

Les études de corrélation sont présentées sur la Figure 15 :

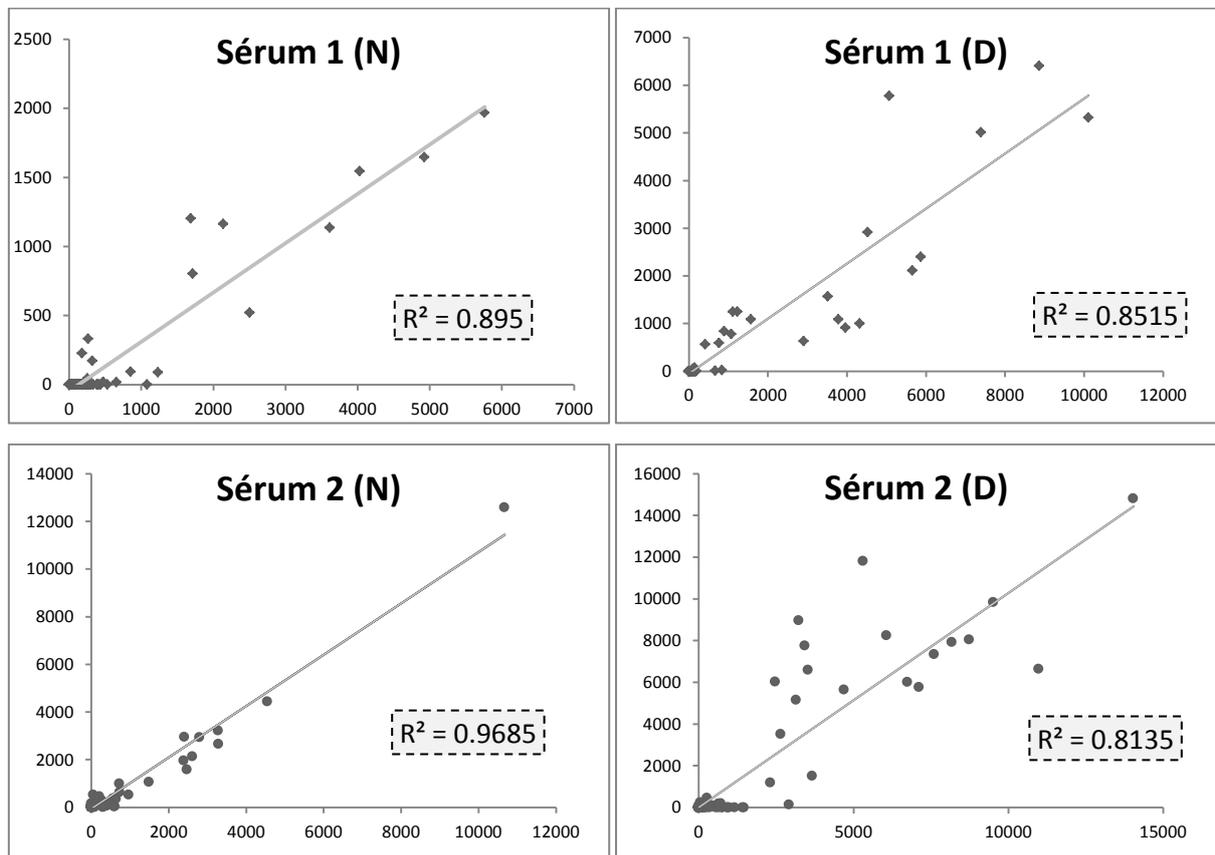


Figure 15 : Corrélations des valeurs obtenues par les deux protocoles testés

Les MFI « acide » sont reportées en abscisse et les MFI « chaleur » en ordonnée

C. Impact sur les contrôles

Aucune différence significative des moyennes de billes NC avant et après dénaturation n'est observée, en revanche, la moyenne des PC diminue de manière significative en conditions D (Tableau 9, Figure 16).

	Conditions		p-value
	N (n = 34) <i>moyenne (écart-type)</i>	D (n = 34) <i>moyenne (écart-type)</i>	
Bille Negative Control (NC)	157 (51)	133 (38)	0,69
Bille Positive Control (PC)	10 468 (422)	4 963 (434)	< 10 ⁻⁴

Tableau 9 : Moyennes de MFI obtenues pour les billes NC (Negative Control) et PC (Positive Control) dans les conditions N et D

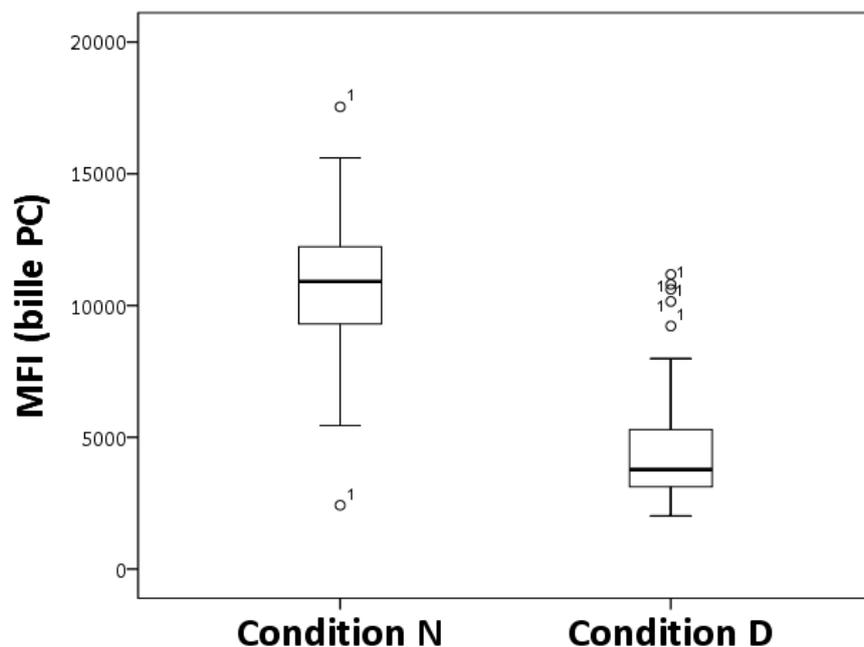


Figure 16 : Moyennes des MFI de la bille PC dans les conditions N et D

De plus, on peut observer une augmentation des moyennes de NC dans les expériences non interprétables (ce qui est cohérent avec les causes d'échec) cependant cette différence n'est pas statistiquement significative.

D. Identification des anti-dHLA de classe I

1. Prévalence au sein de la population

Parmi les 2 522 billes, 263 sont trouvées comme ayant une MFI supérieure ou égale à 1 000 en conditions N. Ce sont ces billes qui sont ensuite comparées à leurs correspondantes en conditions dénaturées afin de calculer le ratio D/N.

Au moins un anti-dHLA est retrouvé pour 11 patients (42 %), ce qui représente un total de 36 billes (1,4 % des billes totales). Parmi eux, on note que, pour 28 anti-dHLA (1,1 %), on observe une MFI augmentant fortement ($D \geq 1,6 N$) après traitement à l'acide (Figure 17).

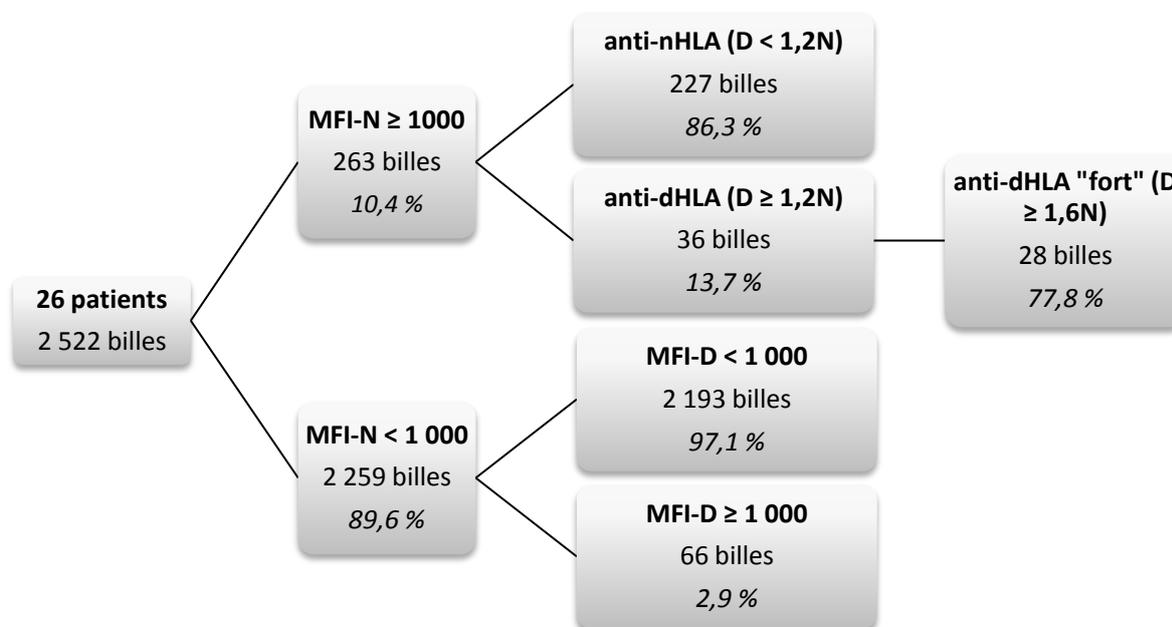


Figure 17 : Prévalence des anti-dHLA de classe I

Le reste des billes ayant une MFI < 1000 en conditions N sont classées selon leurs valeurs obtenues en conditions D. Pour 2 193 billes, la MFI reste inférieure à 1 000.

Les images ci-dessous (Figures 18 et 19) illustrent les résultats obtenus pour deux patients : les MFI obtenues en conditions D sont représentées en bleu et superposées aux MFI obtenues en conditions N.

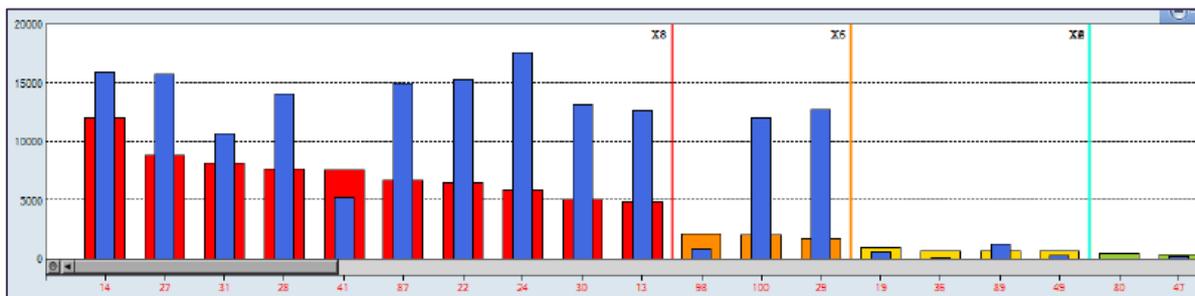


Figure 18 : Image Luminex, patient 23

Ce patient présente 13 anti-HLA dont certains ont une MFI-D supérieure à la MFI-N : il s'agit des anti-dHLA (au nombre de 11).

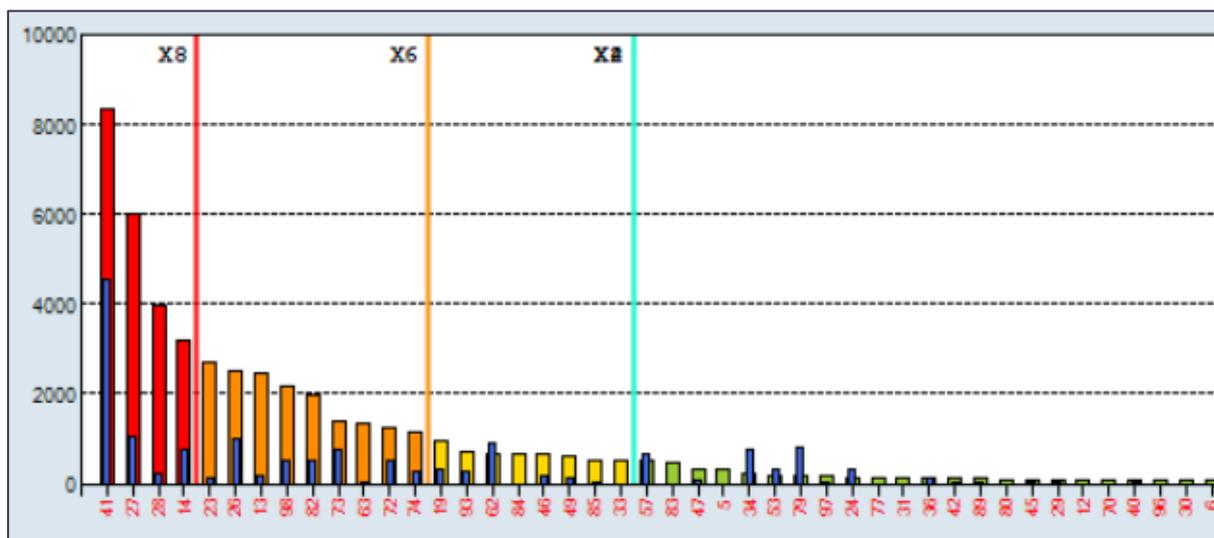


Figure 19 : Image Luminex, patient 4

Ce patient présente 13 anti-HLA mais parmi les MFI-N > 1 000, aucune MFI-D n'est supérieure à la MFI-N. On est en présence de 13 anti-nHLA.

2. Spécificités des anti-dHLA de classe I

Parmi les 36 anti-dHLA de classe I mis en évidence (Figure 20), on observe la répartition suivante :

- locus A : 17 anti-dHLA (22 % des anti-HLA-A)
- locus B : 14 anti-dHLA (14 % des anti-HLA-B)
- locus C : 5 anti-dHLA (6 % des anti-HLA-C)

On peut noter qu'il existe une différence significative de fréquence ($p = 0,009$) des anti-dHLA selon le locus.

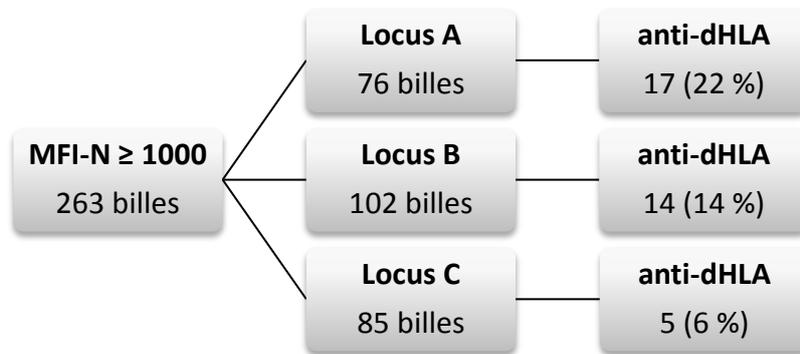


Figure 20 : Spécificités des anti-dHLA de classe I

L'ensemble des spécificités correspondant à des anti-dHLA est présenté en annexe.

3. Étude du dépistage

Chez les 11 patients présentant des anti-dHLA de classe I sont retrouvés seulement 8 SCR positifs (73 %), un seul est proche du seuil de positivité, et les 2 derniers sont négatifs. Pour les 15 patients restants, on observe 10 SCR positifs (67 %). Cette différence n'est pas significative.

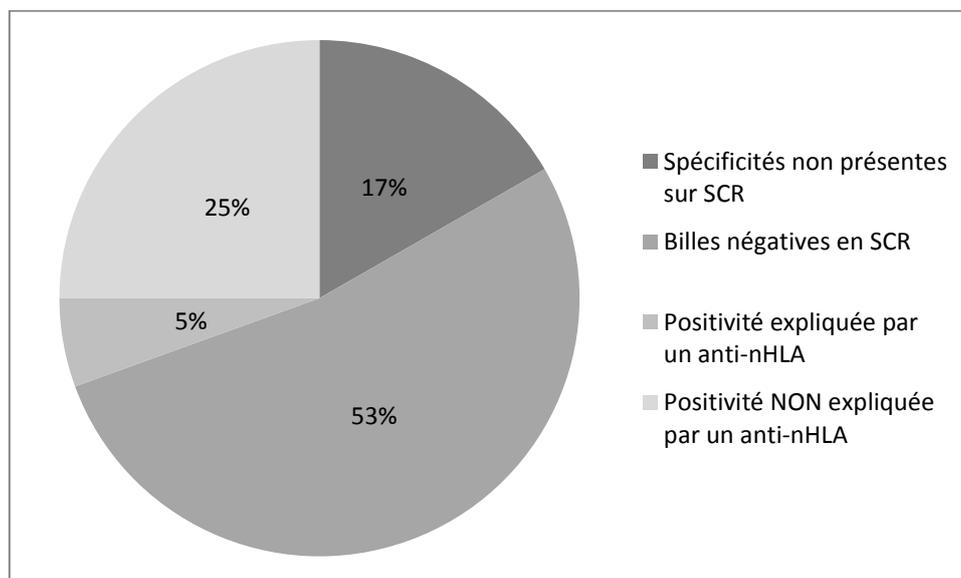


Figure 21 : Répartition des différentes catégories de billes

En comparant les spécificités des anti-dHLA mises en évidence sur le SA de classe I (SA1) et les résultats du SCR correspondant, plusieurs catégories se dessinent :

- les spécificités non identifiables au dépistage, car non présentes sur le panel de billes proposé par le fournisseur (17 %). Il s'agit, la plupart du temps, de spécificités rares ;

- les spécificités portées sur une bille rendue négative au dépistage (53 %) ;
- les spécificités portées sur une bille dont la positivité au dépistage peut être expliquée par la présence d'anti-nHLA concomitante (5 %), les billes SCR étant polyspécifiques ;
- les spécificités portées sur une bille dont la positivité au dépistage ne peut pas être imputable à la présence d'un anti-nHLA (25 %).

Ces catégories, hormis la première, ne se distinguent pas par leurs différences de profil. Il est donc impossible de préjuger de la nature d'un anticorps (anti-nHLA ou anti-dHLA) en s'aidant des résultats du dépistage.

Les spécificités présentes sur le panel de dépistage sont présentées en annexe.

E. Identification des anti-dHLA de classe II

Les valeurs de MFI obtenues pour la classe II ne sont pas interprétables car au moins une des deux billes NC est > 1 500 malgré l'ajout de BSA et l'adsorption systématique. Le Tableau 10 regroupe les valeurs de billes NC et PC avant (ND) et après (D) dénaturation (les valeurs non conformes sont en italique gris) :

Échantillon	NC (ND)	NC (D)	PC (ND)	PC (D)	PC/NC (ND)	PC/NC (D)
II-1	76,61	<i>1 900,62</i>	12 447,06	2 020,52	162,47	<i>1,06</i>
II-2	<i>4 009,97</i>	760,96	13 675,62	958,21	3,41	<i>1,26</i>
II-3	85,81	<i>19 345,88</i>	12 712,26	14 403,68	148,14	<i>0,74</i>
II-4	<i>11 726,72</i>	<i>1 480,53</i>	<i>83,82</i>	1 551,86	<i>0,01</i>	<i>1,05</i>

Tableau 10 : Valeurs des billes de contrôle lors des manipulations effectuées pour l'identification des anti-dHLA de classe II

F. Matchmaker

L'extrapolation des typages avec Haplostats donne des résultats statistiquement probables à plus de 70 %. Dans le cas où plusieurs typages en 4 digits sont proposés par l'algorithme, les différentes solutions (n = 3 au maximum) sont testées dans Matchmaker mais cela n'induisait aucune variation de résultats.

Parmi les 36 anti-dHLA de classe I mis en évidence, nous observons trois catégories :

- 13 (36 %) anti-dHLA pour lesquels Matchmaker ne renvoie aucun épèle ; on peut donc supposer que ces anticorps ne ciblent pas un épèle accessible sur une protéine HLA native, probablement un épèle cryptique ;
- 20 (56 %) anti-dHLA pour lesquels Matchmaker renvoie des épèles « autres » ou combinaisons d'épèles, et dont la réactivité reste à étudier ;
- 3 (8 %) anti-dHLA pour lesquels on peut expliquer la réactivité par un épèle connu et publié dans la littérature. Ces anti-dHLA ne se distinguent pas par une médiane de rapport D/N différente des autres catégories. Il pourrait s'agir de mélanges de dHLA et de nHLA.

G. Crossmatch en CMF

Le crossmatch par cytométrie en flux est préconisé par la SFHI pour valider l'anti-dHLA éventuellement mis en évidence. Il est testé pour le sérum du patient 23, contenant un anti-dHLA de spécificité A*26:01 et dont la MFI est de 6 000. Ce crossmatch est réalisé avec des lymphocytes de donneur sain exprimant le A*26:01 à leur surface.

Le typage du patient est HLA-A2,30 ; B35,57 ; DRB1*07,*08 ; DQB1*03(8),*03(9), celui du donneur est HLA-A26,29 ; B44,51 ; Cw1,16 ; DRB1*01,*07 ; DQB1*05,*02.

Le crossmatch est négatif, ce qui confirme le caractère anti-« HLA dénaturé » de l'anti-A*26:01.

IV. Discussion

Les résultats indiquent que 42 % des patients présentent au moins un anti-dHLA de classe I, soit 1,4 % des billes étudiées. Ceci est comparable aux données de Visentin *et al.* qui trouvent des anti-dHLA de classe I chez 39 % des patients⁹³. Les fréquences des différentes spécificités étudiées sont significativement augmentées par rapport aux données de la littérature⁹³.

Toutefois, lorsque l'on s'intéresse au nombre de billes positives, on s'aperçoit qu'une proportion plus importante de billes est classée anti-dHLA que dans les études comparables^{92,93,97}. Une explication possible est que les patients sélectionnés pour notre étude étaient ceux pour lesquels la suspicion d'anti-dHLA était forte, tandis que la plupart des autres cohortes comprennent des patients en attente de greffe choisis au hasard.

A. Réflexions sur les billes SA1

Les réactifs utilisés pour la technique Luminex sont de deux types :

- Les billes utilisées pour le dépistage, présentant à leur surface des antigènes d'origine naturelle (plaquettes, lignées transformées par EBV), et purifiés puis fixés sur la bille⁹⁸ ;
- Les billes utilisées pour l'identification, présentant à leur surface un seul type d'antigène, d'origine recombinante, puis purifié à partir d'une lignée cellulaire.

Un certain nombre de molécules HLA peuvent se trouver dénaturées durant la fabrication et les trois causes potentielles seraient :

- la production de l'antigène recombinant (lot),
- la purification sur la lignée,
- et la fixation sur la bille (batch).

C'est pourquoi des anti-dHLA peuvent se trouver sur la bille^{39,92} mais il est impossible d'en connaître la proportion.

Ravindranath *et al.*⁹⁹ ont récemment cherché à caractériser la densité en protéines HLA natives et dénaturées à la surface de billes de différents fournisseurs, et ont mis en évidence des différences significatives entre les panels, posant ainsi la question d'un éventuel impact clinique.

Dans cette étude, les auteurs considèrent la molécule HLA de classe I comme un trimère composé des éléments suivants : la chaîne lourde (HC), la $\beta 2m$ ($\beta 2$) et le peptide (pep). Ils définissent ainsi plusieurs variants structurels de la molécule en fonction de la présence (a) ou l'absence (f pour *free*) d'un élément, par exemple pepA- $\beta 2aHC$ pour une molécule native.

À l'aide de différents anticorps monoclonaux (Figure 22), il est possible de caractériser les variants suivants :

- Le réactif W6/32 reconnaît les molécules HLA natives avec ou sans peptide enchâssé (soit pepA- $\beta 2aHC$ et pepF- $\beta 2aHC$) ;
- Le réactif HC-10 reconnaît un épitope cryptique situé sur la chaîne lourde (il se lie au pepF- $\beta 2aHC$ et $\beta 2fHC$) ;
- Le réactif TFL-006 reconnaît un épitope naturellement masqué par la $\beta 2m$ (il ne réagit qu'avec $\beta 2fHC$).

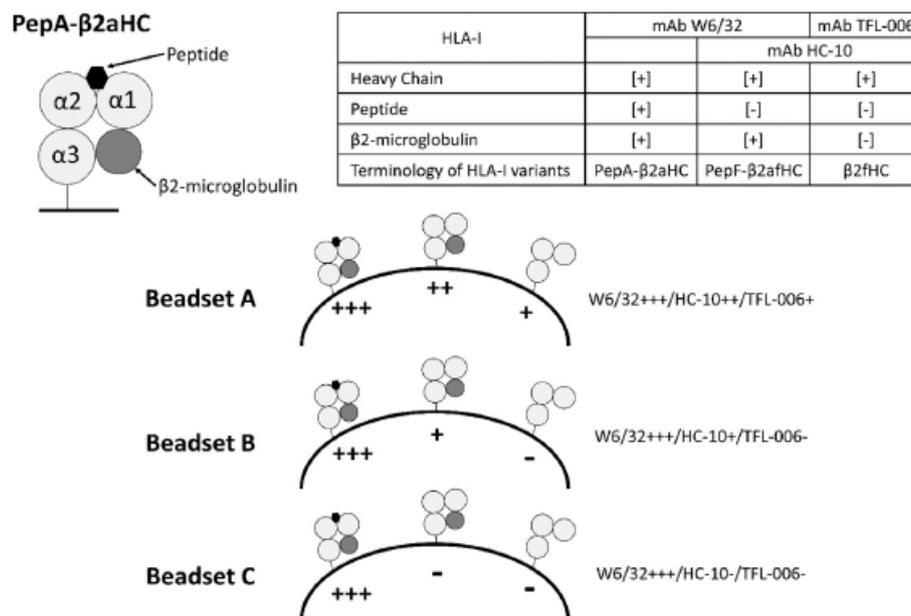


Figure 22 : Comparaison des résultats obtenus pour les différents fournisseurs

D'après Ravindranath *et al.*, « Monitoring native HLA-I trimer specific antibodies in Luminex multiplex single antigen bead assay: Evaluation of beadsets from different manufacturers »⁹⁹

Ces résultats confirment qu'il existe, à la surface des SA1 (*Beadset A* dans l'étude), plusieurs variants, et que, les *iBeads* (*Beadset B*) sont dépourvues de $\beta 2fHC$. Cependant, l'emploi de l'anticorps TFL-006 semble controversé¹⁰⁰, et les résultats suggérant une redéfinition du terme « HLA dénaturé » sont encore en discussion¹⁰¹.

B. Validation des lots de SA1

À chaque réception de nouveau lot de SA1 au CHRU de Lille, une validation du lot est effectuée : elle comprend une analyse qualitative des billes (distribution des allèles, cohérence avec le panel de dépistage) ainsi qu'une comparaison quantitative avec l'ancien lot. Nous proposons d'ajouter à cette validation une étape de test du lot pour apprécier la densité en molécules HLA dénaturé, en utilisant de l'HC-10⁹¹. Cette étape supplémentaire permettra d'évaluer la robustesse du lot et du batch.

D'autre part, un des contrôles qualité du fabricant OneLambda est l'utilisation du W6/32 (cité ci-dessus), anticorps monoclonal reconnaissant un épitope qui n'apparaît qu'en présence d'une molécule HLA native (épitope conformationnel constitué par l'assemblage du fragment HC et de la $\beta 2m$). Cet anticorps permet ainsi d'évaluer la proportion de molécules natives fixées sur la bille. Le logiciel HLA Fusion propose un facteur de correction prenant en compte les tests effectués avec le W6-32. Il est pour l'instant difficile d'évaluer la pertinence de cet outil dans la pratique quotidienne.

Les résultats du patient 12 ont été analysés en tenant compte de ce facteur de correction et, malgré la présence de nombreux anti-dHLA, le profil restait le même. L'outil n'a cependant été testé que pour un patient. D'autre part nous ne savons pas à quelle étape OneLambda évalue la dénaturation : après la production du recombinant, la purification sur lignée ou la fixation sur bille.

C. Dénaturation par la chaleur

Cette méthode de dénaturation présente les avantages suivants :

- Facilité de en œuvre (pas de tampon ni d'ajustement de pH),
- Peu de matériel supplémentaire nécessaire par rapport à un SA1 classique (principalement un thermocycleur)
- Gain de temps par rapport à la dénaturation à l'acide.

Cette notion de dénaturation par la chaleur avait été introduite par Cai *et al.* en 2015⁹⁴ et notre stratégie au laboratoire s'est basée sur les résultats de cette publication, malheureusement sans succès. Il semblerait cependant que l'augmentation non négligeable du bruit de fond, rendant le plus souvent la bille NC supérieure à 1 500, pourrait être évitée en utilisant une concentration plus élevée de BSA (1 % au lieu de 0,1 %).

Toutefois, les recommandations de la SFHI mentionnaient uniquement le traitement des billes à l'acide pour la dénaturation, et nous manquons à ce jour d'études permettant de valider la pertinence de ce protocole de dénaturation.

Cette technique semble prometteuse mais n'est, en l'état, pas encore applicable et nécessiterait la réalisation d'autres études pour sa validation.

D. Seuil proposé pour caractériser un anti-dHLA

Un rapport $D/N \geq 1,2$ pour une $MFI-N \geq 1\ 000$ a été proposé pour caractériser la présence d'un anti-dHLA. Ce rapport permet de modéliser l'augmentation de MFI consécutive au traitement acide des billes de SA1, et avait été défini par l'équipe de Bordeaux en se basant sur leur coefficient de variation intralaboratoire (estimé à 13 %⁴). En effet, la méthode Luminex présente un coefficient de variation généralement de l'ordre de 20 %⁷⁸, et estimé de 10 à 18 % pour le SA1 au laboratoire d'histocompatibilité de Lille. Cette variation ne permet pas de considérer le seuil de 1,2 comme suffisant pour affirmer la présence d'un anti-dHLA.

Nous avons donc choisi le seuil de 1,6 pour considérer une spécificité comme « non pertinente » et ainsi la retirer de la liste des antigènes interdits de CRISTAL, ce qui nous semblait assurer une sécurité satisfaisante pour le patient. Il est intéressant de noter que lors de notre étude, plus de 70 % des anti-dHLA avaient un seuil supérieur à 1,6.

Toutefois, affirmer la pertinence d'un anticorps peut être une tâche ardue pour le biologiste étant donné que la MFI est un facteur semi-quantitatif. La définition d'un seuil de MFI pour lequel un anticorps doit être pris en compte est encore une notion débattue. Dans une récente publication, Sullivan⁷⁹ résume cette idée par la formulation « *MFI Threshold: Mostly a Fluid Idea?* », mettant ainsi en lumière l'importance d'une interprétation rationnelle basée sur les connaissances et le contexte plutôt que la seule valeur de MFI.

Ces considérations amènent à examiner les ratios D/N compris entre 1,2 et 1,6 au cas par cas et les considérer comme potentiellement associés à des anti-dHLA.

E. Retrait des spécificités du logiciel CRISTAL

Retirer des spécificités de la liste CRISTAL n'est pas sans risque pour le patient car le fait d'attribuer un greffon contenant contre lequel un patient est immunisé peut mener à une réaction de rejet hyperaigu avec échec de la greffe. Dans leur article intitulé « Analyse épitopique de la réponse humorale dirigée contre les molécules HLA natives ou dénaturées en transplantation d'organes »⁹⁷, Visentin *et al.* ont formulé l'hypothèse que certains sérums pouvant contenir un mélange de dHLA et de nHLA réagissant avec le même allèle (mais des épitopes différents) pouvaient à la fois montrer un aspect de dHLA et positiver un crossmatch.

Il serait donc nécessaire de valider l'identification d'un anti-dHLA par d'autres techniques, comme le crossmatch en CMF (ce qui est recommandé par la SFHI), les techniques d'absorption ou élution⁷⁹, ou encore l'utilisation des *iBeads*, mais ceci engendre un surcoût non négligeable dans la réalisation des analyses.

L'utilisation de Matchmaker conduit à penser que les anti-dHLA pour lesquels Matchmaker ne renvoie aucun épilète sont dirigés contre des épitopes non accessibles à la surface de la molécule et ceci semble valider l'absence de pathogénicité *in vivo*.

Ces anticorps pourraient par la suite être validés comme des anti-dHLA et retirés de CRISTAL, ce qui aurait pour conséquence de modifier la valeur du Taux de Greffons Incompatibles (TGI ou cPRA).

L'équipe de Bordeaux a évalué l'impact des anti-dHLA sur l'accès à la greffe (Figure 23). Étant donné que les anti-dHLA ne semblent pas pathogènes, il peut être intéressant de ne pas en tenir compte lors du calcul du TGI. Cette pratique permet d'améliorer l'accès à la greffe, plus particulièrement chez les patients présentant une immunisation faible à moyenne (diminution du TGI d'environ 10 %⁹³).

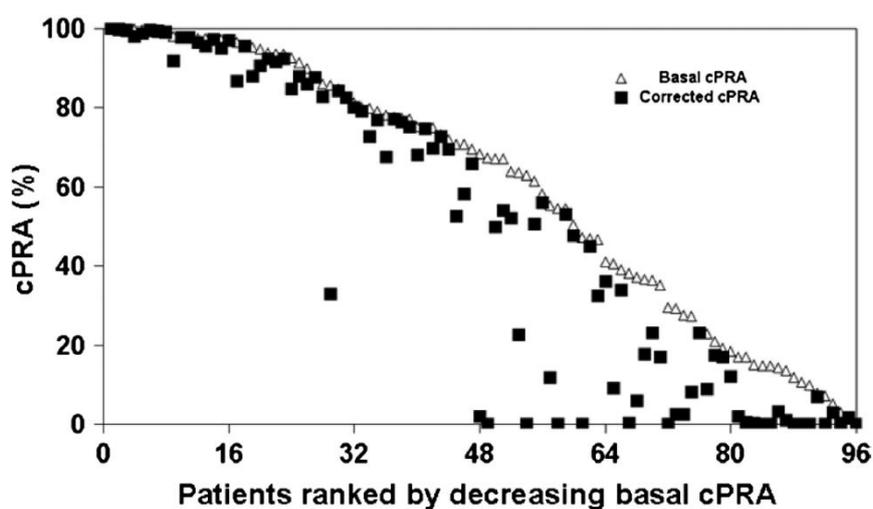


Figure 23 : Impact des anti-dHLA sur le TGI

Comparaison des valeurs de TGI (= basal cPRA) et de TGI corrigé sans tenir compte des anti-dHLA (= corrected cPRA).

D'après Visentin et al., « Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation »⁹³

F. Identification des anti-dHLA : pour quels patients ?

La technique de dénaturation à l'acide implique deux passages du sérum en Luminex (un en condition D et un en condition N). La densité antigénique pouvant différer entre les lots et selon le locus considéré⁸¹, il est nécessaire d'effectuer ces passages en parallèle afin d'obtenir des valeurs de MFI comparables entre elles.

Toutefois, le surcoût engendré par cette stratégie doit être pris en compte lorsque la recherche d'anti-dHLA est indiquée. Il convient alors de sélectionner les patients chez qui l'identification sera effectuée de manière systématique au laboratoire.

Nous avons proposé plusieurs catégories de patients pour lesquels une identification des anti-dHLA nous semble pertinente :

- Patients hyperimmunisés : l'hyperimmunisation impose dans certains cas de transplanter avec des anti-HLA ou un crossmatch parfois positif sur des sérums historiques. L'identification des anti-dHLA pourrait ainsi permettre de réduire le nombre d'antigènes interdits⁹⁷ ;
- Patients en attente de greffe de cœur sous assistance ventriculaire en raison du fort contexte inflammatoire qui peut être associé à l'émergence de nombreux anti-HLA non spécifiques^{83,85,102}. Toutefois, ils ne sortent pas de manière significative dans notre cohorte ;
- Enfant ou homme sans évènement immunisant connu : rappelons qu'en situation pré-greffe et chez un patient présentant un taux d'immunisation faible, cette analyse peut permettre de réduire de 10 % le TGI.

Bien évidemment, cette liste n'est pas exhaustive et la diversité des situations rencontrées au quotidien au laboratoire impose une analyse « au cas par cas ». Ceci semble être une solution acceptable dans la mesure où le nombre de patient susceptibles de bénéficier de cette méthode est faible et nécessite une attention particulière.

De plus, le coût engendré par la réalisation d'analyses supplémentaires est parfois moindre que celui engendré par des patients en attente de greffe ou par une désimmunisation effectuée à tort.

G. Apports de l'étude dans la pratique du laboratoire de Lille

L'étude des spécificités des anti-dHLA a contribué à actualiser les connaissances au sein du laboratoire. Une hypothèse couramment formulée au sein de l'équipe était que les spécificités B*57:01 et B*58:01 (souvent mises en évidence lors d'un SA1) auraient pu être associées à des réactivités non spécifiques ou bien dues à des anti-dHLA.

Les résultats de notre étude mettent effectivement en évidence 4 anti-« B*57:01 » et 5 anti-« B*58:01 » en conditions N, mais aucun n'est caractérisé par la suite comme anti-dHLA.

HLA Matchmaker identifie un épitope impliqué dans la réactivité observée : l'éplet 62GRN. Le 62GRN est exprimé chez A*02:08, A*02:20, tous les B*57 et B*58:01, 02 et 06 (*antibody verified*). Ces spécificités n'étant pas présentes dans le lot de SA1 utilisé, il est donc difficile d'aller plus loin dans notre réflexion.

En 2016, la SFHI recommande la stratégie suivante pour le dépistage et l'identification des anti-dHLA de classe I :

1. *Les anticorps naturels et anti-dHLA sont à suspecter avec tous les résultats Luminex.*
2. *Si un anticorps naturel est dirigé contre un HLA natif, il faut le considérer comme un anticorps anti-nHLA d'origine allogénique*
3. *Pour différencier un anticorps anti-nHLA et un anti-dHLA :*
 - a. *Effectuer un crossmatch en CMF (si MFI assez élevée) : il sera positif avec un anticorps anti-nHLA et négatif avec un anticorps anti-dHLA*
 - b. *Ou effectuer un test à l'acide : on observera une augmentation « significative » de MFI si le sérum contient un ou des anticorps anti-dHLA*
 - c. *(Utilisation des iBeads si commercialisation)*
4. *On démontre l'intérêt de reconnaître les anticorps anti-dHLA dans les cas suivants :*
 - a. *Pré-greffe :*
 - i. *Patient « naïf »*
 - ii. *Projet de greffe Donneur Vivant*
 - iii. *Large immunisation et faible accès à la greffe*
 - b. *Post-greffe :*
 - i. *Apparition de DSA et pas d'événements ni de signes cliniques*

5. *Conduite à tenir si un anticorps anti-dHLA est identifié :*

a. *Pré-greffe :*

i. *Rénale :*

- *tester les spécificités en crossmatch CMF prospectif*
- *ne pas inscrire la spécificité sur CRISTAL si absence de réactivité*

ii. *Thoracique :*

- *tester les spécificités en crossmatch CMF prospectif*
- *Ou si non testé : faire un crossmatch CMF rétrospectif et adapter le traitement*

b. *Post-greffe :*

i. *Discuter du suivi et du traitement avec les cliniciens*

Notons qu'il n'existe pas de recommandation pour les greffes de moelle, ni de foie (on considère classiquement que les transplantations hépatiques sont peu concernées par les rejets humoraux).

D'après les observations rassemblées lors de ce travail, nous avons pu dégager une proposition de stratégie pour la détection et l'identification des anticorps anti-« HLA dénaturé » de classe I au sein du laboratoire d'histocompatibilité de Lille.

- *Devant toute anomalie constatée lors de la technique de SA1, et si le contexte clinico-biologique le justifie (patients cibles mentionnés plus haut), on effectuera l'identification des anti-dHLA de classe I en suivant le protocole présenté en annexe ;*
- *En présence d'un ratio D/N $\geq 1,6$ on pourra affirmer la présence d'un anti-dHLA de classe I dans le sérum du patient. Les ratios compris entre 1,2 et 1,6 pourront être discutés selon le contexte ;*
- *La validation de l'identification via le programme *antibody analysis* de Matchmaker permettra de conforter l'analyse ;*
- *Si l'analyse est réalisée dans un contexte pré-greffe, on pourra alors retirer les antigènes correspondants de la liste des antigènes interdits de CRISTAL (sans pour autant en faire des antigènes permis !!)*

En raison du surcoût engendré par la réalisation des deux SA1 supplémentaires permettant l'identification du ou des éventuels anti-dHLA de classe I présents dans un sérum donné, il n'est pas possible, pour le moment, d'envisager de confirmer le caractère anti-« HLA dénaturé » par crossmatch en CMF en routine au laboratoire de Lille. De plus, il faut tenir compte du fait que seuls les anticorps dont la MFI est supérieure à 3 000 sont dits « capables de positiver un crossmatch en CMF ».

H. Forces et limites de notre travail

Ce travail a renforcé la connaissance relative à l'interprétation des résultats du Luminex et a permis d'affiner l'analyse des anti-HLA, ce qui est profitable à la fois pour le biologiste dans le rendu de résultats, et pour le patient concerné (amélioration de l'accès à la greffe et du suivi post-greffe).

L'étude était unicentrique, néanmoins, la problématique ayant été soulevée par d'autres équipes, les résultats pouvaient être interprétés en fonction des données déjà disponibles dans la littérature. Cependant, un biais de sélection des patients était observé car une proportion de billes « anti-dHLA » légèrement supérieure aux données de la littérature était observée.

Pour des raisons de coût et de délai de mise en œuvre, la taille de la cohorte était petite mais, les analyses ayant déjà été reproduites par ailleurs, les comparaisons aux données disponibles étaient possibles.

La nouvelle technique servira uniquement pour les réactivités non expliquées en classe I, mais il serait avantageux de disposer d'une technique similaire pour dépister les anticorps anti-dHLA de classe II. En situation post-greffe, les molécules de classe II sont les principales pourvoyeuses de DSA néoformés⁵⁵ (notamment le DQ).

L'étude de la dénaturation des molécules de classe II par la chaleur serait une piste à poursuivre.

V. Conclusion

Ce travail nous a permis d'identifier les anti-dHLA de classe I présents dans les sérums de patients avant ou après la greffe. Ces anti-dHLA se caractérisent par leur absence de pathogénicité, mais sont difficiles à suspecter : ils apparaissent indépendamment de l'âge, du sexe, des évènements immunisants, et ne sont pas associés à un profil particulier sur les résultats de dépistage. De plus, on ne peut pas les pressentir d'après la spécificité d'anticorps et ils sont donc susceptibles d'être présents dans tous les sérums étudiés en Luminex.

Pourtant, discriminer les anticorps anti-nHLA et anti-dHLA permet l'amélioration de l'accès à la greffe. En 2016, la SFHI recommandait leur identification, notamment par une technique à l'acide. C'est cette technique que nous avons choisie pour la mise en place de notre stratégie d'identification. Ceci nous a permis d'améliorer les performances du laboratoire dans l'analyse des anticorps anti-HLA. De plus, l'utilisation du logiciel *HLA Matchmaker* a montré son intérêt pour la validation des anticorps anti-dHLA et son utilisation prend place dans notre stratégie.

La technique d'identification des anti-dHLA à l'acide est maintenant utilisable en pratique courante au CHRU de Lille, après une analyse au cas par cas des patients par le biologiste, en raison de sa mise en œuvre longue et coûteuse. L'utilisation d'un protocole de dénaturation à la chaleur semble réduire le temps et le coût engendré mais nécessite une mise au point plus approfondie.

L'étude des anti-dHLA de classe II reste à ce jour impossible au laboratoire de Lille mais serait nécessaire pour assurer un suivi pré- et post-greffe du patient.

Aujourd'hui, les avancées technologiques en matière d'identification des Ac anti-HLA (fixation du complément, sous-classes, titration...) vont permettre à long terme d'apporter de plus amples renseignements sur la pertinence clinique des anticorps détectés, et ainsi, le biologiste pourra conclure quant à leur pathogénicité. Ceci pourra permettre d'alimenter le dialogue clinico-biologique, indispensable entre une équipe de greffe et le laboratoire d'histocompatibilité pour une prise en charge optimale du patient.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Dausset J.** [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 1958 ; 20:156–66.
- [2] HLA Nomenclature @ hla.alleles.org [Internet]. [cited 2017 Aug 19] ; Available from: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>
- [3] Le typage HLA à l'ère du séquençage à haut-débit | biorigami [Internet]. [cited 2017 Sep 25] ; Available from: <http://www.biorigami.com/?p=6737>
- [4] **Visentin J.** Propriétés des anticorps anti-HLA en transplantation d'organes [Internet]. 2016 ; Available from : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01336559/document>
- [5] **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Masson PL.** Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson ; 2016.
- [6] **Klein J, Sato A.** The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000 ; 343:702–9.
- [7] **Klein J, Sato A.** The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000 ; 343:782–6.
- [8] **Labalette M., Bahram S., Béné M-C.** Le complexe majeur d'histocompatibilité humain (HLA). Polymorphisme et présentation des antigènes aux lymphocytes T [Internet]. [cited 2017 Aug 17] ; Available from : http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-4.-complexe-majeur-d0027histocompatibilite.pdf
- [9] **Grifoni A, Montesano C, Colizzi V, Amicosante M.** Key role of human leukocyte antigen in modulating human immunodeficiency virus progression : An overview of the possible applications. *World J Virol* 2015 ; 4:124–33.
- [10] **Lefranc M-P.** IMGT, the international ImMunoGeneTics information system(R). *Nucleic Acids Res* 2004 ; 33:D593–7.
- [11] **Scott CA, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA.** Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues. *Immunity* 1998 ; 8:319–29.

- [12] **Gascoigne NRJ.** Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8:895–900.
- [13] **Carvalho Bittencourt M., Baron C., Blancho G., Labalette M., Moins Teisserenc H., Sterkers G., Tiberghien P.** Mécanismes de l'alloréactivité, des rejets de greffe et de la réaction du greffon contre l'hôte. [Internet]. [cited 2017 Aug 21] ; Available from : <http://www.assim.refer.org/colleges/colleges/styled/files/page80-13.8.allore0301activite0301.pdf>
- [14] **Cai J, Terasaki PI.** Humoral theory of transplantation : mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol* 2005 ; 66:334–42.
- [15] **Terasaki PI, Cai J.** Humoral theory of transplantation : further evidence. *Curr Opin Immunol* 2005 ; 17:541–5.
- [16] **Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm).** Transplantation d'organes : quelles voies de recherche ? [Internet]. 2009th ed. Les éditions Inserm ; [cited 2017 Aug 21]. Available from : <http://hdl.handle.net/10608/92>
- [17] **Legendre C, Loupy A, Rabant M, Aubert O, Rabaté C, Delville M, et al.** [Current aspects of acute humoral rejection]. *Nephrol Ther* 2014 ; 10:479–83.
- [18] **Clatworthy MR, Espeli M, Torpey N, Smith KGC.** The generation and maintenance of serum alloantibody. *Curr Opin Immunol* 2010 ; 22:669–81.
- [19] **Chu VT, Berek C.** The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev* 2013 ; 251:177–88.
- [20] **Hyun J, Park KD, Yoo Y, Lee B, Han BY, Song EY, et al.** Effects of different sensitization events on HLA alloimmunization in solid organ transplantation patients. *Transplant Proc* 2012 ; 44:222–5.
- [21] **Lopes D, Barra T, Malheiro J, Tafulo S, Martins L, Almeida M, et al.** Effect of Different Sensitization Events on HLA Alloimmunization in Kidney Transplantation Candidates. *Transplant Proc* 2015 ; 47:894–7.
- [22] **Masson E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I, et al.** Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum Immunol* 2013 ; 74:946–51.

- [23] **Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, et al.** Two-way cell traffic between mother and fetus : biologic and clinical implications. *Blood* 1996 ; 88:4390–5.
- [24] **van Kampen CA, Versteeg-vd Voort Maarschalk MFJ, Langerak-Langerak J, Roelen DL, Claas FHJ.** Kinetics of the pregnancy-induced humoral and cellular immune response against the paternal HLA class I antigens of the child. *Hum Immunol* 2002 ; 63:452–8.
- [25] **Everett ET, Kao KJ, Scornik JC.** Class I HLA molecules on human erythrocytes. Quantitation and transfusion effects. *Transplantation* 1987 ; 44:123–9.
- [26] **Rivera R, Scornik JC.** HLA antigens on red cells. Implications for achieving low HLA antigen content in blood transfusions. *Transfusion (Paris)* 1986 ; 26:375–81.
- [27] **Delbos F, Cesbron A.** Caractérisation de l’allo-immunisation anti-HLA et impact clinique en transfusion et en transplantation d’organe. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang* 2017.
- [28] **Scornik JC, Meier-Kriesche H-U.** Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2011 ; 11:1785–91.
- [29] **Scornik JC, Pfaff WW, Howard RJ, Fennell RS, Ramos E, Peterson JC, et al.** Increased antibody responsiveness to blood transfusions in pediatric patients. *Transplantation* 1994 ; 58:1361–5.
- [30] **Reisner EG, Kostyu DD, Phillips G, Walker C, Dawson DV.** Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens* 1987 ; 30:161–6.
- [31] **Rebibou J-M, Chabod J, Alcalay D, Coussediere M-C, Deteix P, Touchard G, et al.** Flow cytometric evaluation of pregnancy-induced anti-HLA immunization and blood transfusion-induced reactivation. *Transplantation* 2002 ; 74:537–40.
- [32] **Scornik JC, Kriesche H-UM.** Human leukocyte antigen sensitization after transplant loss: timing of antibody detection and implications for prevention. *Hum Immunol* 2011 ; 72:398–401.
- [33] **Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al.** Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation* 2013 ; 95:410–7.

- [34] **Lachmann N, Niemann M, Reinke P, Budde K, Schmidt D, Halleck F, et al.** Donor-Recipient Matching Based on Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes Independently Predicts the Incidence of De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Following Renal Transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2017 ;
- [35] **Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thaunat O, Dubois V, et al.** Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. *J Am Soc Nephrol JASN* 2016 ; 27:615–25.
- [36] **Cioni M, Nocera A, Innocente A, Tagliamacco A, Trivelli A, Basso S, et al.** De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Developing Early or Late after Transplant Are Associated with the Same Risk of Graft Damage and Loss in Nonsensitized Kidney Recipients. *J Immunol Res* [Internet] 2017 [cited 2017 Aug 22] ; 2017. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5358457/>
- [37] **Rees L, Kim JJ.** HLA sensitisation: can it be prevented? *Pediatr Nephrol Berl Ger* 2015 ; 30:577–87.
- [38] **El-Awar N, Terasaki P, Lazda V, Nikaein A, Manning C, Arnold AN.** Almost all patients who are waiting for a regraft of a kidney transplant have anti-HLA antibodies. *Transplant Proc* 2002 ; 34:2531–2.
- [39] **Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J.** “Natural” human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008 ; 86:1111–5.
- [40] **Hirata AA, Terasaki PI.** Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. *Science* 1970 ; 168:1095–6.
- [41] **Duquesnoy RJ, Askar M.** HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. V. Eplet matching for HLA-DR, HLA-DQ, and HLA-DP. *Hum Immunol* 2007 ; 68:12–25.
- [42] **Duquesnoy RJ.** A Structurally Based Approach to Determine HLA Compatibility at the Humoral Immune Level. *Hum Immunol* 2006 ; 67:847–62.
- [43] HLA - Epitope Registry [Internet]. [cited 2017 Aug 23] ; Available from: <http://www.epregistry.com.br/>

- [44] **Doxiadis IIN, Duquesnoy RJ, Claas FHJ.** Extending options for highly sensitized patients to receive a suitable kidney graft. *Curr Opin Immunol* 2005 ; 17:536–40.
- [45] **Duquesnoy RJ.** Are We Ready for Epitope-Based HLA Matching in Clinical Organ Transplantation? *Transplantation* 2017 ; 101:1755–65.
- [46] **Duquesnoy RJ.** The eplet load concept in clinical transplantation. *Pediatr Transplant* 2016 ; 20:884–5.
- [47] **Svejgaard A, Kissmeyer-Nielsen F.** Cross-reactive human HL-A isoantibodies. *Nature* 1968 ; 219:868–9.
- [48] **El-Awar N, Jucaud V, Nguyen A.** HLA Epitopes: The Targets of Monoclonal and Alloantibodies Defined. *J Immunol Res* 2017 ; 2017:3406230.
- [49] **Fuller AA, Rodey GE, Parham P, Fuller TC.** Epitope map of the HLA-B7 CREG using affinity-purified human alloantibody probes. *Hum Immunol* 1990 ; 28:306–25.
- [50] **Fuller AA, Trevithick JE, Rodey GE, Parham P, Fuller TC.** Topographic map of the HLA-A2 CREG epitopes using human alloantibody probes. *Hum Immunol* 1990 ; 28:284–305.
- [51] **Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al.** Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2012 ; 12:1157–67.
- [52] **Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O.** Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet Lond Engl* 1966 ; 2:662–5.
- [53] **Patel R, Terasaki PI.** Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969 ; 280:735–9.
- [54] **Jeannot M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS.** Humoral Antibodies in Renal Allotransplantation in Man. *N Engl J Med* 1970 ; 282:111–7.
- [55] **Ntokou I-SA, Iniotaki AG, Kontou EN, Darema MN, Apostolaki MD, Kostakis AG, et al.** Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: high immunogenicity of HLA class II graft molecules. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2011 ; 24:1084–93.

- [56] **Loupy A, Hill GS, Jordan SC.** The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol* 2012 ; 8:348–57.
- [57] **Zhang R.** Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2017 ;
- [58] **Agence de la Biomédecine.** Le rapport annuel médical et scientifique 2016 - greffe de rein [Internet]. [cited 2017 Aug 31] ; Available from: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2016/donnees/organes/06-rein/synthese.htm>
- [59] **Stastny P, Ring S, Lu C, Arenas J, Han M, Lavingia B.** Role of immunoglobulin IgG and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Hum Immunol* 2009 ; 70:600–4.
- [60] **Bryan CF, Martinez J, Muruve N, Nelson PW, Pierce GE, Ross G, et al.** IgM antibodies identified by a DTT-ameliorated positive crossmatch do not influence renal graft outcome but the strength of the IgM lymphocytotoxicity is associated with DR phenotype. *Clin Transplant* 2001 ; 15 Suppl 6:28–35.
- [61] **Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, Mooney N, et al.** Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013 ; 369:1215–26.
- [62] **Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB.** Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* 2012 ; 16:12–7.
- [63] **Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen J-P, Vernerey D, Aubert O, et al.** IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol JASN* 2016 ; 27:293–304.
- [64] **O’Leary JG, Kaneku H, Banuelos N, Jennings LW, Klintmalm GB, Terasaki PI.** Impact of IgG3 subclass and C1q-fixing donor-specific HLA alloantibodies on rejection and survival in liver transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2015 ; 15:1003–13.
- [65] **Viglietti D, Loupy A, Vernerey D, Bentelejewski C, Gosset C, Aubert O, et al.** Value of Donor-Specific Anti-HLA Antibody Monitoring and Characterization for Risk Stratification of Kidney Allograft Loss. *J Am Soc Nephrol JASN* 2017 ; 28:702–15.

- [66] **El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, Saji H, et al.** Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 2009 ; 70:844–53.
- [67] **Société Francophone d’Histocompatibilité.** Le point sur les recommandations issues des groupes de travail SFHI : Ac anti HLA.
- [68] **Polakova K, Karpatova M, Russ G.** Dissociation of beta 2-microglobulin is responsible for selective reduction of HLA class I antigenicity following acid treatment of cells. *Mol Immunol* 1993 ; 30:1223–30.
- [69] **Michel K, Santella R, Steers J, Sahajpal A, Downey FX, Thohan V, et al.** Many de novo donor-specific antibodies recognize $\beta 2$ -microglobulin-free, but not intact HLA heterodimers. *HLA* 2016 ; 87:356–66.
- [70] **Pereira S, Perkins S, Lee J-H, Shumway W, LeFor W, Lopez-Cepero M, et al.** Donor-specific antibody against denatured HLA-A1 : clinically nonsignificant? *Hum Immunol* 2011 ; 72:492–8.
- [71] **Cai J, Terasaki PI, Anderson N, Lachmann N, Schönemann C.** Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 2009 ; 88:226–30.
- [72] **Oaks M, Michel K, Sulemanjee NZ, Thohan V, Downey FX.** Practical value of identifying antibodies to cryptic HLA epitopes in cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2014 ; 33:713–20.
- [73] **Schnabl E, Stockinger H, Majdic O, Gaugitsch H, Lindley IJ, Maurer D, et al.** Activated human T lymphocytes express MHC class I heavy chains not associated with beta 2-microglobulin. *J Exp Med* 1990 ; 171:1431–42.
- [74] **Agence de la Biomédecine.** Recommandations concernant le suivi immunologique des patients en attente de greffe d’organes ou greffés [Internet]. [cited 2017 Jul 18] ; Available from : <https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/recommandations-concernant-le-suivi-immunologique-des-patients-en-attente-de-greffe-d-organes-ou-greffes.pdf>
- [75] **Doxiadis IIN, Roelen D, Claas FHJ.** Mature wines are better: CDC as the leading method to define highly sensitized patients. *Curr Opin Organ Transplant* 2010 ; 15:716–9.

- [76] **Suthanthiran M, Garovoy MR.** Immunologic monitoring of the renal transplant recipient. *Urol Clin North Am* 1983 ; 10:315–25.
- [77] **Georgescu D, Ferrari-Lacraz S, Villard J.** [Anti-HLA antibody detection and rejection in kidney transplantation: impact of the new technologies]. *Rev Med Suisse* 2007 ; 3:1064–9.
- [78] **Moalic-Allain V.** Pièges de l'interprétation des anticorps anti-HLA par technologie Luminex. *Ann Biol Clin (Paris)* 2014 ; 72:178–84.
- [79] **Sullivan HC, Gebel HM, Bray RA.** Understanding solid-phase HLA antibody assays and the value of MFI. *Hum Immunol* 2017 ; 78:471–80.
- [80] **Otten HG, Verhaar MC, Borst HPE, van Eck M, van Ginkel WGJ, Hené RJ, et al.** The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2013 ; 173:536–43.
- [81] **Bettinotti MP, Zachary AA, Leffell MS.** Clinically relevant interpretation of solid phase assays for HLA antibody. *Curr Opin Organ Transplant* 2016 ; 21:453–8.
- [82] **Kokko KE, Bray RA, Nickerson PW, Gebel HM.** Proinflammatory Events and HLA Antibodies: Nothing to Sneeze At. *Am J Transplant* 2009 ; 9:1971–2.
- [83] **Askar M, Hsich E, Reville P, Nowacki AS, Baldwin W, Bakdash S, et al.** HLA and MICA allosensitization patterns among patients supported by ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2013 ; 32:1241–8.
- [84] **George I, Colley P, Russo MJ, Martens TP, Burke E, Oz MC, et al.** Association of device surface and biomaterials with immunologic sensitization after mechanical support. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008 ; 135:1372–9.
- [85] **John R, Lietz K, Schuster M, Naka Y, Rao V, Mancini DM, et al.** Immunologic sensitization in recipients of left ventricular assist devices. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003 ; 125:578–91.
- [86] **Ravindranath MH, Jucaud V, Banuelos N, Everly MJ, Cai J, Nguyen A, et al.** Nature and Clonality of the Fluoresceinated Secondary Antibody in Luminex Multiplex Bead Assays Are Critical Factors for Reliable Monitoring of Serum HLA Antibody Levels in Patients for Donor Organ Selection, Desensitization Therapy, and Assessment of the Risk for Graft Loss. *J Immunol Baltim Md 1950* 2017 ; 198:4524–38.

- [87] **Reed EF, Rao P, Zhang Z, Gebel H, Bray RA, Guleria I, et al.** Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for the detection of antibodies to HLA. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2013 ; 13:1859–70.
- [88] **Baxter-Lowe LA, Cecka M, Kamoun M, Sinacore J, Melcher ML.** Center-defined unacceptable HLA antigens facilitate transplants for sensitized patients in a multi-center kidney exchange program. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 2014 ; 14:1592–8.
- [89] **Gupta A, Iveson V, Varaganam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham RC.** Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant? *Transplantation* 2008 ; 85:1200–4.
- [90] **Tait BD, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R.** Solid phase HLA antibody detection technology--challenges in interpretation. *Tissue Antigens* 2010 ; 76:87–95.
- [91] **Taylor CJ, Kosmoliaptsis V, Martin J, Knighton G, Mallon D, Bradley JA, et al.** Technical Limitations of the C1q Single-Antigen Bead Assay to Detect Complement Binding HLA-Specific Antibodies. *Transplantation* 2017 ; 101:1206–14.
- [92] **Visentin J, Guidicelli G, Nong T, Moreau J-F, Merville P, Couzi L, et al.** Evaluation of the iBeads assay as a tool for identifying class I HLA antibodies. *Hum Immunol* 2015 ; 76:651–6.
- [93] **Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, Jacquelinet C, Audry B, Nong T, et al.** Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. *Transplantation* 2014 ; 98:738–44.
- [94] **Cai J, Terasaki PI, Zhu D, Lachmann N, Schönemann C, Everly MJ, et al.** Complement-fixing antibodies against denatured HLA and MICA antigens are associated with antibody mediated rejection. *Exp Mol Pathol* 2016 ; 100:45–50.
- [95] **HLAMatchmakerManualVs02.pdf** [Internet]. [cited 2017 Aug 26] ; Available from: <http://www.epitopes.net/pdfs/manuals/HLAMatchmakerManualVs02.pdf>
- [96] **HLAMatchmaker** [Internet]. [cited 2017 Sep 25] ; Available from: <http://www.epitopes.net/what.html>

- [97] **Visentin J, Guidicelli G, Moreau J-F, Lee J-H, Taupin J-L.** Deciphering allogeneic antibody response against native and denatured HLA epitopes in organ transplantation. *Eur J Immunol* 2015 ; 45:2111–21.
- [98] **Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schönemann C.** Luminex® and Its Applications for Solid Organ Transplantation, Hematopoietic Stem Cell Transplantation, and Transfusion*. *Transfus Med Hemotherapy* 2013 ; 40:182–9.
- [99] **Ravindranath MH, Jucaud V, Ferrone S.** Monitoring native HLA-I trimer specific antibodies in Luminex multiplex single antigen bead assay: Evaluation of beadsets from different manufacturers. *J Immunol Methods* 2017 ;
- [100] **Visentin J, Guidicelli G, Taupin J-L.** Conformational Variants of HLA-I Antigens on Luminex Single Antigen Beads. *Transplantation* 2017 ; 101:e152–3.
- [101] **Ravindranath MH, Jucaud V.** The Authors' Reply. *Transplantation* 2017 ; 101:e153–4.
- [102] **Nikaein A, El-Awar N, Hunt J, Rosenthal EJ, Eichhorn E, Hall S, et al.** Clinically irrelevant circulating human leukocyte antigen antibodies in the presence of ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant* 2012 ; 31:443–7.

ANNEXES

SPECIFICITE DES BILLES DE DEPISTAGE (ONELAMBDA, LOT 20)

6	A*01:01, A*80:01, B*18:01, B*50:01, C*02:02, C*06:02
	A*01:01, A*29:02, B*08:01, B*45:01, C*06:02, C*07:01
	A*01:02, A*69:01, B*08:01, B*55:01, C*01:02, C*07:01
8	A*11:01, A*24:02, B*15:01, B*15:34, B*35:01, C*03:03, C*04:01
	A*02:06, A*24:02, B*54:01, B*67:01, C*01:02, C*07:02
	A*02:01, A*31:01, B*15:01, B*67:01, C*07:02,
9	A*02:07, A*24:02, A*24:58, A*24:59, A*24:63, B*40:01, B*40:55, B*46:01, C*01:02, C*03:04
	A*11:02, A*24:02, B*27:06, B*40:01, C*03:04,
	A*02:06, A*80:01, B*18:01, B*27:05, C*02:02,
14	A*11:01, A*24:02, B*59:01, B*40:01, C*01:02, C*03:04
	A*24:02, A*32:01, B*14:01, B*18:01, C*07:01, C*08:02
	A*11:01, A*24:02, A*24:50, A*24:54, A*24:55, A*24:56, A*24:58, B*54:01, B*59:01, C*01:02
15	A*02:06, A*11:01, B*15:12, B*51:01, C*03:04, C*14:02
	A*02:01, B*52:01, B*73:01, C*07:01, C*15:05
	A*33:01, A*74:01, B*15:03, B*78:01, C*02:02, C*16:01
16	A*01:01, A*11:01, B*46:01, B*57:01, C*06:02, C*08:03
	A*11:01, A*30:01, B*13:02, B*15:02, C*06:02, C*08:01
	A*01:01, A*02:01, A*02:66, A*02:67, B*57:01, B*82:01, C*03:02, C*06:02
17	A*25:01, A*68:01, A*68:22, B*14:02, B*58:01, C*07:01, C*08:02
	A*33:03, A*68:02, A*68:34, B*37:01, B*58:01, C*02:02, C*02:10, C*07:01, C*07:18
	A*33:03, A*74:01, B*15:16, B*42:01, C*14:02, C*17:01
18	A*24:02, A*24:50, A*24:54, A*24:55, A*24:56, A*24:58, A*30:02, B*37:01, B*48:01, C*06:02, C*08:01
	A*03:01, A*03:14, A*03:20, A*03:21N, A*23:01, B*41:01, B*49:01, C*07:01, C*08:02
	A*34:01, B*40:02, B*56:01, C*01:02, C*15:02
20	A*03:02, A*26:01, B*15:18, B*47:01, C*07:04, C*15:02
	A*03:01, A*03:14, A*03:20, A*03:21N, A*66:01, B*15:03, B*52:01, C*02:10, C*12:02
	A*03:01, A*66:01, B*07:02, B*81:01, C*15:05, C*18:01
21	A*02:06, A*31:01, B*39:01, B*48:01, C*07:02, C*08:01
	A*26:01, A*34:01, B*38:02, B*15:21, C*04:03, C*07:02
	A*29:02, A*69:01, B*39:06, B*55:01, C*01:02, C*07:02
22	A*29:02, A*74:01, B*13:02, B*44:03, C*06:02, C*16:01, C*16:08
	A*25:01, A*36:01, B*07:02, B*07:44, B*07:49N, B*44:02, C*05:01, C*05:07N, C*05:13, C*07:02, C*07:32N
	A*25:01, A*30:01, B*42:01, B*44:03, C*16:01, C*17:01, C*17:02, C*17:03, C*17:04
24	A*33:03, A*36:01, B*15:16, B*53:01, C*04:01, C*14:02
	A*30:01, A*36:01, B*15:10, B*35:01, C*03:04, C*04:01
	A*30:01, A*33:03, B*53:01, B*81:01, C*04:01, C*08:04

SPECIFICITES DES ANTI-DHLA

<u>Nom</u>	<u>Sexe</u>	<u>DDN</u>	<u>Greffe</u>	<u>Typage</u>	<u>anti-dHLA</u>	<u>anti-nHLA</u>	<u>AC avec MFI ≥ 1000</u>	<u>Spécificité anti-dHLA</u>
Patient 6	F	05/08/1990	cœur	A*03,*68; B*35,*44;C*04,*07; DRB1*11; DQB1*03(7)	6	4	10	A*66:02, B*07:02, B*48:01, B*73:01, B*81:01, C*02:02
Patient 12	M	02/11/1986	moelle	A*29:02,*68:02; B*07:02,*49:01; C*07:01,*07:02; DRB1*15:03; DQB1*06:02; DPB1*02:01,*105:01	9	1	10	B*15:02, B*15:03, B*15:11, B*15:12, B*40:01, B*40:02, B*41:01, B*45:01, B*48:01
Patient 15	M	01/07/1958	rein	A3,33; B7,60; DRB1*15,*04; DQB1*06,*03	1	12	13	A*80:01
Patient 17	M	18/03/1976	rein	A 2,32; B35,61; DRB1*04,*11; DQB1*04,*03(7)	1	4	5	A*43:01
Patient 18	M	29/03/1964	rein	A3; B51,38; DRB1*13,*14; DQB1*05,*06	2	3	5	A*29:01, A*29:02
Patient 19	F	28/05/1984	cœur	A30,32; B13,18; DRB1*07,*16; DQB1*02,*06	1	1	2	C*01:02
Patient 20	M	07/04/1972	cœur	A*02,*03; B*07,*51; C*07,*14; DRB1*01,*13; DQB1*05,*06	1	6	7	A*25:01
Patient 22	M	27/02/1992	rein	A26,29; B50,45 DRB1*01,*04; DQB1*05,*04	2	4	6	B*15:02, C*16:01
Patient 23	F	14/09/2010	rein	A2,30; B35,57; DRB1*07,*08; DQB1*03 (8,9)	11	2	13	A*25:01, A*26:01, A*33:01, A*33:03, A*34:02, A*66:01, A*66:02, A*68:01, A*68:02, A*69:01, C*05:01
Patient 24	M	05/11/1961	foie	A*03,*24; B*15(62),*35; DRB1*13; DQB1*06	1	5	6	C*05:01
Patient 25	M	14/05/1948	rein	A*02; B*27,*40(60); C*02,*03(10); DRB1*03(17),*13; DQB1*02,*06	1	12	13	A*33:01

Les résultats de typage indiqués entre parenthèses sont les équivalents sérologiques

ANA-FI –HLA-XX : IDENTIFICATION D’ANTICORPS ANTI-« HLA DÉNATURÉ »
PAR TRAITEMENT À L’ACIDE DES BILLES UTILISÉES LORS DE LA
TECHNIQUE SENSIBLE LUMINEX

I-Principe de la technique :

Le test « Single Antigen » permet d’affiner les recherches d’Ac anti HLA de classe I et de classe II lorsque le dépistage par technique sensible LUMINEX est positif. Il arrive que ce test très sensible propose des spécificités d’Ac anti-HLA incohérentes par rapport au passé immunologique du patient. Ceci peut s’expliquer par la présence d’Ag HLA dénaturés (= qui ne sont pas dans leur configuration naturelle) à la surface des billes, ce qui expose des épitopes normalement inaccessibles aux Ac du patient et entraîne par conséquent une réactivité significative en terme de MFI. Ces réactivités, nommées « Ac anti-HLA dénaturés » ne sont pas délétères en cas de greffe puisque les Ag HLA du greffon sont dans leur configuration naturelle, et il convient donc de les identifier afin de ne pas les attribuer à tort dans CRISTAL. Lors des journées EFI de Caen en 2016, la SFHI a recommandé d’identifier les Ac anti-HLA dénaturé et de ne pas les attribuer dans CRISTAL. Cette recherche n’est actuellement possible que pour la classe I.

II-Sujets concernés :

La présence d’Ac anti-HLA dénaturé doit être suspectée :

- En pré-greffe chez tout patient qui présente une immunisation anti-HLA de classe I sans événement immunisant (grossesse, transfusion ou greffe).

III-Consommables :

- Billes SA OneLambda LS1A04 (classe I)
- Tampon de dénaturation : solution de glycine 0,1M contenant 1 % de BSA, pH = 2,5
- Conjugué anti-IgG
- PBS
- *Wash Buffer 1X*
- EDTA
- *Adsorb out*

IV-Instructions opératoires :

a) Préparation du tampon de dénaturation (possible la veille)

1 mL de glycine 0,1M

100 µL de BSA 10%

NaOH (utiliser une pipette de 10 µL pour ajouter au goutte à goutte), ajuster le pH à 2,5 au pH-mètre

b) Préparation des sérums

Traitement à l'EDTA (possible la veille ou même avant) : cf. ANA-FI-HLA-179

Traitement à l'*Adsorb out* (à faire le jour même) : cf. ANA-FI-HLA-179

c) Dénaturation des billes

Vortexer les billes

Déposer $(n + 1) \times 4 \mu\text{L}$ de billes dans un microtube ($n =$ nombre d'échantillons)

Centrifuger à 3 000 tours par minute pendant 5 min

Éliminer le surnageant

Remettre le culot en suspension dans du tampon de dénaturation (15 fois le volume initial de billes)

Incuber pendant 30 min sous agitation à l'abri de la lumière

Diluer au 1/3 dans du WB

Centrifuger à 3 000 tours/minute pendant 5 min

Éliminer le surnageant

Reprendre dans $(n + 1) \times 150 \mu\text{L}$ de WB

d) Billes témoins

Suivre exactement le même protocole pour les billes non dénaturées en remplaçant le tampon de dénaturation par du PBS.

e) Préparation de la plaque

Cf. ANA-FI-HLA-281

V-Interprétation

Nommer les expériences en fonction des billes utilisées. Par exemple, « expérience1-denat » pour la condition D et « expérience1-nondenat » pour la condition N.

Le calcul de la MFI à prendre en compte suit la formule « normalised baseline »

Lorsque les valeurs de MFI sont obtenues, copier-coller le fichier RAW dans le fichier Excel disponible sur le X:/transplantation, dossier « Ac anti-HLA dénaturé » (le mode d'emploi est disponible avec le fichier Excel). Penser à faire « enregistrer sous » dans le même dossier pour garder un modèle Excel vierge.

- En présence d'un ratio $D/N \geq 1,6$ on pourra affirmer la présence d'un anti-dHLA dans le sérum du patient. Les ratios compris entre 1,2 et 1,6 pourront être discutés selon le contexte ;
- La validation de l'identification via le programme *antibody analysis* de Matchmaker permettra de conforter l'analyse ;
- Si l'analyse est réalisée dans un contexte pré-greffe, on pourra alors retirer les antigènes correspondants de la liste des antigènes interdits de CRISTAL (sans pour autant en faire des antigènes permis).

EXEMPLE DE RESULTAT OBTENU PAR FICHER EXCEL

(Patient 23)

	anti-nHLA	anti-dHLA	douteux		
	2	9	2		
Numéro de bil	MFI-N	Spécificité	MFI-D	Ratio	Catégorie
003	0,00	A*01:01	0,00	0,00	négatif
004	0,00	A*02:01	0,00	0,00	négatif
005	0,00	A*02:03	0,00	0,00	négatif
006	0,00	A*02:06	0,00	0,00	négatif
007	0,00	A*03:01	17,21	0,00	négatif
008	0,00	A*11:01	2,17	0,00	négatif
009	189,25	A*11:02	0,00	0,00	négatif
010	0,00	A*23:01	0,00	0,00	négatif
011	0,00	A*24:02	0,00	0,00	négatif
012	0,00	A*24:03	10,01	0,00	négatif
013	4797,33	A*25:01	12559,90	2,62	dénaturé
014	11980,68	A*26:01	15852,01	1,32	douteux
015	62,61	A*29:01	0,00	0,00	négatif
016	0,91	B*27:05	33,77	37,11	négatif
017	157,11	A*29:02	4,43	0,03	négatif
018	0,00	A*30:01	0,00	0,00	négatif
019	923,73	A*30:02	575,81	0,62	négatif
020	0,00	A*31:01	0,00	0,00	négatif
021	0,00	A*32:01	66,16	0,00	négatif
022	6471,25	A*33:01	15192,95	2,35	dénaturé
023	0,00	A*34:01	0,00	0,00	négatif
024	5752,04	A*34:02	17512,14	3,04	dénaturé
025	0,00	A*36:01	0,00	0,00	négatif
026	0,00	A*43:01	0,00	0,00	négatif
027	8850,09	A*66:01	15739,89	1,78	dénaturé
028	7663,15	A*66:02	14098,94	1,84	dénaturé
029	1722,07	A*68:01	12724,90	7,39	dénaturé
030	5027,73	A*68:02	13101,21	2,61	dénaturé
031	8109,03	A*69:01	10690,00	1,32	douteux
032	0,00	A*74:01	37,87	0,00	négatif
033	151,85	A*80:01	0,00	0,00	négatif
034	0,00	B*07:02	0,00	0,00	négatif
035	27,03	B*08:01	2687,34	99,42	négatif
036	683,82	B*13:02	26,41	0,04	négatif
037	0,00	B*14:01	0,00	0,00	négatif
038	9,35	B*14:02	0,00	0,00	négatif
040	73,53	B*15:01	15,67	0,21	négatif
041	7494,81	B*15:02	5246,24	0,70	natif
042	84,51	B*15:03	23,14	0,27	négatif
043	45,29	B*15:10	19,85	0,44	négatif
044	3,42	B*15:12	0,00	0,00	négatif
045	14,33	B*15:13	22,00	1,54	négatif
046	0,00	B*15:16	0,00	0,00	négatif
047	361,19	B*18:01	117,76	0,33	négatif
048	26,23	B*27:08	27,51	1,05	négatif
049	645,36	B*35:01	233,22	0,36	négatif
050	0,00	B*37:01	285,09	0,00	négatif
051	115,87	B*38:01	26,86	0,23	négatif
052	78,34	B*39:01	28,01	0,36	négatif
053	0,00	B*40:01	0,00	0,00	négatif
054	21,61	B*40:02	49,23	2,28	négatif
055	16,57	B*41:01	44,31	2,67	négatif
056	32,02	B*42:01	85,94	2,68	négatif
057	6,43	B*44:02	2,92	0,45	négatif

058	13,61	B*44:03	0,00	0,00	négatif
059	1,51	B*45:01	0,00	0,00	négatif
060	0,00	B*49:01	0,00	0,00	négatif
061	16,39	B*47:01	0,00	0,00	négatif
062	2,39	B*48:01	111,16	46,51	négatif
063	269,32	B*46:01	19,00	0,07	négatif
064	28,72	B*50:01	0,00	0,00	négatif
065	10,09	B*51:01	8,83	0,88	négatif
066	13,70	B*51:02	4,28	0,31	négatif
067	0,00	B*52:01	0,00	0,00	négatif
068	18,21	B*53:01	0,00	0,00	négatif
069	0,00	B*54:01	0,00	0,00	négatif
070	52,98	B*55:01	21,79	0,41	négatif
071	0,00	B*56:01	0,00	0,00	négatif
072	0,00	B*57:01	0,00	0,00	négatif
073	0,00	B*57:03	0,00	0,00	négatif
074	0,00	B*58:01	0,00	0,00	négatif
075	15,99	B*59:01	0,00	0,00	négatif
076	23,67	B*67:01	29,69	1,25	négatif
077	27,82	B*73:01	0,00	0,00	négatif
078	19,41	B*78:01	0,00	0,00	négatif
079	21,81	B*81:01	145,32	6,66	négatif
080	407,88	B*82:01	0,00	0,00	négatif
081	105,03	C*01:02	119,54	1,14	négatif
082	82,41	C*02:02	0,00	0,00	négatif
083	54,18	C*03:02	0,00	0,00	négatif
084	62,87	C*03:03	0,00	0,00	négatif
085	101,09	C*03:04	0,00	0,00	négatif
086	119,96	C*04:01	0,00	0,00	négatif
087	6624,88	C*05:01	14953,14	2,26	dénaturé
088	37,40	C*06:02	0,00	0,00	négatif
089	679,45	C*07:02	1259,66	1,85	négatif
090	0,00	C*08:01	0,00	0,00	négatif
091	48,73	C*12:03	3,65	0,07	négatif
092	82,91	C*14:02	0,00	0,00	négatif
093	27,21	C*15:02	50,71	1,86	négatif
094	68,34	C*16:01	3,48	0,05	négatif
095	0,00	C*17:01	0,00	0,00	négatif
096	210,89	C*18:02	139,96	0,66	négatif
097	80,75	B*13:01	9,74	0,12	négatif
098	2098,40	B*15:11	877,77	0,42	natif
099	60,93	B*40:06	34,23	0,56	négatif
100	1958,02	A*33:03	12039,19	6,15	dénaturé
001	0,00	NC	0,00	0,00	négatif
002	106,51	PC	0,00	0,00	négatif

Le premier tableau dénombre les anticorps trouvés.

Le deuxième tableau précise le numéro de bille, la spécificité retrouvée à la surface de la bille, les valeurs de MFI en conditions N (MFI-N) et en conditions D (MFI-D), le ratio D/N et la catégorie d'Ac correspondante selon le classement suivant :

- Négatif signifie que la valeur de MFI en condition N est inférieure à 1 000
- Natif renvoie à un ratio D/N < 1,2
- Douteux renvoie à un ratio D/N compris entre 1,2 et 1,6
- Dénaturé renvoie à un ratio D/N ≥ 1,6

Nom : VOREUX

Prénom : Rébecca

Titre de la thèse : Mise en place d'une stratégie d'identification des anticorps anti-« HLA dénaturé » au laboratoire d'histocompatibilité du CHRU de Lille

Mots-clés : anticorps anti-HLA, HLA dénaturé, histocompatibilité, greffe, Luminex, suivi immunologique, rejet, CRISTAL

Résumé :

Contexte : Les anti-dHLA sont la cause de réactions faussement positives observées en technique Luminex. L'objectif principal de notre travail est de répondre à une recommandation de la SFHI qui met en avant la nécessité de faire la part entre les anti-« HLA natif » et les anti-« HLA dénaturé », afin de pouvoir s'affranchir de l'interférence causée par les anti-dHLA et ainsi améliorer le suivi immunologique du patient transplanté ou en attente de transplantation.

Méthodes : La technologie Luminex a été utilisée, avec ajout d'une étape dénaturation des billes Single Antigen à l'acide selon un protocole utilisé à Bordeaux, puis comparaison des Mean Fluorescence Intensities obtenues avec et sans dénaturation afin d'obtenir un ratio qui caractérise la nature de l'anticorps anti-HLA. La dénaturation à la chaleur a également été testée. Les spécificités ont ensuite été étudiées via *HLA Matchmaker*.

Résultats : 26 sérums ont été étudiés et 11 d'entre eux présentent des anti-dHLA, soit 36 billes positives, dont 13 ne renvoient aucun épilète sur HLA Matchmaker.

Conclusion et perspectives : La mise en place de ce protocole est possible en routine à Lille pour l'identification des anticorps anti-dHLA, notamment pour le suivi immunologique des patients en attente de transplantation (modification possible des spécificités interdites dans le logiciel CRISTAL d'attribution des greffons). L'étude de la dénaturation à la chaleur est à poursuivre au sein du laboratoire.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Annabelle DUPONT (CHRU de Lille)

Assesseur(s) : Madame le Professeur Myriam LABALETTE (CHRU Lille)
Monsieur le Professeur Marc HAZZAN (CHRU Lille)

Membre(s) extérieur(s) : Monsieur le Docteur Jonathan VISENTIN (CHRU Bordeaux)

Directeur de mémoire : Madame le Docteur Isabelle TOP (CHRU Lille)