

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »

Année 2021

N°80

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES

Spécialité Biologie Médicale

TENANT LIEU DE  
THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Thomas MOREL né le 08 janvier 1994 à AMILLY (45)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30/09/2021

**Appariement en transplantation d'organes : vers la  
compatibilité épitopique?**

JURY

Président : Pr Gilles THIBAUT - CHU TOURS - Laboratoire  
Immunologie

Membres : Pr Philippe GATAULT - CHU TOURS -  
Néphrologie  
Dr Barbara PROUST - EFS CENTRE PAYS DE LA  
LOIRE - TOURS - Laboratoire  
Histocompatibilité - Immunogénétique  
Dr Camille HUMEAU - EFS CENTRE PAYS DE LA  
LOIRE - TOURS - Laboratoire  
Histocompatibilité - Immunogénétique

**ANNEE : 2020 - 2021**

**Directrice : Pr Véronique MAUPOIL**

**Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS**

**Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### **16 PROFESSEURS**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### **3 PROFESSEURS EMERITES**

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### **38 MAITRES DE CONFERENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

DELAZE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAMOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
ODIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
RESAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

### **1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT**

VANIER	Antoine	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
--------	---------	-----------------------------

### **1 DIRECTEUR DE RECHERCHE**

CHALON	Sylvie	INSERM
--------	--------	--------

### **2 CHARGES DE RECHERCHE**

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRA
MOIRE	Nathalie	INRA

### **1 PRAG**

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

### **1 PAST**

JOYEUX	VINCENT	Filière Pharmacie
--------	---------	-------------------

### **3 AHU**

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE



## SERMENT DE GALIEN

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

Date : 30/09/2021

L'étudiant

M Morel Thomas

Le Doyen de la Faculté

Professeur Véronique Maupoil

# **Remerciements**

## **Aux membres du jury**

### **Monsieur le Professeur Gilles Thibault**

Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée durant mon passage au laboratoire d'immunologie. Je suis honoré que vous preniez le temps de juger mon travail et que vous ayez accepté d'être mon président de jury.

### **Monsieur le Professeur Philippe Gatault**

Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse passionnant. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler dessus. Je suis honoré que vous jugiez mon travail.

### **Madame le Docteur Barbara Proust**

Je vous remercie de la confiance que vous m'accordez au laboratoire HLA. Collaborer avec vous est un privilège. Je vous suis infiniment reconnaissant pour votre bienveillance et la patience dont vous avez fait preuve pour m'encadrer sur ce travail. Vos conseils seront toujours les bienvenues. Je suis très honoré que vous jugiez mon travail.

### **Madame le Docteur Camille Humeau**

Je te remercie de m'avoir fait découvrir cet univers si particulier qu'est le HLA. Tu m'as permis de découvrir ma vocation et pour cela tu as toute ma reconnaissance. Je suis honoré que tu juges mon travail.

## **A l'ensemble du laboratoire HLA**

A Béatrice, Damien, Laurent, Franckie, aux Valérie, Cécile, Bernard, Morgane, Fred, Karine, Laura (t'as vu je ne t'ai pas oublié ;) et Laurine. Je vous remercie tous de votre accueil au sein de votre équipe ! C'est un plaisir de travailler avec vous dans la bonne humeur. Votre aide et votre expérience sont très importantes pour l'aboutissement de mes différents projets. Un grand merci à vous tous !

## **A mes co-internes**

A Hadjer, aux Pauline, Aurélien, Justine, Hermann, Estelle, Pierre. J'ai pris beaucoup de plaisir de partager avec vous « l'expérience » de l'internat et je n'espère que le meilleur pour nous tous !

## **A tous mes amis**

Aux tourangeaux (Thomas, Sylvain, Mathilde, Gauvin, Hugo, Natacha, Laura, Tristan, Axel, Nastya, Olivier, Brice, Coralie et j'en oublie plein qu'ils me pardonnent). Vous avez fait de Tours pour moi une ville appréciable que ce soit pour les binouzes ou les sessions escalade (objectif rouge en ligne de mire ahah) et sachez que même si un jour je m'éloigne je ne vous oublierai pas.

Aux clermontois (Anouk, Guillaume, Benoît, Louis, Tristane, Pierre, Lili, Marianne, Pierre-Luc, Jérôme, Hamza, Khaled, Simon et pareil j'en oublie plein mais bon le but de la thèse ce n'est pas de mettre à jour son répertoire ahah). Clermont à jamais dans mon cœur !

Aux montargois (Johé, Justin, Joseph). Amis pour la vie !

### **A ma famille**

A **Sophie**. Tu as été toujours là quand il fallait ! Merci à toi d'être là, la vie est plus douce à tes côtés et je te dois énormément. A nos projets futurs !

A **mes parents Muriel et Alain**. Vous m'avez toujours soutenu dans mes choix et avez su répondre présent dans les moments où c'était difficile. Merci pour tout !

A **mon frère et ma sœur Antoine et Lucie** qui je sais seront toujours là pour moi. Merci à vous !

A **mes grands-parents** qui m'ont toujours gâté. Avec une petite pensée particulière pour mon grand-père qui je sais est fier de moi là où il est.

Je suis très fier de vous présenter ce travail et j'espère que vous prendrez plaisir à le lire.

# Table des matières

Table des matières .....	7
Liste des abréviations .....	9
Liste des figures .....	11
Liste des tableaux .....	12
<b>I. Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>A. Mise à propos .....</b>	<b>13</b>
<b>B. Transplantation rénale : le contexte .....</b>	<b>13</b>
<b>II. La transplantation : évolution des pratiques du XVème siècle au XXème siècle .....</b>	<b>14</b>
<b>A. Les origines : l'autogreffe .....</b>	<b>14</b>
a. Greffe italienne .....	14
b. Jacques-Louis Reverdin .....	15
<b>B. L'allogreffe : les problématiques .....</b>	<b>16</b>
a. La vascularisation .....	16
b. Le rejet .....	17
<b>C. L'histocompatibilité : découverte majeure pour la transplantation .....</b>	<b>19</b>
<b>III. Appariement antigénique dans la transplantation .....</b>	<b>24</b>
<b>A. Système HLA .....</b>	<b>24</b>
a. Présentation du système HLA .....	24
b. Nomenclature HLA .....	27
<b>B. Mécanismes de rejet .....</b>	<b>31</b>
a. Rejet hyper-aigu .....	31
b. Rejet aigu .....	32
c. Rejet chronique .....	34
<b>C. Attribution des organes : transplantation rénale .....</b>	<b>35</b>
a. Score REIN .....	35
b. Anticorps anti-HLA .....	35
<b>IV. Appariement épitopique : antigène versus épitope .....</b>	<b>40</b>
<b>A. Aspects immunologiques de l'épitope .....</b>	<b>40</b>
a. Réaction immunitaire antigène – anticorps : interaction entre épitope et paratope .....	40
b. Epitopes .....	42
<b>B. Exploration des épitopes : Algorithme HLAMatchmaker .....</b>	<b>44</b>
a. Concept de triplets .....	44
b. Les triplets : aperçu de l'utilisation de HLAMatchmaker .....	47
c. Etudes des triplets : impact sur la survie du greffon .....	49
d. Limites des triplets .....	52
e. Vers les eplets .....	54

<b>C.</b>	<b>Intérêts du raisonnement en incompatibilité épitopique .....</b>	<b>59</b>
a.	Compréhension de l'immunisation chez le receveur.....	59
b.	Incompatibilité épitopique : charge épitopique .....	61
c.	Paradigme du « <i>nonself-self</i> » .....	65
d.	L'algorithme PIRCHE.....	67
<b>V.</b>	<b>Perspectives d'application .....</b>	<b>68</b>
<b>A.</b>	<b>Appariement épitopique en transplantation rénale .....</b>	<b>68</b>
a.	Patients hyperimmunisés .....	68
b.	Transplantation donneurs vivants.....	74
<b>B.</b>	<b>Analyse épitopique dans le suivi de DSA.....</b>	<b>79</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>86</b>
<b>VI.</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>87</b>



## Liste des abréviations

Å	Angstrom
ABM	Agence de Biomédecine
BCR	<i>B-Cell Receptor</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
CDR	<i>Complementary Determining Region</i>
CMF	Cytométrie en Flux
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
COVID	<i>COrona Virus Disease</i>
CREG	<i>Cross-REactive Groups</i>
DTT	Dithiothreitol
DSA	<i>Donor Specific Antibody</i>
EDTA	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
HAP	Hyperimmunisé Antigène Permis
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
Ig	Immunoglobuline
IHWS	<i>International Histocompatibility Workshop</i>
IMGT	<i>International ImMunoGeneTics Information System</i>
J+4	4 Jours après
KA	Constante d’affinité
kDa	kiloDalton
LCT	Lymphocytotoxicité
Mb	Mégabase
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
M+4	4 Mois après
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIRCHE	<i>Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes</i>
PRA	<i>Panel-Reactive Antibody</i>
SSP	<i>Single Specific Primer</i>

TerEp	<i>Terasaki Epitope</i>
TDV	Transplantation Donneur Vivant
TGI	Taux de Greffon Incompatible
UNOS	<i>United Network for Organ Sharing</i>
V <sub>H</sub>	<i>Variable domain from Heavy chain</i>
V <sub>L</sub>	<i>Variable domain from Light chain</i>

## Liste des figures

Figure 1 : Esquisse d'une greffe italienne (Pasche, 2017) .....	15
Figure 2 : Schéma d'une anastomose vasculaire (Carrel, 1902) .....	16
Figure 3 : IHWS 1977 .....	21
Figure 4 : Localisation et organisation chromosomique des gènes HLA (Delbos et <i>al</i> , 2018) .....	24
Figure 5 : Nombre d'allèles HLA découverts en fonction de la classe et de l'année ( <a href="https://hla.alleles.org/">https://hla.alleles.org/</a> ) .....	25
Figure 6 : Molécule HLA de classe I .....	26
Figure 7 : Molécule HLA de classe II .....	27
Figure 8 : Réaction positive en LCT (Moalic, 2008) .....	28
Figure 9 : Réaction négative en LCT (Moalic, 2008) .....	28
Figure 10 : Exemple de la nomenclature en sérologie de l'antigène A2 .....	29
Figure 11 : Exemple de la nomenclature en biologie moléculaire de l'antigène A3 (Elsermans et <i>al</i> , 2018 d'après Marsh et <i>al</i> , 2010) .....	30
Figure 12 : Principe de la technique <i>Single Antigen</i> Luminex® .....	36
Figure 13 : Interactions lors de la réaction antigène – anticorps (Kuby, 2000) .....	40
Figure 14 : Représentation du Fab (Finlay et Almagro, 2012) .....	41
Figure 15 : Représentation de la reconnaissance de l'épitope par l'anticorps (Denery, 2016) .....	43
Figure 16: Survie du greffon à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités sérologiques (à gauche) et en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplets) (à droite) (Duquesnoy et <i>al</i> , 2003) .....	50
Figure 17 : Pourcentage d'individus produisant des DSA en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplet) (Dankers et <i>al</i> , 2004) .....	51
Figure 18 : Survie du greffon à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplet) (Laux et <i>al</i> , 2004) .....	53
Figure 19 : Survie du greffon à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplet) (Laux et <i>al</i> , 2004) .....	53
Figure 20 : Structure tridimensionnelle de la molécule HLA-B*53:01 (extrait de OLIN FUSION ®) .....	56
Figure 21 : Eplet défini par l'Acide aspartique en position 70 et l'Arginine en position 71 .....	57
Figure 22 : Eplet défini par 3 acides aminés : la Proline en position 43, l'Alanine en position 69 ainsi que l'Acide glutamique en position 76 .....	57
Figure 23 : Eplet pouvant être défini soit par la Lysine en position 44, soit par la Valine en position 150, soit par la Valine en position 158. ....	57
Figure 24 : Eplet pouvant être défini soit par la Lysine en position 44, soit par la Thréonine en position 41, et par l'Alanine en position 46. ....	58
Figure 25 : Représentation Kaplan-Meier du pourcentage de la survie sans rejet du greffon dans le temps en fonction des incompatibilités épitopiques (eplet) des différents <i>loci</i> (Wiebe et <i>al</i> , 2013) .....	62
Figure 26 : Représentation en boîte à moustache du nombre d'incompatibilités épitopiques (eplet) en fonction du nombre d'incompatibilités sérologiques sur le <i>locus</i> HLA-DR (à gauche) et sur le <i>locus</i> HLA-DQ (à droite) (Wiebe et <i>al</i> , 2013) .....	63
Figure 27 : Représentation Kaplan-Meier du pourcentage de la survie sans rejet du greffon dans le temps en fonction du seuil d'incompatibilités épitopiques (eplet) prédéfini pour le <i>locus</i> HLA-DR (à gauche) et sur le <i>locus</i> HLA-DQ (à droite) (Wiebe et <i>al</i> , 2013) .....	63
Figure 28 : Représentation Kaplan-Meier du pourcentage de survie du greffon dans le temps en fonction du seuil d'incompatibilités épitopiques (eplet) prédéfini pour le <i>locus</i> HLA-DR (à gauche) et sur le <i>locus</i> HLA-DQ (à droite) (Wiebe et <i>al</i> , 2013) .....	64
Figure 29 : Base de données Cristal répertoriant les antigènes permis de la patiente hyperimmunisée .....	71

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des différentes techniques de typage HLA (Elsermans et <i>al</i> , 2018) .....	31
Tableau 2 : Association entre « force » (DSA) en <i>Single Antigen</i> Luminex®, résultat du <i>crossmatch</i> et risque immunologique (Kheav, 2018).....	39
Tableau 3 : Répertoire des triplets sur les antigènes HLA de classe I (Duquesnoy, 2001).....	46
Tableau 4 : Typages sérologiques HLA entre le patient receveur et deux donneurs potentiels (d'après Duquesnoy, 2001). .....	47
Tableau 5 : Représentation des triplets non partagés sur les incompatibilités HLA-B60 (premier donneur potentiel) et HLA-B8 (deuxième donneur potentiel) avec les antigènes HLA du patient receveur (Duquesnoy, 2001). .....	48
Tableau 6 : Survie du greffon à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplet) (Laux et <i>al</i> , 2004).....	52
Tableau 7 : Séquence polymorphique d'acides aminés composant les épitopes des allèles du patient receveur en comparaison avec l'allèle à l'origine de l'immunisation (Ducieux et <i>al</i> , 2018 d'après Marrari et <i>al</i> , 2011) .....	55
Tableau 8 : Spécificités HLA pour lequel le patient a développé des anticorps (Technique <i>Single Antigen</i> Luminex) (Snanoudj, 2016) .....	60
Tableau 9 : Différence des acides aminés sur les eplets entre celui responsable de l'immunisation et ceux du patient (Duquesnoy, 2012).....	66
Tableau 10 : Typage HLA de la patiente hyperimmunisée en résolution allélique.....	70
Tableau 11 : Typage HLA du donneur potentiel.....	73
Tableau 12 : Typages alléliques de classe I du receveur et des donneurs potentiels.....	75
Tableau 13 : Eplets incompatibles entre le receveur et les donneurs potentiels pour la classe I.....	75
Tableau 14 : Typage allélique de classe II du receveur et des donneurs potentiels. ....	76
Tableau 15 : Eplets incompatibles entre le receveur et les donneurs potentiels pour la classe II. ....	76
Tableau 16 : Typages alléliques de classe I du receveur et des donneurs potentiels.....	77
Tableau 17 : Eplets incompatibles entre le receveur et les donneurs potentiels pour la classe I.....	77
Tableau 18 : Typages alléliques de classe II du receveur et des donneurs potentiels. ....	78
Tableau 19 : Eplets incompatibles entre le receveur et les donneurs potentiels pour la classe II. ....	78
Tableau 20 : Typages HLA alléliques du patient et de son donneur. ....	80
Tableau 21 : Liste des eplets incompatibles entre le receveur et le donneur en rouge pour la classe I (Extraction Excel du module MatchMaker du logiciel HLA FUSION ® de One Lambda) .....	80
Tableau 22 : Spécificités HLA pour lequel le patient a développé des anticorps à J+4 post-transplantectomie. ....	82
Tableau 23 : Spécificités HLA pour lequel le patient a développé des anticorps à M+4 post-transplantectomie. ....	84

# **I. Introduction**

## **A. Mise à propos**

L'utilisation en Médecine de la greffe et de la transplantation pour pallier un déficit organique ou esthétique est ancestrale. Ces thérapies, utilisées comme dernier recours pour traiter certaines pathologies, se sont perfectionnées au fil des siècles. Des premières autogreffes aux transplantations d'organe, les problématiques n'ont cessé d'évoluer. Aujourd'hui, le phénomène de rejet constitue le risque majeur d'échec dans la transplantation. Grâce à la compréhension de ce phénomène, l'amélioration de l'appariement antigénique entre un receveur et son donneur et l'évolution des traitements immunosuppresseurs permettent de prévenir le rejet. Néanmoins, le rejet impacte toujours la survie du transplant. Depuis quelques années, l'analyse de la compatibilité entre un receveur et son donneur évolue avec l'étude des chaînes d'épitopes composant l'antigène pour, ainsi, mieux appréhender l'immunisation des patients transplantés et permettre d'entrevoir de nouvelles perspectives dans la mise en place de la prévention du rejet, en particulier dans la transplantation rénale.

## **B. Transplantation rénale : le contexte**

Le nombre de patients inscrits sur la liste nationale d'attente pour une transplantation rénale est en constante augmentation. Au 1<sup>er</sup> janvier 2020, en France, 8642 patients étaient inscrits sur la liste nationale d'attente soit 6% de plus que l'année précédente à la même date. Chaque année, depuis 2015, environ 5000 nouveaux patients sont inscrits sur la liste nationale d'attente et environ 3500 patients sont transplantés (1). La transplantation rénale représente à l'heure actuelle plus de 60% des transplantations pratiquées en France (1). Bien que le nombre de transplantations rénales évoluait positivement depuis près de 10 ans, l'épidémie de COVID-19 a fait considérablement chuter ce nombre en 2020, en particulier entre le mois de mars et le mois de juin. En effet, 3643 transplantations rénales ont été réalisées en 2019 contre 2591 en 2020. Ces chiffres sont équivalents à ceux de l'année 2004 (1). A l'heure actuelle, la transplantation rénale est la thérapie par excellence qui permet d'obtenir la meilleure balance bénéfice/risque chez les patients insuffisants rénaux chroniques.

## **II. La transplantation : évolution des pratiques du XV<sup>ème</sup> siècle au XX<sup>ème</sup> siècle**

### **A. Les origines : l'autogreffe**

#### **a. Greffe italienne**

Malgré plusieurs légendes dont la véracité demeure douteuse, il est considéré que la greffe a vu le jour au XV<sup>ème</sup> siècle en Italie pendant la Renaissance. Les derniers progrès sur l'anatomie datent, à cette époque, de l'Antiquité. En effet, pendant près d'un millénaire, dans la grande majorité des pays du pourtour méditerranéen, la dissection du corps humain est interdite, considérée comme une atteinte du caractère sacré de l'Homme (2).

En 1565, dans ce contexte de découverte, évolue Gaspare Tagliacozzi, nommé Tagliacozzi en référence à sa ville de naissance, un étudiant en médecine qui commence à exercer au sein de l'Hôpital de La Mort de la ville de Bologne (3). Il fait l'apprentissage de la médecine sur des prisonniers condamnés à mort et, lorsque ceux-ci sont exécutés, achète leurs corps pour les disséquer et avoir une meilleure compréhension de l'anatomie humaine. En 1570, il devient professeur de chirurgie et d'anatomie (4).

Dans l'Italie de la Renaissance, il existe beaucoup de personnes mutilées au visage et en particulier au niveau du nez pour diverses raisons (complication de la syphilis, duel à l'épée, punition corporelle, batailles...) (4). Gaspare Tagliacozzi propose un protocole détaillé pour permettre une reconstruction nasale. La méthode est la suivante : il s'agit de découper partiellement un bout de la chair situé sur le bras ; lui donner la forme d'un nez humain ; de le suturer sur le moignon du nez du patient tout en gardant une extrémité de la chair rattachée au bras. L'objectif de cette manœuvre est de créer une vascularisation entre les tissus de la face et le greffon de peau tout en conservant la vitalité de celui-ci vu qu'il est encore vascularisé par l'intermédiaire du bras. L'ensemble de la procédure peut durer une centaine de jours jusqu'à ce que le greffon soit détaché complètement du bras pour être définitivement suturé au niveau de la face. Cela nécessite une immobilisation totale du bras grâce à une attelle (5). Ainsi naquit la première méthode d'autogreffe que l'on nommera plus tard « greffe italienne » (Figure 1). Ce type d'autogreffe sera utilisé pendant plusieurs siècles et notamment sur les soldats mutilés durant la Première Guerre Mondiale (« Les Gueules Cassées »).



Figure 1 : Esquisse d'une greffe italienne (Pasche, 2017)

#### b. Jacques-Louis Reverdin

L'autogreffe commence à être réellement développée au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle notamment grâce à Jacques-Louis Reverdin, un chirurgien originaire de Genève en Suisse qui travaille à l'époque à l'Hôpital Necker à Paris. En 1869, Reverdin se lance dans une expérience des plus inhabituelles en matière de cicatrisation des plaies. Un homme est hospitalisé suite à une blessure au coude, la peau est arrachée dans toute son épaisseur jusqu'à la moitié de l'avant-bras. Le lambeau cutané ne peut être recousu car celui-ci est complètement nécrosé. Devant ce cas de figure où la cicatrisation peut prendre des mois voire des années, Reverdin a une intuition et décide d'expérimenter une technique non pratiquée qui selon lui permettrait d'accélérer de manière considérable la cicatrisation de la plaie. Pour cela, il décide de retirer des petits morceaux d'épiderme du patient avec une lancette et les place au milieu de la plaie. Après une attente de plusieurs jours, les morceaux d'épiderme se sont soudés et ont formé une plaque blanche montrant ainsi un début de cicatrisation. A partir de cette expérience, l'autogreffe de peau va être développée et devenir une pratique reconnue dans la cicatrisation des plaies (6).

## B. L'allogreffe : les problématiques

### a. La vascularisation

En 1905, le Docteur Konrad Zirm réussit la première allogreffe : une cornée à un homme de 45 ans (7). Les greffes avasculaires se développent de plus en plus au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Pour ce qui est des transplantations à proprement parler, elles ne pourront se développer que si la problématique du raccord vasculaire est résolue.

En 1894, le Président de la République Française, Marie François Sadi Carnot, de passage à Lyon, reçoit un coup de couteau dans la veine porte. Les chirurgiens ne parvenant pas à suturer le vaisseau, le président décède de ses blessures. Après cet événement, Alexis Carrel un jeune externe de médecine, profondément choqué par l'évènement, entreprit d'acquérir les connaissances nécessaires pour prévenir ce genre d'accident (8). Pour cela, il prit des cours avec une brodeuse lyonnaise afin de réaliser des sutures de plus en plus fines et minutieuses. Ces cours particuliers lui permettent de mettre en place une technique, encore utilisée à l'heure actuelle, pour les anastomoses vasculaires : la triangulation (9) (Figure 2). Ainsi, en 1902, il rédige un article « La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères » où il explique notamment comment il a réussi à réunir la carotide primitive d'un chien avec son artère rénale (autotransplantation rénale). Cette publication lui permettra d'avoir le prix Nobel en 1912.

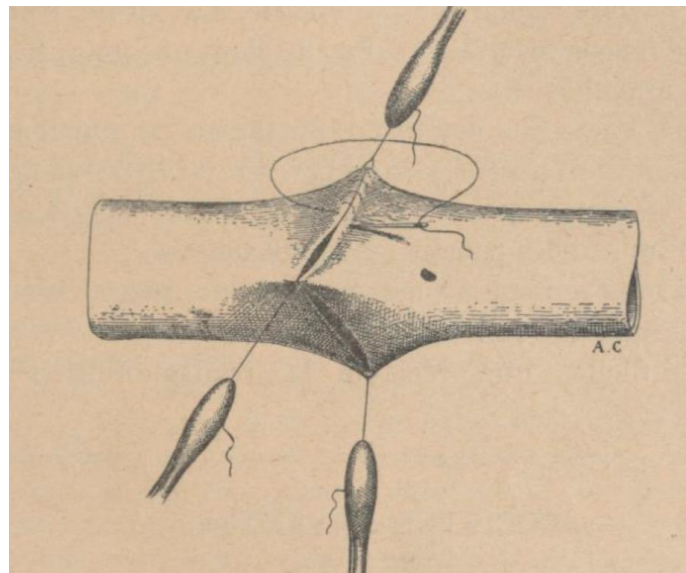


Figure 2 : Schéma d'une anastomose vasculaire (Carrel, 1902)

Le maître d'Alexis Carrel, Mathieu Jaboulay, met en application dès 1906 les connaissances qu'il a acquises grâce à son disciple. Il tente deux xénotransplantations : un rein de cochon transplanté sur une patiente d'un côté et une transplantation avec un rein de



chèvre chez une autre patiente souffrant d'insuffisance rénale terminale. Le raccord vasculaire s'effectue au pli du coude des patientes. Malheureusement, les deux patientes décéderont quelques jours plus tard d'une thrombose. Jaboulay pense à tort à ce moment-là que les décès sont dus à une intolérance des sutures métalliques, alors qu'avec les connaissances d'aujourd'hui leurs décès sont plus certainement imputables au rejet immunologique du greffon (10). D'autres tentatives de xénotransplantations ont eu lieu dans les années qui suivirent, notamment plusieurs par le chirurgien allemand Ernst Unger, qui se soldèrent toutes avec le décès des patients dans les jours qui suivirent (11).

#### b. Le rejet

En 1933, un chirurgien russe né en Ukraine du nom de Yurii Voronoy réalise avec succès la première allotransplantation rénale. Voronoy s'intéresse beaucoup à la transfusion sanguine et les réactions immunologiques qu'elle induit. D'après son étude des différents travaux d'Alexis Carrel ainsi que de ses propres expériences sur des animaux, il constate que le rejet d'allotransplantations est corrélé avec le développement d'une réaction mésenchymateuse locale mais aussi la formation d'anticorps spécifiques du greffon. Il conclut donc que le rejet d'une transplantation est d'ordre immunologique. La patiente qu'il transplante est une femme de 26 ans de groupe sanguin O, anurique suite à l'ingestion de mercure dans une tentative d'autolyse. Le donneur quant à lui est un homme de 60 ans de groupe sanguin B. Le rein est transplanté au niveau de la cuisse de la patiente, raccordé à l'artère et la veine fémorale en utilisant la méthode d'anastomose d'Alexis Carrel. La transplantation est un succès et la patiente commence à réémettre de l'urine. Néanmoins, après une brève amélioration, la patiente devient hématurique et décède. Le décès est imputé en partie à l'intoxication au mercure mais aussi à l'incompatibilité des groupes sanguins entre le donneur et le receveur (12).

Pendant la première partie du XX<sup>ème</sup> siècle, les techniques chirurgicales pour réaliser des transplantations se sont améliorées. La problématique n'étant plus de réaliser la transplantation mais de savoir plutôt pourquoi celles-ci aboutissent-elles inévitablement à un rejet. La question commence à trouver un début de réponse lors de la Seconde Guerre Mondiale. Peter Medawar, un biologiste britannique et Thomas Gibson, un chirurgien, étudient la faisabilité d'allogreffes de peau pour les soldats mutilés pendant le conflit. Pour cela, ils font des expérimentations directement sur l'Homme mais aussi sur des animaux. Ils constatent que lorsqu'on utilise un même donneur de peau plusieurs fois chez le même

receveur le phénomène de rejet est de plus en plus rapide, le patient semblant montrer une immunité contre son donneur. Medawar, partant de cette observation, est le premier à suggérer de neutraliser le système immunitaire pour éviter le phénomène de rejet. Medawar continue ses investigations après la guerre. En réalisant une allogreffe de peau entre deux veaux jumeaux, Medawar constate que cette fois-ci il n'y a aucun phénomène de rejet. Il en conclut donc qu'un individu ne peut recevoir de greffes que de lui-même (autogreffe) ou d'une personne qui lui est génétiquement identique comme pour des jumeaux monozygotes (isogreffe) (13).

En 1947, est réalisée la première allotransplantation rénale qui n'aboutit pas au décès du patient. David Hume et Charles Hufnagel, deux médecins de Boston, décident contre l'avis du directeur de l'hôpital de tenter une allotransplantation rénale chez une femme insuffisante rénale suite à une infection nosocomiale post-avortement. Elle est réalisée clandestinement au lit du malade et non dans un bloc opératoire. Le rein du donneur est transplanté au pli du coude. Suite à la transplantation, la patiente retrouve une fonction rénale et ses reins recommencent à fonctionner normalement. Quelques jours plus tard, le rein transplanté subit le phénomène de rejet, mais les reins de la patiente ayant pris le relai, le rein transplanté lui est retiré et la patiente est guérie (14). Dans cette dynamique, David Hume décide de réitérer l'expérience de l'allotransplantation rénale chez neuf patients mais cette fois-ci dans des conditions adéquates et en transplantant le rein dans la cuisse. Le résultat est mitigé, la majorité des patients n'ont pas survécu plus de quelques jours avant le rejet de la transplantation sauf pour un patient, pour qui le phénomène de rejet s'est produit qu'après 6 mois (15).

## C. L'histocompatibilité : découverte majeure pour la transplantation

Au début du XXème siècle, deux généticiens : Ernest E. Tyzer et Clarence C. Little travaillent sur la transplantation de tumeur allogénique dans le but d'étudier le mécanisme physiopathologique du développement des tumeurs. Ils effectuent des croisements entre des souris sensibles et résistantes à certaines tumeurs et concluent que la capacité de développement de ces tumeurs était d'origine génétique sans pour autant en savoir plus.

Ce n'est qu'en 1936 que Peter A. Gorer a mis en évidence pour la première fois un antigène responsable du rejet. Il étudie tout d'abord si ce qui empêche le développement des tumeurs allogéniques est lié à certains antigènes du groupe sanguin. En utilisant son propre sérum, il se rend compte que celui-ci contient des anticorps naturels anti-érythrocytes contre 3 souches de souris. Avec ces 3 souches, il immunise des lapins et obtient un anti-sérum avec lequel il distingue 3 antigènes de groupe sanguin (I, II, III) différents chez la souris. Cet anti-sérum se comporte de la même manière que le sérum de Gorer pour ce qu'il s'agit de reconnaître l'antigène II. Par la suite, il transplante une tumeur portant cet antigène II chez des souris de la souche n'ayant pas cet antigène. Ces souris rejettent la tumeur et, après étude de leur sérum, Gorer constate que ces souris ont développé des anticorps contre l'antigène II (16).

Une dizaine d'années plus tard, Gorer rencontre le généticien George D. Snell. De son côté, Snell étudie les gènes de résistance aux tumeurs qu'il nomme les « gènes H » ou encore « histocompatibilité ». Il avait déjà constaté que certaines souris porteuses d'un gène (nommé le gène Fu) ne développaient pas les tumeurs allogéniques porteuses de l'antigène II. En partageant leurs expériences, Gorer et Snell constatent que les souris porteuses de l'antigène II sur leurs érythrocytes ont une croissance de tumeur importante. Ils en concluent que la résistance au développement des tumeurs est liée aux gènes H et que le gène Fu possède un autre allèle sur le même *locus*. Ensemble, ils ont mis en évidence 3 allèles sur le *locus* H et puisque Gorer a été le premier à détecter un allèle sur le *locus* H grâce à l'antigène II, il a été nommé *Histocompatibility locus 2* ou H-2. À partir de ces conclusions, d'autres travaux engagés par Snell ont permis d'établir que le *locus* H-2 codait des antigènes d'histocompatibilité majeurs, responsables d'un rejet rapide, par rapport aux antigènes d'histocompatibilité plus faibles codés par d'autres *loci*. Le *locus* H-2 est donc devenu le *locus* majeur d'histocompatibilité chez la souris. D'autres *loci* H sont devenus des *loci* mineurs (16).

Mais la découverte des premiers antigènes HLA (*Human Leukocyte Antigen*) date de 1952 grâce aux travaux de Jean Dausset. Il étudie le sérum de plusieurs patients

polytransfusés qu'il a mis en contact avec les leucocytes de donneurs et pour lesquels il a constaté une agglutination. Pour éliminer la possibilité que ces anticorps anti-leucocytes ne soient que des auto-anticorps, il réitère l'expérience en mettant en contact les sérums des patients transfusés avec leurs propres leucocytes et, ici, ne constate pas d'agglutination. Pour rendre hommage aux trois patients pour qui les sérums n'ont pas agglutiné, il nomme l'antigène cible par leurs initiales : MAC. Cet antigène sera renommé plus tard HLA-A2 (16). Suite à la mise en évidence de l'antigène leucocytaire MAC, Jean Dausset est le premier à faire le parallèle entre sa découverte et les résultats de Georges Snell malgré une dissemblance non négligeable : dans le système H2, les antigènes sont portés par les érythrocytes et non par les leucocytes comme chez l'Être humain. Jean Dausset étudie alors une cinquantaine de sérums sur une cinquantaine d'individus en utilisant deux techniques : la leuco-agglutination et la lymphocytotoxicité. Les résultats démontrent l'existence d'au moins huit groupes qui doivent appartenir à un système unique. Ce système est nommé Hu-1 inspiré de la nomenclature de Snell ("Hu" pour homme et "1" pour le premier système) (18). Dausset devine immédiatement que l'étude des antigènes leucocytaires aura une grande importance dans le développement des transplantations cellulaires (16). Snell et lui reçoivent le prix Nobel en 1980 pour l'ensemble de leurs découvertes.

Dans la lignée de Dausset et la découverte du premier antigène HLA, d'autres étudient aussi les antigènes leucocytaires notamment Jon J. van Rood. Celui-ci, avec son équipe, travaillent sur des sérums prélevés chez des patientes enceintes qui ont développé des agglutinines leucocytaires qu'ils mettent en présence d'échantillons de leucocytes collectés chez une centaine de personnes aléatoires. Après étude des différents schémas d'agglutination, ils démontrent que certains sérums ne réagissent qu'avec un type d'antigène di-allélique qu'ils vont appeler 4a et 4b (qui deviendront dans le futur les antigènes HLA-Bw4 pour le 4a et HLA-Bw6 pour le 4b). Après une étude familiale, ils concluent que ces antigènes sont transmis de manière autosomique codominante (19). Quelques années plus tard, Rose Payne avec Julia et Walter Bodmer, en utilisant aussi des sérums de femmes multipares, mettent en évidence 3 antigènes distincts : LA1 (futur HLA-A1), LA2 (futur HLA-A2) et LA3 (futur HLA-A3) (16). Rose Payne suppose déjà à ce moment-là que ces antigènes sont codés par les mêmes gènes. Bernard Amos et Ray Shulman, entre autres, effectuent des recherches d'importance pour mettre à jour de nouveaux antigènes leucocytaires avec différentes techniques comme la leuco-agglutination évoquée plus haut mais aussi la lymphocytotoxicité et la fixation au complément pour n'en citer que quelques-unes. De par le nombre de nouveaux antigènes leucocytaires mis en évidence par des techniques différentes, Bernard Amos a créé en 1964 l'*International Histocompatibility Workshops (IHWS)* (Figure

3) pour effectuer un important travail d'harmonisation des différents travaux de chacun et ainsi trouver une nomenclature unique : « *HLA* ». Pour cela, l'ensemble des participants travaille sur le même matériel (leucocytes ou sérum) et confronte ensuite leurs résultats avec le reste des participants (16). C'est aussi lors de ces workshops qu'il est avancé que les différentes spécificités d'antigènes sont codées par des gènes très proches sur une région chromosomique particulière. Dans les années 60, les *loci* HLA-A, HLA-B et HLA-C sont mis en évidence. Il faudra attendre les années 70 et 80 pour que les molécules de classe II commencent à être évoquées.



**Figure 3 : IHWS 1977**

Au milieu des années 60, Dausset, qui après avoir mis en évidence le système Hu-1, veut vérifier que celui-ci détermine le devenir des transplants comme le système H2 chez la souris. Avec le chirurgien Felix Rapaport, ils pratiquent plusieurs greffes de peau sur des patients volontaires. Les résultats montrent que la survie de la greffe est plus importante s'il y a une compatibilité entre le receveur et le donneur en ce qui concerne le système Hu-1. Jean Dausset montre qu'il y a corrélation entre la compatibilité du système Hu-1 et la survie des greffes de peau et donc que ces antigènes leucocytaires sont aussi des antigènes tissulaires (18). D'autres équipes, comme celle de Van Rood, Ceppellini et Amos arrivent aux mêmes conclusions. Ils montrent que les premières greffes cutanées entre frères ou sœurs HLA géno-identiques ont une durée de survie significativement plus longue que les greffes cutanées entre frères et sœurs différents pour un ou plusieurs haplotypes HLA (16).

En parallèle, des études effectuées sur les différents antigènes tissulaires présents sur les leucocytes humains ont permis enfin d'établir une corrélation entre la durée de survie des transplantations rénales et la compatibilité des antigènes leucocytaires du receveur et du

donneur. Le postulat est le suivant : si les antigènes leucocytaires sont des déterminants d'histocompatibilité, alors les patients transplantés rénaux pour lesquels on a constaté une longue survie post-transplantation doivent avoir des antigènes leucocytaires bien appariés. Terasaki et son équipe ont donc réalisé une étude pour confirmer cette hypothèse, ils ont sélectionné une trentaine de patients qui ont survécu plus de 2 ans suite à une transplantation rénale pour lesquels ils ont examiné la compatibilité, grâce à des techniques de lymphocytotoxicité, des différents groupes antigéniques mis en évidence à l'époque, entre les donneurs et leurs receveurs respectifs (20). Malgré les connaissances encore très parcellaires de cette période, cette étude permet néanmoins de déterminer le potentiel d'immunisation de ces différents groupes d'antigènes déjà mis en évidence (plusieurs antigènes du groupe HLA-A et HLA-B) grâce à la survie clinique des patients. En effet, pour la grande majorité des patients ayant une longue survie post-transplantation, il est constaté une ou plusieurs incompatibilités antigéniques ce qui laisse penser que ces antigènes ne sont pas extrêmement puissants sinon un rejet immunologique beaucoup plus précoce aurait été inévitable. Cette conclusion est toutefois nuancée par l'utilisation d'immunosuppresseurs chez les patients ainsi que l'utilisation récurrente de la transfusion sanguine qui peut induire un chimérisme et entraîner des erreurs lors du typage des antigènes leucocytaires. Toutefois, il est noté un taux de survie plus élevé chez les patients transplantés avec un donneur apparenté plutôt que non-apparenté ainsi que chez les patients ne possédant pas de mésappariements sur les quelques antigènes leucocytaires étudiés. Cette étude, et d'autres effectuées précédemment par Terasaki et son équipe, permettent d'affirmer que les antigènes leucocytaires sont des déterminants responsables, au moins en partie, de l'histocompatibilité.

Suite à cette étude, et les résultats encourageants quant à la survie du greffon et à l'appariement des antigènes leucocytaires, une autre étude conduite par la même équipe est réalisée en 1966 (21). Le but de cette nouvelle étude est d'observer la survie chez les patients transplantés rénaux pour qui l'appariement des antigènes leucocytaires a été étudié avant la transplantation rénale afin d'éviter le maximum de mésappariements possibles. Une comparaison a été faite ensuite avec un groupe de patients pour lesquels la répartition des transplants rénaux est réalisée de manière aléatoire. Pour cela, Terasaki et son équipe ont opposé la durée de survie des patients appariés avec leur donneur et ceux du groupe avec la répartition aléatoire. Un allongement de la survie des patients appariés est mis en évidence de manière significative. Il est même noté un rapprochement de la courbe de survie entre les patients appariés non-apparentés et ceux apparentés (résultats non significatifs malgré tout à cause de la cohorte trop faible). Il a été de plus constaté que les lésions vasculaires provoquées par un rejet sévère sont moins fréquentes dans le groupe des patients appariés

avec leurs donneurs que dans le groupe témoin non-appariés sans toutefois pouvoir affirmer avec certitude que cela était dû à la procédure d'appariement ou bien à un ou plusieurs autres facteurs non reconnus. Néanmoins, ces résultats prometteurs ont ouvert la voie à une répartition des organes plus réfléchie avec une étude en amont de la compatibilité entre les patients en attente de transplantation et les donneurs.

En 1967, après étude des patients greffés par Jean Hamburger et Jean Dausset, les conclusions de Terasaki se confirment. Les résultats montrent une corrélation entre le nombre de mésappariements et la survie des patients transplantés rénaux. Dans la pratique, les transplantations rénales sont, pour la grande majorité des cas, réalisées avec des donneurs non-apparentés. Dausset en vient à la conclusion qu'il faut créer un système d'allocation des organes pour optimiser la survie des patients greffés en tenant compte de la compatibilité entre donneurs et receveurs (18). En 1969, il crée France-Transplant afin de développer et coordonner l'activité de transplantation d'organes en France. En 1994, l'Établissement Français des Greffes est créé et reprend le rôle de France-Transplant dans l'organisation sanitaire, réglementaire et fonctionnelle de l'activité de prélèvement et de transplantations d'organes, de tissus et de cellules en France. Avec la loi de bioéthique du 6 août 2004, l'Agence de la Biomédecine a repris les missions de cet établissement en élargissant ses domaines de compétences.

### III. Appariement antigénique dans la transplantation

#### A. Système HLA

##### a. Présentation du système HLA

Le rôle des molécules HLA est de présenter aux lymphocytes T l'ensemble des antigènes peptidiques qui conditionneront derrière la réponse immunitaire adaptative. Son rôle est donc la reconnaissance du soi et du non soi. Le système HLA est aussi, avec le système ABO, le déterminant principal de l'histocompatibilité. Sa compréhension permet de prévenir le rejet immunologique lors d'une transplantation.

Le système HLA appartient au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et s'étend sur 3,6 Mb sur le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3). Sa carte génétique révèle plus de 250 gènes dont 60% seraient exprimés (22). C'est un système polygénique, et 11 *loci* sont étudiés en transplantation d'organe. Ces *loci* sont subdivisés en deux classes :

- Classe I : HLA-A, HLA-B, HLA-C
- Classe II : HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DPA1, ainsi que les molécules surnuméraires HLA-DRB3, HLA-DRB4 et HLA-DRB5

L'ensemble de la classe I s'étend sur 2 Mb et l'ensemble de la classe II s'étend sur 1 Mb (Figure 4).

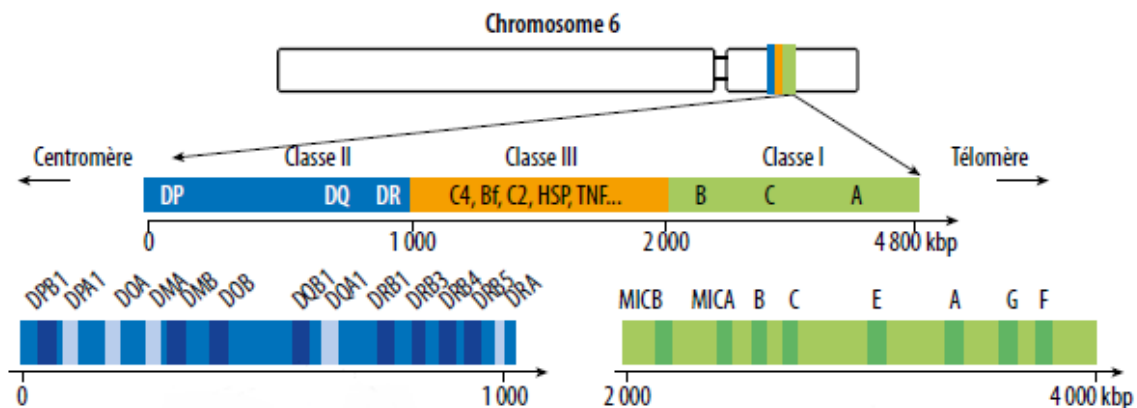
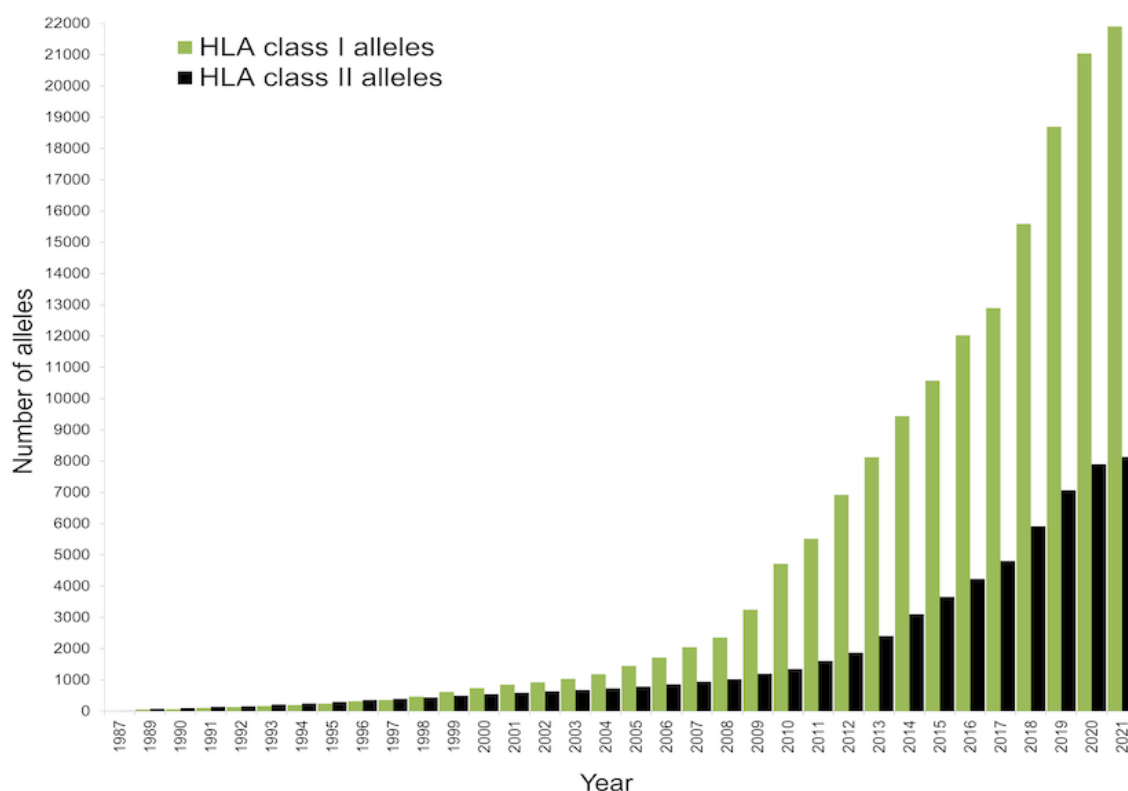


Figure 4 : Localisation et organisation chromosomique des gènes HLA (Delbos et al, 2018)

Le système HLA est le système le plus polymorphe du génome humain. Le terme de « polymorphisme » désigne les différences entre deux individus d'une même espèce, chez qui un phénotype est présent sous au moins deux formes, ou allèles, avec une fréquence supérieure ou égale à 1%. Le système HLA peut être assimilé comme la « carte d'identité immunitaire » de chaque individu. Suite à l'évolution perpétuelle des techniques de biologie



moléculaire, le nombre de nouveaux allèles identifiés augmentent considérablement chaque année. A ce jour, plus de 30000 allèles sont répertoriés avec plus de 22000 allèles en classe I et plus de 8000 en classe II (Figure 5).

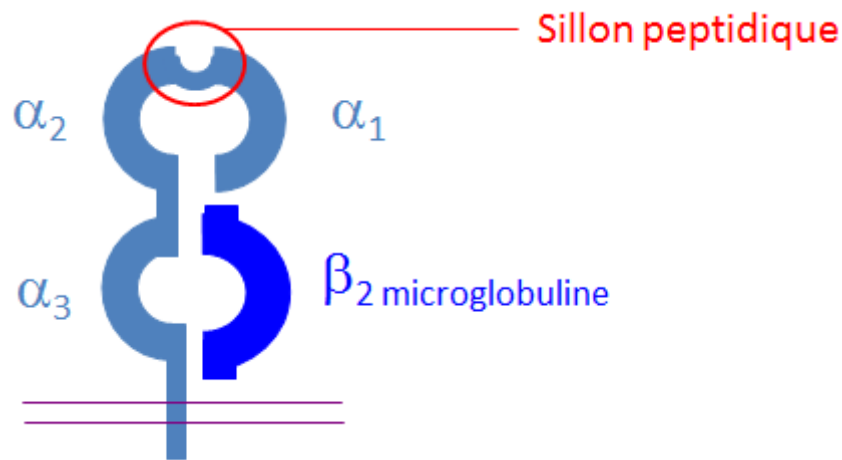


**Figure 5 : Nombre d'allèles HLA découverts en fonction de la classe et de l'année** (<https://hla.alleles.org/>)

Chaque individu possède deux copies de chaque gène HLA, une provenant de sa mère et une de son père. La transmission est haplotypique, c'est-à-dire qu'elle se fait par bloc. Si les deux parents ont transmis un allèle identique, l'individu est alors homozygote pour ce gène. Si les allèles transmis sont différents, l'individu est dit hétérozygote pour ce gène. L'expression des gènes HLA est de caractère codominant, c'est-à-dire que les deux molécules codées par les deux allèles sont exprimées à la surface des cellules (23).

Les gènes HLA de classe I HLA-A, HLA-B et HLA-C, sont composés de 8 exons séparés par 7 introns. Ces gènes codent une chaîne lourde  $\alpha$  transmembranaire de 44 kDa associée de manière non covalente à une chaîne de  $\beta$ 2-microglobuline invariante (protéine de 12 kDa monomorphe, codée par un gène du chromosome 15). La chaîne lourde  $\alpha$  est organisée en 3 domaines extracellulaires ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3) reliés à la membrane plasmique par un domaine transmembranaire hydrophobe suivi d'un court domaine intracellulaire. Les domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 forment une gouttière bordée par 2 hélices  $\alpha$  et dont le plancher est constitué de feuillet  $\beta$  où vient se loger, après apprêtement, le fragment d'antigène du soi ou du non-soi : c'est le sillon peptidique (Figure 6). Son polymorphisme est dû à l'exon 2 et

l'exon 3 codant pour les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ . Ces molécules HLA de classe I sont exprimées sur toutes les cellules nucléées de notre organisme ainsi que les plaquettes. Elles servent à présenter des peptides endogènes aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (24).



**Figure 6 : Molécule HLA de classe I**

Les molécules HLA de classe II classiques sont constituées d'un hétérodimère de chaîne lourde  $\alpha$  de 29 kDa codée par un gène A (DRA1, DQA1 et DPA1) et d'une chaîne lourde  $\beta$  de 34 kDa codée par un gène B (DRB1, DQB1 et DPB1). Chaque chaîne est composée de 2 domaines extracellulaires ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ou  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ). Les domaines  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  extracellulaires forment une gouttière formée d'un plancher constitué de feuillet  $\beta$  plissés bordé par deux hélices  $\alpha$  définissant le sillon peptidique (Figure 7). Son polymorphisme est dû à l'exon 2 qui code pour le domaine  $\beta_1$ . Les gènes HLA de classe II comprennent 5 exons (chaîne  $\alpha$ ) ou 6 (chaîne  $\beta$ ). Les molécules de classe II sont, quant à elles, présentes seulement sur les cellules présentatrices de l'antigène, c'est-à-dire les lymphocytes B, les macrophages, les cellules dendritiques, et les cellules de Langherans. Elles présentent des peptides antigéniques exogènes aux lymphocytes CD4 + auxiliaires (24).

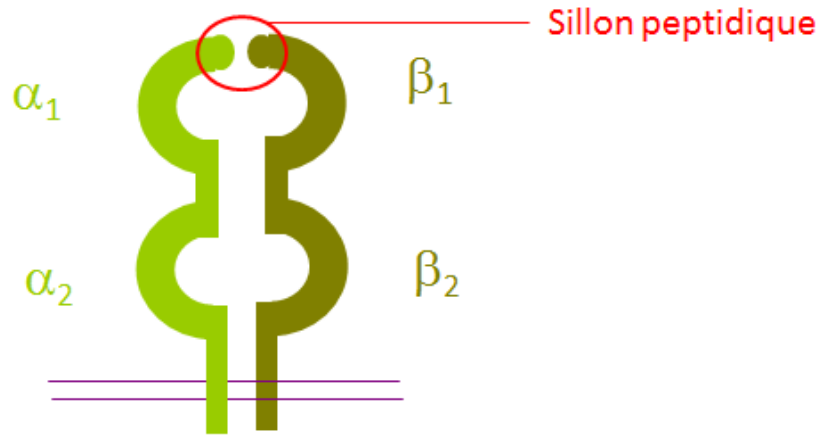


Figure 7 : Molécule HLA de classe II

#### b. Nomenclature HLA

Suite à la découverte des antigènes HLA par de nombreuses équipes à travers le monde, les Workshops ont été créés, entre autres, pour harmoniser la nomenclature des antigènes HLA. En 1968, est instituée une base internationale commune appelée IMGT (*International ImMunoGeneTics Information System*). Cette base de données est enrichie constamment et tient à jour l'évolution des nomenclatures HLA en répertoriant tous les nouveaux allèles identifiés et mis en évidence grâce aux techniques de biologie moléculaire.

##### i. Nomenclature en sérologie

La première technique pour décrire un antigène a été la leucoagglutination sur lame (17). C'est celle utilisée par Dausset dans les années 50 qui lui a permis de mettre en évidence l'antigène MAC.

Cette technique a été très rapidement remplacée par le test de lyse des lymphocytes ou la lymphocytotoxicité dépendante du complément (LCT) élaboré par Terasaki qui l'a miniaturisé et l'a rendu utilisable dans tous les laboratoires grâce à l'utilisation d'un micro-volume de sérum et de cellules. Réalisés en plaques de microtitration (plaques de Terasaki), les lymphocytes du patient ou du donneur (lymphocytes T pour les antigènes de classe I, lymphocytes B pour les antigènes de classe II) sont isolés partir d'un échantillon de sang, de rate ou de ganglion et sont mis en contact avec une batterie d'anticorps monoclonaux ou d'alloanticorps humains dont la cible est connue et du complément de lapin. En cas de formation du complexe antigène – anticorps, le complément est activé, ce qui déclenche la

lyse cellulaire. En fin de réaction, un colorant est rajouté afin de caractériser la viabilité de la cellule : rouge si la cellule est lysée, verte si la cellule est vivante (25) (Figure 8 et 9).

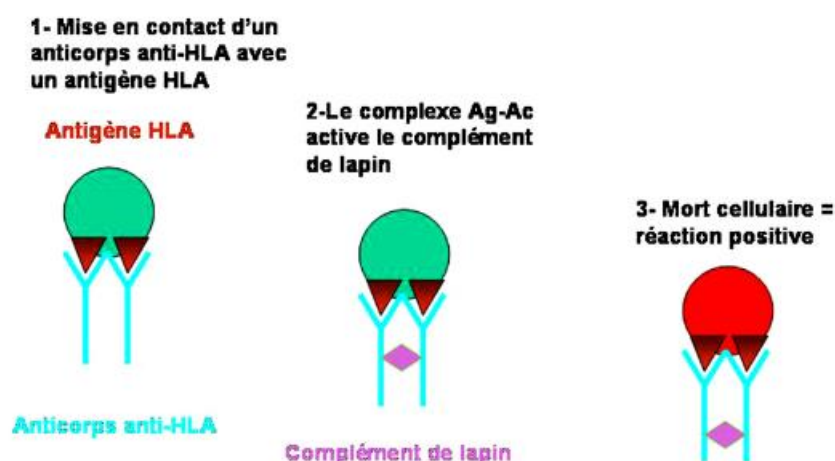


Figure 8 : Réaction positive en LCT (Moalic, 2008)

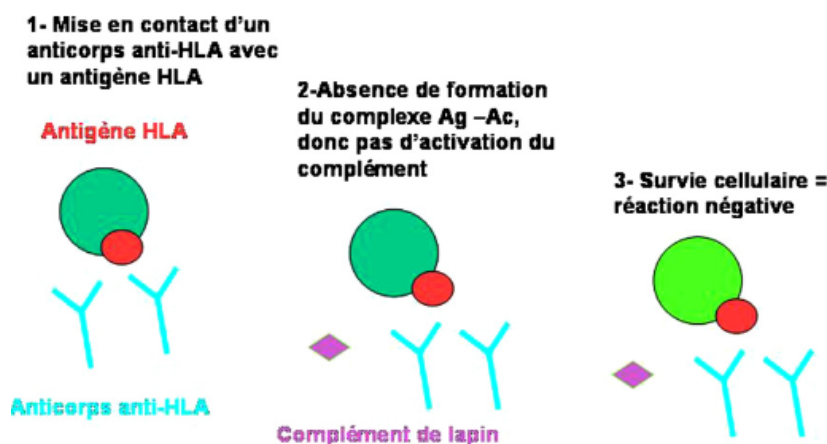


Figure 9 : Réaction négative en LCT (Moalic, 2008)

Dans les laboratoires HLA, le typage HLA par LCT est utilisé pour contrôler le matériel (ganglions, rate) avant la réalisation d'un *crossmatch* ou à titre exceptionnel pour réaliser le typage HLA d'un potentiel donneur en état de mort encéphalique. Il est utile pour confirmer la présence d'un allèle nul non exprimé à la surface cellulaire ou bien lever des ambiguïtés résiduelles avec des allèles nuls en biologie moléculaire. Néanmoins, cette technique possède plusieurs inconvénients : elle n'est pas automatisée, elle nécessite une bonne viabilité cellulaire, les anticorps utilisés peuvent présenter des réactivités croisées avec d'autres antigènes que l'antigène cible (surtout en cas d'homozygotie), et elle discrimine mal les antigènes de classe II (26).

La nomenclature HLA a donc historiquement démarré avec l'identification des antigènes avec la technique de sérologie suite à l'analyse de couples cellules/sérums, qui a

abouti sur la classification antigénique. La nomenclature sérologique se présente de la façon suivante : le *locus* (HLA-A, -B, -C) est associé à un nombre correspondant à l'identification de l'antigène selon l'ordre de sa découverte (Figure 10).



Figure 10 : Exemple de la nomenclature en sérologie de l'antigène A2

## ii. Nomenclature en biologie moléculaire

La nomenclature HLA a évolué pour exprimer la diversité génétique, rendue accessible par l'amélioration des techniques de biologie moléculaire.

La nomenclature en biologie moléculaire est plus complexe et se présente de la façon suivante (Figure 11) :

- le préfixe « HLA » suivi du *locus* concerné (-A, -B, etc) ;
- l'astérisque indique que le typage obtenu a été réalisé à partir d'ADN ;
- le premier champ de 2 chiffres (nomenclature 2 digits) correspond à un groupe d'allèles codant pour des molécules HLA ayant une conformation similaire et généralement reconnues par un même anticorps ;
- le second champ (nomenclature 4 digits) définit chacun des allèles codant pour une séquence protéique différente mais appartenant au même groupe générique. Il est ordonné selon la date de détermination. Il cause une modification de la séquence protéique ;
- le troisième champ (nomenclature 6 digits) correspond à ensemble d'allèles codant pour une même protéine, ce qui signifie qu'ils ont des exons de séquence ADN identiques ou bien portant des mutations synonymes (pas de modification de la protéine) ;
- le quatrième champ (nomenclature 8 digits) tient compte des mutations dans les régions non codantes et introniques.

La dénomination d'un allèle peut être complétée par un suffixe si la protéine a une expression particulière (comme « N » pour expression nulle).

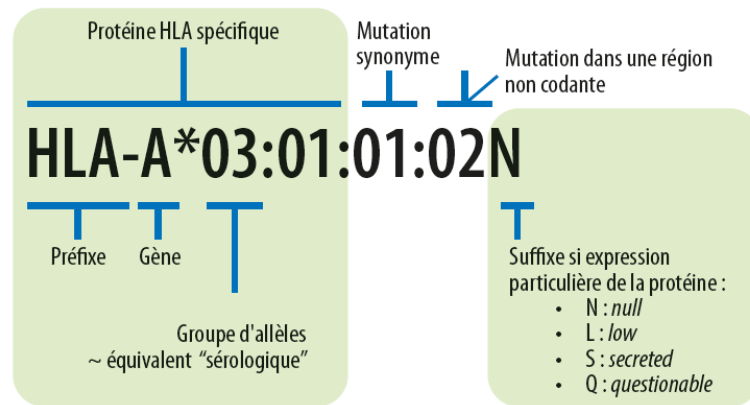


Figure 11 : Exemple de la nomenclature en biologie moléculaire de l'antigène A3 (Elsermans et *al*, 2018 d'après Marsh et *al*, 2010)

En biologie moléculaire, on distingue 3 types de résolution de typage (Tableau 1) :

- La résolution générique ou basse résolution, le typage est rendu à une résolution de 2 digits ;
- La résolution allélique ou haute résolution, le typage est rendu à une résolution de 4, 6 ou 8 digits :
  - Sans ambiguïté avec des allèles dont le polymorphisme est situé dans l'exon 2 (pour la classe II) ou 2 et 3 (pour la classe I) ;
  - Sans ambiguïté avec des allèles nuls quelle que soit la localisation du polymorphisme ;
  - Avec des ambiguïtés correspondant à des sous-groupes d'allèles dont le polymorphisme est situé en dehors de l'exon 2 (pour la classe II) ou 2 et 3 (pour la classe I). Ces allèles présentent des séquences nucléotidiques identiques au niveau de l'exon 2 (pour la classe II) ou 2 et 3 (pour la classe I).
- La résolution intermédiaire ou moyenne résolution, le typage va comporter des ambiguïtés correspondant à des sous-groupes d'allèles dont le polymorphisme est situé dans ou en dehors de l'exon 2 (pour la classe II) ou 2 et 3 (pour la classe I). Ces ambiguïtés concernent :
  - soit des allèles rares mis en évidence une fois mais non confirmés ou rarement confirmés. Pour ces allèles rares, les laboratoires HLA ne disposent pas systématiquement des techniques permettant la levée des ambiguïtés ;
  - soit des allèles fréquents : ces ambiguïtés doivent être obligatoirement résolues si le résultat de typage doit être rendu à un niveau allélique.

Technique	LCT	SSP et variantes	SSO Luminex®	SSO micropuces	SBT Sanger bi-allélique	SBT Sanger mono-allélique	NGS
Résolution	Sérologique	Basse/ Intermédiaire/ haute	Intermédiaire/ haute	Basse/ Intermédiaire	Haute	Haute	Très haute/allélique
Nombre d'échantillons	1 à 1	1 à 1	Séries	Séries	Petites séries	Petites séries	Séries
Délai de rendu	Rapide	Rapide	Moyen	Rapide	Lent	Moyen/lent	Moyen/lent
Coût	+	+++	++	++	+++	++++	++(+)
Avantage majeur	Détection des allèles nuls	Rapide	Bon débit et utilisable "au locus"	Bon débit et utilisable "au locus"	Description de nouveaux allèles	Description de nouveaux allèles	Débit et résolution, description de nouveaux allèles
Utilisations les plus répandues	De moins en moins employé	Donneur décédé (en urgence)	Receveur et donneur vivant	Receveur et donneur vivant	De moins en moins employé	De moins en moins employé	Receveur et donneur vivant

SSP : Sequence Specific Primers ; SSO : Sequence Specific Oligonucleotides ; NGS : Next Generation Sequencing ; SBT : Sequence Based Typing ; LCT : lymphocytotoxicité.

**Tableau 1 : Comparaison des différentes techniques de typage HLA (Elsermans et al, 2018)**

## B. Mécanismes de rejet

Le rejet est la principale cause d'échec en transplantation d'organe. Suite à une meilleure compréhension des mécanismes du rejet et à la mise en place de traitements immunosuppresseurs, la balance bénéfice-risque de la transplantation s'est grandement améliorée. A titre d'exemple, la transplantation rénale est le traitement de première intention de l'insuffisance rénale chronique terminale.

### a. Rejet hyper-aigu

Le rejet hyper-aigu intervient quelques minutes après la transplantation. Il est causé par des d'anticorps anti-donneurs, nommés DSA (*Donor Specific Antibodies*), et est ainsi historiquement appelé rejet humoral. Ces anticorps peuvent provenir d'évènements immunisants antérieurs à la transplantation comme une transplantation antérieure, une grossesse ou encore une transfusion sanguine. Ces anticorps peuvent être dirigés contre les antigènes HLA du donneur ou contre les antigènes du système ABO.

Les anticorps préformés reconnaissent et se fixent sur les antigènes du donneur, présents sur l'endothélium. La destruction de l'endothélium passe par plusieurs voies (27) :

- La formation d'un complexe d'attaque membranaire, médiée par le complément
- Le recrutement de cellules inflammatoires

- La phagocytose, par l'intermédiaire du complément déposé sur les cellules endothéliales

L'ensemble de ces phénomènes entraîne des lésions endothéliales qui exposent la membrane basale et le muscle lisse de l'organe. Ces expositions vont permettre, entre autres, d'activer des facteurs pro-coagulants comme le facteur Von Willebrand ce qui provoque, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. Cette série de réactions va donc engendrer une thrombose intravasculaire qui va aboutir à la perte du greffon.

#### b. Rejet aigu

Le rejet aigu survient le plus souvent dans les 3 premiers mois qui suivent la transplantation ou après la minimisation ou l'arrêt du traitement immunosuppresseur. Le diagnostic repose sur l'analyse histologique du greffon. Les lésions élémentaires permettent ainsi d'identifier les rejets cellulaires et médiés par anticorps, qui peuvent être présents simultanément (rejets mixtes). La classification de Banff, régulièrement révisée, permet de standardiser le diagnostic et la gravité des rejets. Les lésions aiguës peuvent être asymptomatiques (rejet infraclinique) ou causer une dysfonction de l'organe. Elles font le lit des lésions chroniques, moins accessibles au traitement.

##### *i. Rejet aigu cellulaire*

Le rejet aigu cellulaire nécessite une immunisation préalable. Il s'installe en quelques jours et survient généralement dans les 3 mois suivant la transplantation. Il survient, à l'heure actuelle, dans moins de 15% des transplantations (28). De par l'environnement pro-inflammatoire propre à l'acte de transplantation (procédure chirurgicale, ischémie froide, etc.), les cellules dendritiques du donneur vont être acheminées dans les zones lymphocytaires T des ganglions lymphatiques. Elles vont ensuite augmenter l'expression des molécules HLA et activer les lymphocytes T. Cette reconnaissance directe des antigènes est responsable d'environ 90% des rejets aigus (29).

Une fois que les lymphocytes T sont activés ils prolifèrent puis migrent et infiltrent le parenchyme du greffon entretenant ainsi l'inflammation qui permet le recrutement de davantage de lymphocytes T ainsi que d'autres cellules effectrices comme les lymphocytes B, les cellules Natural Killer, etc. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> exercent leur activité cytotoxique en



induisant l'apoptose des cellules du transplant, ce qui à terme provoque, entre autres, une tubulite et une inflammation interstitielle (30).

## *ii. Rejet aigu humoral*

Les lymphocytes B naïfs, se trouvant dans les organes lymphoïdes secondaires, rencontrent l'antigène HLA soit sous forme libre, soit présenté par les cellules dendritiques. Cette rencontre entraîne l'activation et la prolifération du lymphocyte B. Certains de ces clones vont se transformer en plasmocytes qui vont synthétiser des anticorps de type IgM contre l'antigène HLA. Ceci va constituer la réponse humorale primaire (31).

Certains lymphocytes B vont être activés par interaction avec les lymphocytes T, eux-mêmes activés par les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène HLA. Le lymphocyte B va internaliser son BCR (*B-Cell Receptor*) qui a capturé l'antigène puis l'exposer par l'intermédiaire des molécules HLA de classe II à la surface du lymphocyte B. Le lymphocyte T folliculaire auxiliaire reconnaît l'antigène et va se lier avec le lymphocyte B. La liaison s'effectue avec le CD80/CD86 du lymphocyte B et le CD28 du lymphocyte T folliculaire auxiliaire. Le ligand du CD40 du lymphocyte T folliculaire auxiliaire est reconnu par le CD40 du lymphocyte B ce qui aboutit à l'activation du lymphocyte B. Ce phénomène s'appelle la coopération B et T (29).

Après son activation, le lymphocyte B va subir au stade de centroblaste des hypermutations isotypiques au niveau des gènes codant les régions variables des immunoglobulines qui ont pour conséquence d'augmenter l'affinité de l'immunoglobuline sécrétée pour l'antigène. Il devient un centrocyte (29).

Le centrocyte, après la sélection positive, va subir une commutation isotypique ce qui va permettre au plasmocyte de sécréter des IgG, plus affins pour l'antigène HLA que les IgM. Les IgG et IgM dirigés contre les molécules HLA du transplant vont former ce que l'on appelle les DSA de novo. Au niveau du transplant, ils vont entraîner des nécroses artérielles ou capillaires avec infiltrations de monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles ainsi que des anomalies immunohistologiques comme les dépôts de C4d à la biopsie (32).

### c. Rejet chronique

Le rejet chronique survient plusieurs mois, voire plusieurs années après la transplantation. Il correspond à une réaction immunitaire à bas bruit incluant des réactions humorales, cellulaires et une inflammation chronique qui entraîne une dégradation lente et progressive de l'organe, notamment caractérisée par des atteintes vasculaires et un phénomène de fibrose (33). Le traitement immunosuppresseur retarde ce rejet mais il est à terme inéluctable.

Le rejet chronique humoral est progressif (34) et se caractérise par 4 stades successifs retrouvés au préalable dans le rejet aigu (35) :

- DSA circulants
- Dépôt de C4d à la biopsie
- Altération du transplant
- Dysfonction du transplant

La mise en évidence de DSA permet d'anticiper et de prévenir la dysfonction prochaine du greffon.

## C. Attribution des organes : transplantation rénale

### a. Score REIN

L'attribution des organes s'effectue grâce à des règles régies par l'Agence de Biomédecine. Ces règles sont nécessaires pour permettre une répartition équitable des organes chez les patients en attente de transplantation. Elles diffèrent en fonction des organes. En France, la majorité des patients en attente de transplantation sont des patients en attente de greffe rénale. Certains d'entre eux possèdent un statut prioritaire de par notamment leur hyperimmunisation mais ne représente qu'environ un quart de ces patients (36).

Hors ces patients prioritaires, l'importance de la population en attente de transplantation nécessite de formaliser un score : le score REIN pour permettre l'accès à la transplantation rénale avec un donneur en état de mort encéphalique. Les reins d'un donneur sont répartis à l'échelon local pour l'un et à l'échelon national pour l'autre (36).

Ces critères prennent en compte la durée d'attente sur liste, la durée de dialyse ainsi que la difficulté d'accès à la transplantation pour des raisons d'équité. L'appariement HLA donneur – receveur est pris en compte afin de prévenir le risque d'immunisation conduisant au rejet. Enfin, l'appariement d'âge est intégré afin d'attribuer les greffons ayant une durée potentielle de fonctionnement proportionnée à l'espérance de vie du receveur ainsi que la distance pour le receveur du centre de transplantation. Ces critères sont adaptés en fonction de l'âge du receveur. Plus celui-ci sera jeune, plus le critère de l'appariement sera privilégié. Chez les personnes âgées, le critère de la distance au centre de transplantation est, dans ce cas, privilégié.

### b. Anticorps anti-HLA

#### i. *Identifications anticorps anti-HLA*

L'immunisation anti-HLA est un point essentiel à prendre en compte pour une transplantation rénale. La recherche et l'identification des anticorps anti-HLA est obligatoire lors de l'inscription du patient sur la liste d'attente de transplantation dans la base de données Cristal de l'Agence de Biomédecine. En effet, la présence d'un DSA préformé augmente le risque de rejet.

La technologie Luminex est actuellement la technique la plus utilisée en France pour la recherche et l'identification des anticorps anti-HLA. Cette technique repose sur une technique

de multiplexage de billes de polystyrène avec une technique de cytométrie en flux (37). Ces billes sont recouvertes d'une ou plusieurs spécificités d'antigènes HLA. Elles sont mises en contact avec le sérum du patient et, s'il y a fixation de l'anticorps avec l'antigène sur la bille, la réactivité est révélée par l'utilisation d'un conjugué couplé à un marqueur. La fluorescence est ensuite mesurée et un chiffre d'intensité de fluorescence est obtenu (MFI) (Figure 12).

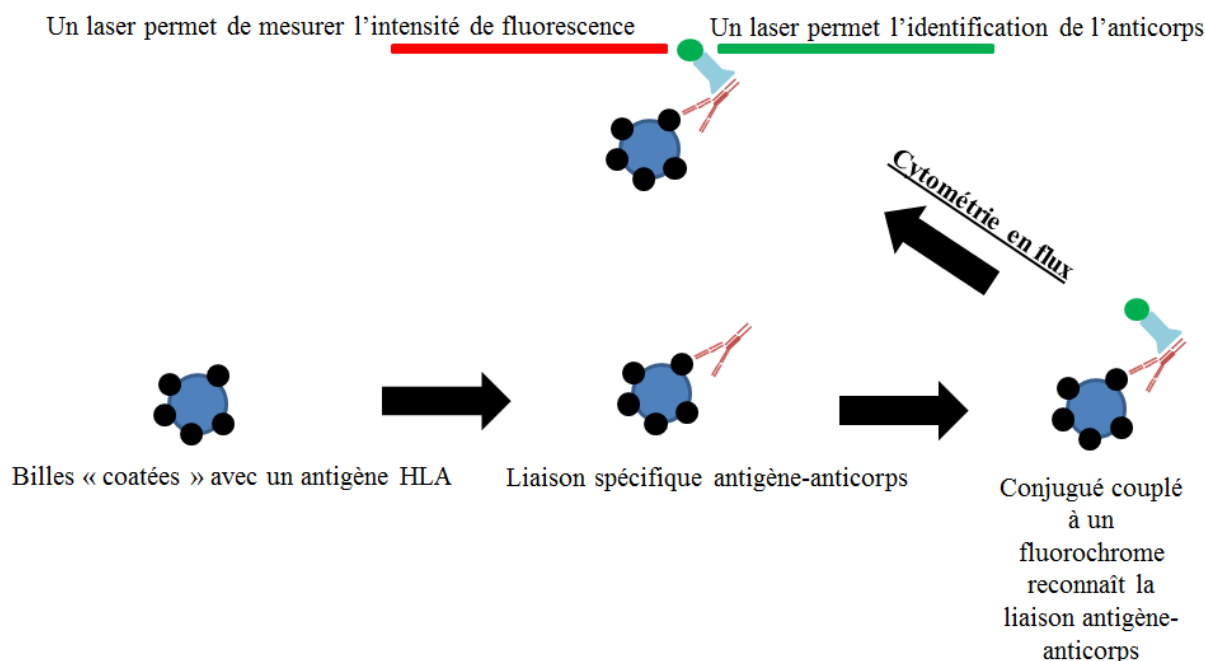


Figure 12 : Principe de la technique *Single Antigen Luminex®*

Cette technique permet le dépistage des anticorps anti-HLA avec des billes recouvertes de plusieurs antigènes HLA différents. Elle permet aussi l'identification de la cible de l'anticorps grâce à des billes recouvertes d'un seul type d'antigène HLA (*Single Antigen bead*). Au laboratoire de Tours, une spécificité d'anticorps avec une MFI  $\geq 1000$  est considérée comme positive ; entre 500 et 1000, elle est considérée comme étant en zone grise ;  $< 500$ , elle est considérée comme négative.

Les spécificités des anticorps anti-HLA identifiées par technique Luminex sont renseignées dans la base de données Cristal pour chacun des patients. La technique *Single Antigen Luminex®* est aujourd'hui utilisée, car elle est beaucoup plus sensible que la recherche d'identification des anticorps par LCT ou ELISA, historiquement utilisées. Cette meilleure sensibilité en fait un outil de choix dans l'identification de certaines spécificités non détectées par les autres techniques mais aussi dans le suivi des protocoles de désensibilisation (37). Néanmoins, cette technique d'identification présente certaines limites. En effet, cette technique peut engendrer des spécificités d'anticorps faussement positives dans le cas d'administration chez le patient de certains médicaments comme les immunoglobulines polyvalentes ou bien le sérum anti-lymphocytaire (38). De plus, le test *Single Antigen* peut

aussi mettre en évidence des anticorps dirigés contre des antigènes dénaturés, en particulier sur la classe I, qui sont sans conséquence sur la survie du greffon mais qui ne peuvent être différenciés des anticorps dirigés contre les antigènes natifs (39). Elle présente aussi une très grande sensibilité, ce qui signifie que des DSA retrouvés en *crossmatch* virtuel ne conduisent pas forcément à un rejet hyperaigu ou aigu du greffon. D'autres interférences peuvent conduire, quant à elles, à la sous-estimation des anticorps anti-HLA. L'effet « prozone » est la principale interférence négative. Elle est prévenue par un pré-traitement du sérum à l'EDTA de manière quasi-systématique (39). Les autres méthodes utilisées pour prévenir l'effet prozone sont le pré-traitement au DTT, ou par la chaleur (56°C pendant 30 minutes) mais aussi par dilution qui est la méthode historique. L'utilisation d'eculizumab peut aussi interférer et sous-estimer les MFI des spécificités d'anticorps mises en évidence (38).

## ii. *Crossmatch*

Lors de la transplantation, est toujours réalisé le « *crossmatch* » entre le patient receveur et son donneur. L'objectif est d'identifier la présence ou non de DSA préformés. Pour cela, il existe plusieurs méthodes (Tableau 2).

### *Crossmatch* par LCT

La méthode de référence est le *crossmatch* par LCT, le principe est le même que la technique LCT utilisée pour le typage. Le sérum du patient receveur est mis en contact avec les lymphocytes du donneur. La positivité ou non du *crossmatch* est déterminée grâce à un score international : si moins de 10% des cellules sont lysées, le *crossmatch* est défini comme négatif (score = 1), si 80% des cellules sont lysées le *crossmatch* est considéré comme positif (score = 8) (40).

### *Crossmatch* virtuel

Le *crossmatch* virtuel est réalisé avant la réalisation du *crossmatch* par LCT. Le principe consiste à confronter le typage du donneur avec les spécificités mises en évidence dans les sérums historiques du patient en attente de transplant. Il a pour but de prédire le résultat du *crossmatch* en LCT en fonction de la présence ou non d'anticorps anti-HLA détectés par technique Luminex dirigés contre le greffon proposé. Il est réalisé dans le cadre des transplantations avec donneur vivant ou donneurs décédés.

Les objectifs du *crossmatch* virtuel sont : de transmettre le greffon sur le site de transplantation en même temps que le matériel biologique nécessaire à la réalisation du *crossmatch* cellulaire (ganglions, rate) en cas de proposition pour un receveur hyperimmunisé bénéficiant de la priorité nationale « hyperimmunisation » afin de ne pas augmenter le délai d'ischémie froide ; de diminuer le temps d'ischémie pour les transplants thoraciques, de pancréas ou donneurs limites (donneur décédé par arrêt cardiaque, donneurs âgés.) et d'évaluer le risque immunologique en cas de transplantation donneur vivant afin de déterminer s'il est nécessaire ou non de poursuivre l'exploration biologique (*crossmatches* par LCT).

La transplantation peut être débutée sans attendre le résultat du *crossmatch* réel sauf pour les patients hyperimmunisés bénéficiant de la priorité nationale « hyperimmunisation ». Les risques d'une transplantation d'organe réalisée sur les bases des résultats du *crossmatch* virtuel sont d'ignorer un événement immunisant survenu depuis la dernière recherche d'anticorps. Les limites au rendu du résultat du *crossmatch* virtuel sont les suivantes :

- Le suivi immunologique d'un événement immunisant incomplet ou non connu ;
- L'absence de typage des *loci* correspondant aux anticorps identifiés chez le patient (ex: HLA-C, HLA-DPB1, -DRB3/4/5, etc) ;
- Les limites techniques du *Single Antigen* Luminex : effet prozone ;
- La présence d'anticorps anti-allèle (typage du donneur à compléter) ;
- La présence d'anticorps dirigés contre des antigènes non présents sur les billes du kit.

### Crossmatch par cytométrie en flux

D'autres techniques existent aussi comme le *crossmatch* par cytométrie en flux (CMF), principalement pour la transplantation à partir de donneurs vivants. Le *crossmatch* par CMF, comme la LCT, cherche à mettre en évidence les anticorps dirigés contre les lymphocytes T et les lymphocytes B. Les cellules du donneur sont incubées avec le sérum du receveur. Si le complexe antigène – anticorps est formé, il est révélé par un anticorps anti-IgG humaine couplé à un fluorochrome. Les lymphocytes sont révélés par les anticorps anti-CD3 pour les lymphocytes T et anti-CD19 pour les lymphocytes B. Cette technique est plus sensible que le *crossmatch* par LCT et détecte des anticorps avec des concentrations plus faibles que celui-ci. Le *crossmatch* par CMF est la technique de référence pour les transplantations donneurs vivants (40).

MFI du DSA anti-HLA	Méthode de <i>crossmatch</i> *			Risque de rejet humoral
	LCT	Virtuel	CMF	
+++	Positif	Positif	Positif	Élevé et précoce (heures à jours)
	Négatif	Positif	Positif	Modéré et tardif (semaines à mois)
	Négatif	Positif/négatif**	Positif	Faible
	Négatif	Positif/négatif**	Négatif	Très faible
-	Négatif	Négatif	Négatif	Très faible

**Tableau 2 : Association entre « force » (DSA) en *Single Antigen Luminex*®, résultat du *crossmatch* et risque immunologique (Kheav, 2018)**

L'association des différentes techniques de *crossmatch* permet ainsi de définir la nature du risque immunologique et d'adapter le traitement immunosuppresseur en conséquence.

## IV. Appariement épitopique : antigène versus épitope

### A. Aspects immunologiques de l'épitope

#### a. Réaction immunitaire antigène – anticorps : interaction entre épitope et paratope

L'interaction antigène – anticorps est la base de la réaction immunitaire humorale. Elle a lieu entre l'épitope qui est le déterminant antigénique et le paratope des immunoglobulines.

Cette réaction est réversible et met en jeu des liaisons non-covalentes (Figure 13). Elle est à l'origine du rejet médié par les anticorps et peut être responsable de rejets hyper-aigus, aigus et chroniques.

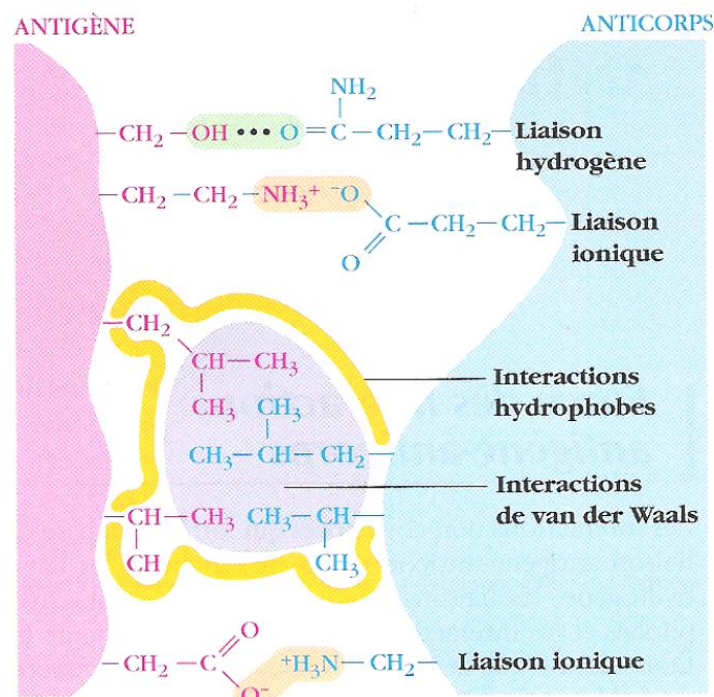


Figure 13 : Interactions lors de la réaction antigène – anticorps (Kuby, 2000)

Cette interaction est caractérisée par :

- Son affinité, qui correspond à la force des interactions entre un site de fixation de l'antigène et l'anticorps. Elle est définie par la constante d'affinité ( $K_a$ ) établie par la formule suivante :

$$K_a = \frac{[\text{Ag} - \text{Ac}]}{[\text{Ag}] \times [\text{Ac}]}$$



- Son avidité, qui correspond à la somme des interactions entre tous les sites de liaisons de l'antigène et de l'anticorps. Elle est une meilleure mesure de capacité de liaison au sein d'un système biologique. En effet, une forte avidité peut compenser une faible affinité (41).

La liaison du paratope de l'anticorps à l'épitope de l'antigène passe par la région N-terminale des chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline. Cette région correspond au Fab (Fragment antigen binding) contenant les régions variables  $V_H$  et  $V_L$  (Figure 14). Ces régions variables sont elles-mêmes subdivisées en plusieurs structures en boucles nommées CDR (Complementary Determining Region). Il en existe 3 pour la chaîne lourde et 3 pour la chaîne légère dont la séquence en acides aminés signe la spécificité du paratope pour un épitope. Grâce à sa variabilité de longueurs et de séquences d'acides aminés permettant un nombre de conformations très importants (1 à 35 acides aminés avec une moyenne de 15 acides aminés) et sa position au cœur du site de fixation de l'antigène, le CDR-H3 (3ème CDR de la chaîne lourde) a la particularité d'avoir une reconnaissance plus spécifique et, surtout, plus énergétique du déterminant épitopique. Il demeure donc responsable de la reconnaissance antigénique, les autres CDRs, de par leurs nombres restreints de conformation, permettant plutôt la stabilisation de la réaction antigène – anticorps (42).

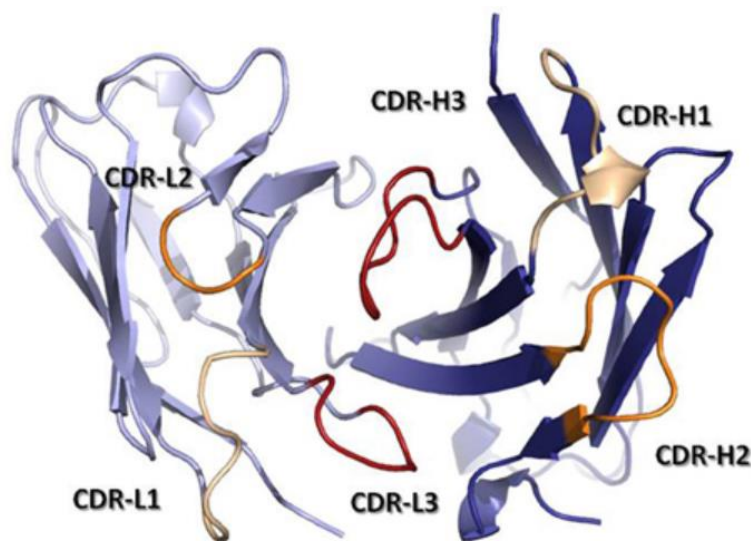


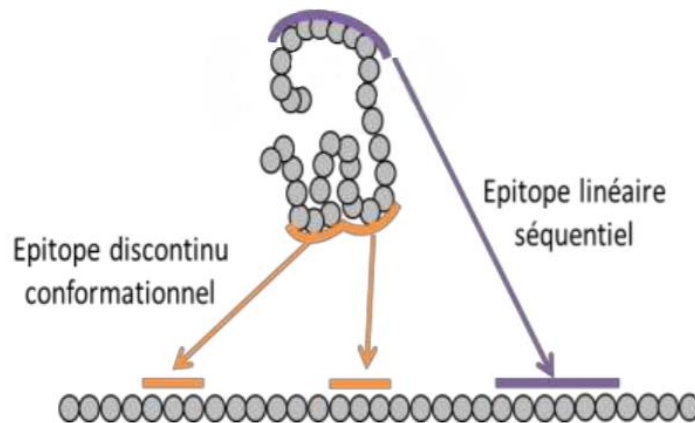
Figure 14 : Représentation du Fab (Finlay et Almagro, 2012)

## b. Epitopes

La liaison de l'antigène passe, elle, par l'épitope. La réaction immunitaire dépend de deux caractéristiques importantes de l'épitope : son antigénicité et son immunogénicité. L'antigénicité est le fait pour une substance d'être reconnue par le système immunitaire impliquant à la fois l'épitope immunogène et d'autres sites indispensables à l'interaction antigène – anticorps. L'immunogénicité est la capacité pour un antigène d'induire une réponse du système immunitaire (43).

L'épitope, aussi nommé « déterminant antigénique », correspond à une séquence d'acides aminés, proches géographiquement, qui a une complémentarité structurale et chimique avec le paratope de l'anticorps. L'épitope est défini par la façon dont il est reconnu par le paratope. En effet, du fait de la conformation spatiale de l'épitope, qui résulte à la fois de la charge électrique mais aussi du caractère hydrophobe ou hydrophile de ces acides aminés, il peut être reconnu de différentes manières. Il est dit « séquentiel » (linéaire) si l'enchaînement d'acides aminés reconnu par le paratope est continu (structure primaire) ; ou l'épitope peut être dit « conformationnel » (discontinu) : c'est-à-dire que la reconnaissance des acides aminés de l'épitope est la conséquence des différents repliements de la protéine (structure tertiaire, quaternaire...) (Figure 15). Cette reconnaissance entre l'épitope et l'anticorps s'effectue par le biais de différentes liaisons telles que les interactions de Van der Waals, les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques ou bien encore les interactions hydrophobes. La force de ces interactions, et par conséquent l'immunogénicité de l'épitope, est dépendante du caractère hydrophobe ou non des acides aminés de la séquence protéique de l'épitope (44). La résultante des faibles forces électrostatiques ainsi que le caractère hydrophobe des acides aminés rendent la liaison plus flexible, ce qui peut entraîner des réactivités croisées en cas de mutation (45). Ces forces physico-chimiques sont la conséquence du nombre, de la distribution des charges atomiques et de la polarité des acides aminés à la surface des molécules HLA. Ainsi, des mutations d'acides aminés au niveau des éléments clés pour la reconnaissance avec le paratope de l'anticorps peuvent induire des changements de propriétés électrostatiques des épitopes et entraîner une modification de la reconnaissance par l'anticorps de l'épitope (44).

Les antigènes ont des épitopes dits structuraux d'environ une vingtaine d'acides aminés qui vont entrer en contact avec les 6 CDRs de l'anticorps. Chaque épitope structurel a en son sein un épitope fonctionnel de 1 à 5 acides aminés. Cet épitope fonctionnel entre en relation avec le CDR-H3 et est le principal acteur de la liaison entre l'ensemble de l'épitope et le paratope de l'anticorps (46).



**Figure 15 : Représentation de la reconnaissance de l'épitope par l'anticorps (Denery, 2016)**

Un antigène HLA peut compter jusqu'à une vingtaine d'épitopes. Ces épitopes peuvent être spécifiques d'un antigène HLA, ce sont les épitopes dits « privés ». Les autres épitopes peuvent être retrouvés sur plusieurs antigènes HLA, souvent sur le même *locus*, mais parfois aussi sur différents *loci* tant que ces derniers appartiennent à la même classe, ce sont les épitopes dits « publics » ou « partagés » (47). Cette notion de réactivité croisée entre deux antigènes HLA n'est pas nouvelle et définit les CREG (*Cross-REactive Groups*) et les supertypes, mis en évidence à l'origine sur la classe I (46). Grâce à la compréhension des épitopes, ce phénomène de réactivité croisée s'explique. Par exemple, pour les 2 CREGs Bw4 et Bw6, tous les allèles appartenant au Bw4 partagent l'épitope 81ALR (ou 82LR) et tous les allèles du Bw6 partagent l'épitope 80N (48).

## B. Exploration des épitopes : Algorithme HLAMatchmaker

### a. Concept de triplets

Il est de fait admis que les anticorps anti-HLA sont des acteurs prépondérants dans le rejet aigu et chronique responsable de l'échec de la transplantation. La sensibilisation humorale aux antigènes leucocytaires humains (HLA) est un facteur important qui peut limiter grandement la transplantation d'organes. De nombreux receveurs d'organes ont développé des anticorps anti-HLA spécifiques qui, par conséquent, diminuent la probabilité de trouver un donneur.

Dans l'identification des anticorps anti-HLA, il ne faut pas oublier de considérer chaque antigène comme une chaîne d'épitopes potentiellement immunogènes. Une meilleure compréhension de la structure épitopique des antigènes HLA est importante non seulement pour l'identification des anticorps spécifiques du HLA, mais également pour déterminer la compatibilité HLA entre le receveur et le donneur au niveau moléculaire. Dans cette optique, Duquesnoy a créé un algorithme informatique intitulé « HLAMatchmaker » basé sur le concept que les épitopes immunogéniques sont représentés par des triplets d'acides aminés présents sur les parties exposées des séquences protéiques des chaînes HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, and HLA-C), accessibles aux alloanticorps (49). L'objectif est de permettre aux patients en attente de transplant qui ont un PRA (*Panel-Reactive Antibody*) supérieur à 85%, définis comme hautement immunisés, d'augmenter les probabilités de trouver un donneur compatible grâce à la comparaison de séquences linéaires de triplets d'acides aminés comme motifs d'épitopes potentiellement immunogènes (49).

L'algorithme considère que les polymorphismes HLA de classe I des antigènes définis sérologiquement et codés par les *loci* HLA-A, -B et -C sont très similaires dans la structure et que de nombreuses positions dans la séquence d'acides aminés ont des résidus identiques. En revanche, l'algorithme ne réalise aucune comparaison avec les antigènes HLA-DR et HLA-DQ car leurs séquences d'acides aminés sont très différentes de celles de la classe I. Par ailleurs, le typage sérologique par technique de lymphocytotoxicité ne permet pas une discrimination fiable des différents antigènes de classe II à cause, notamment, de réactions croisées (25).

Cet algorithme repose sur deux principes fondamentaux :

- Chaque antigène HLA représente un éventail distinct de triplets d'acides aminés polymorphes considérés comme des épitopes potentiellement immunogènes. Les épitopes doivent être accessibles aux anticorps et donc se trouver à la surface de l'antigène. Ces « triplets » sont donc considérés comme des éléments clés des épitopes et peuvent induire la formation d'allo-anticorps spécifiques.
- Les patients immunisés ne peuvent pas produire d'alloanticorps contre les triplets exprimés par leurs propres molécules HLA (« soi ») et donc ne peuvent développer des anticorps que contre des antigènes étrangers (« non-soi ») (49). L'algorithme évalue la compatibilité HLA donneur – receveur en réalisant des comparaisons intralocus et interlocus et détermine quels sont les triplets sur les molécules HLA incompatibles du donneur qui sont différents ou partagés avec les antigènes HLA-A, HLA-B, HLA-C du patient (50).

Dans le cas d'un patient en attente de transplant hautement immunisé, l'algorithme HLAMatchmaker permet de rendre certaines incompatibilités sérologiques acceptables si et seulement si l'incompatibilité possède des épitopes potentiellement immunogènes partagés par le receveur. Les triplets correspondent à l'épitope fonctionnel, celui en contact avec la boucle du CDR-H3, et sont représentés par des courtes séquences d'acides aminés continues, généralement 3 acides aminés (Tableau 3). L'algorithme distingue bien les molécules appartenant à la classe I des molécules appartenant à la classe II. En effet, la structure protéique des *loci* HLA-A, HLA-B, HLA-C présente des résidus identiques entre eux mais n'en partagent pas avec les *loci* HLA-DR et HLA-DQ. C'est pourquoi les épitopes publics peuvent être partagés par le même *locus* ou des *loci* différents de la même classe mais pas avec des *loci* d'autres classes. L'attribution des positions accessibles aux anticorps repose notamment sur les descriptions de la structure des molécules HLA par Bjorkman et *al* (51).

Position	HLA-A	HLA-B	HLA-C
9	F S T Y	D H Y	D F S Y
12	sV	sV aM aV	sV aV
14	R	R	R W
17	gR gS	gR	gR sR
41	A	A T	A
45	Me kMe	Ee Te Ge Ke Ma GeV	Ge
56	G R E	G	G
62	Rn Qe Ee Lq Ge	Rn Re Ge	Re
66	rKv rNv gKv rNm	qKy qIc qIs qIy qIf rNm	qKy qNy
70	aQs aHs	aQa tNt aKa aSa rQa	rQa
74	D N H ID	D Y	D aD
76	An Vd En Es	Es En Ed Vs Vg	Vs Vn
80	gTI rIa	rIa rNI rTI rTa	rNI rKI
82	aLr IRg	aLr IRg ILr	IRg
90	D A	A	A D
105	P S	P	P
107	G W	G	G
127	N K	N	N
131	R	R S	R
138	T	T	K T
142	I T	I	I
144	tKr tKh tQr	tQr tQl sQr	tQr
147	W	W L	W L
149	aVh aAh aAr tAh	aAr	aAr
151	vHa aHv aHe aRv aRw aRr aHa	aRv aRe	aRt aRe aRa
156	L W R Q	W L D R	L R W
158	A V	A T	A
163	R T dT E	L E T	T E L
166	Dg Ew	Ew Es Dg	Ew
171	Y H	Y H	Y
177	Et	Dt Et Dk	Kt Et
180	Q	Q E	Q
184	dP dA	dP	eP eH
186	K R	K	K
193	Av PI	PI Pv	Pv PI
199	A	A V	A
207	G S	G	G
246	A S Va	A	A
248	V	V	V M
253	Ee Ke Qe	Ee	Ee Eq

Triplet selection was based on the sequences of serologically defined HLA antigens corresponding to: A\*0101 A\*0201 A\*0301 A\*1101 A\*2301 A\*2402 A\*2501 A\*2601 A\*2902 A\*3001 A\*3101 A\*3201 A\*3301 A\*3402 A\*3601 A\*4301 A\*6601 A\*6801 A\*6901 A\*7401 A\*8001 B\*0702 B\*0801 B\*1301 B\*1801 B\*2705 B\*3501 B\*3701 B\*3801 B\*3901 B\*4101 B\*4201 B\*4402 B\*4501 B\*4601 B\*4701 B\*4801 B\*4901 B\*5001 B\*5101 B\*5201 B\*5301 B\*5401 B\*5501 B\*5601 B\*5701 B\*5801 B\*5901 B\*6001 B\*6002 B\*1501 B\*1516 B\*1401 B\*1402 B\*6701 B\*1509 B\*1510 B\*1503 B\*7301 B\*1502 B\*1511 B\*1513 B\*7801 B\*8101 B\*8201 Cw\*0102 Cw\*0202 Cw\*0302 Cw\*0401 Cw\*0501 Cw\*0602 Cw\*0701 Cw\*0801.

**Tableau 3 : Répertoire des triplets sur les antigènes HLA de classe I (Duquesnoy, 2001)**

En 2001, lors de la création de l'algorithme, 172 triplets polymorphiques ont été mis en évidence sur les antigènes HLA de classe I. Les polymorphismes des triplets se produisent à 30 emplacements sur les chaînes HLA-A, 24 emplacements sur les chaînes HLA-B et 19 emplacements sur les chaînes HLA-C. Le répertoire des triplets est basé sur des séquences d'acides aminés publiées d'antigènes HLA définis sérologiquement (49).

b. Les triplets : aperçu de l'utilisation de HLAMatchmaker

i. *Illustration selon Duquesnoy*

Pour démontrer l'intérêt de l'appariement épitopique par rapport à l'appariement antigénique sérologique, Duquesnoy utilise un patient hautement immunisé en attente d'une transplantation rénale pour qui 2 donneurs potentiels sont proposés (49) (Tableau 4).

<u>Typage</u>	HLA-A		HLA-B		HLA-Cw	
Receveur	A2	A31	B42	B53	Cw2	Cw7
Donneur 1	A2	A30	B51	B60	Cw4	Cw7
Donneur 2	A2	A32	B8	B55	Cw3	Cw6

Incompatibilités sérologiques en rouge

**Tableau 4 : Typages sérologiques HLA entre le patient receveur et deux donneurs potentiels (d'après Duquesnoy, 2001).**

*Trois incompatibilités au niveau des loci HLA-A et HLA-B sont dénombrées, 4 en tout pour le donneur 1, 5 pour le donneur 2.*

		Position																			
HLA: Allele		9	12	14	17	41	45	56	62	66	70	74	76	80	82	90	105	107	127	131	138
<b>Patient</b>																					
A2	A*0201	F	sV	R	gR	A	Me	G	Ge	rKv	aHs	H	Vd	gTI	IRg	A	A	W	K	R	T
A31	A*3101	T	sV	R	gR	A	Me	R	Qe	rNv	aHs	iD	Vd	gTI	IRg	A	S	G	N	R	T
B42	B*4201	Y	sV	R	gR	A	Ee	G	Rn	qlf	aQa	D	Es	rNI	IRg	A	P	G	N	R	M
B53	B*5301	Y	aM	R	gR	A	Te	G	Rn	qlf	tNt	Y	En	rla	aLr	A	P	G	N	S	M
Cw2	Cw*0202	Y	aV	R	gR	A	Ge	G	Re	qKy	rQa	D	Vn	rKI	IRg	A	P	G	N	R	T
Cw7	Cw*0701	D	aV	R	gR	A	Ge	G	Re	qKy	rQa	aD	Vs	rNI	IRg	D	P	G	N	R	T
<b>Donor HLA</b>																					
B60	B*4001	<u>H</u>	aM	R	gR	<u>I</u>	<u>Ke</u>	G	Re	<u>qls</u>	tNt	Y	Es	rNI	IRg	A	P	G	N	R	M
B8	B*0801	D	aM	R	gR	A	Ee	G	Rn	qlf	tNt	D	Es	rNI	IRg	A	P	G	N	R	M
		Position																			
		142	144	147	149	151	156	158	163	166	171	177	180	184	186	193	199	207	246	248	253
A2	A*0201	T	tKh	W	aAh	aHv	L	A	T	Ew	Y	Et	Q	A	K	Av	A	S	A	V	Q
A31	A*3101	I	tQr	W	aAr	aRv	L	A	T	Ew	Y	Et	Q	P	K	Av	A	S	s	V	Q
B42	B*4201	I	tQr	W	aAr	aRv	D	A	T	Ew	Y	Dt	E	P	K	Pi	A	G	A	V	E
B53	B*5301	I	tQr	W	aAr	aRv	L	A	T	Ew	Y	Et	Q	P	K	Pv	A	G	A	V	E
Cw2	Cw*0202	I	tQr	W	aAr	aRe	W	A	E	Ew	Y	Et	Q	Eh	K	Pv	A	G	A	V	E
Cw7	Cw*0701	I	tQr	L	aAr	aRa	L	A	T	Ew	Y	Et	Q	Ep	K	Pl	A	G	A	V	eQ
<b>Donor HLA</b>																					
B60	B*4001	I	<u>sQr</u>	L	aAr	aRv	L	A	E	Ew	Y	<u>Dk</u>	E	P	K	Pi	A	G	A	V	E
B8	B*0801	I	tQr	W	aAr	aRv	D	A	T	Ew	Y	Dt	E	P	K	Pi	A	G	A	V	E

Mismatched triplets are underlined, bold.

**Tableau 5 : Représentation des triplets non partagés sur les incompatibilités HLA-B60 (premier donneur potentiel) et HLA-B8 (deuxième donneur potentiel) avec les antigènes HLA du patient receveur (Duquesnoy, 2001).**

*Au total, 6 triplets sont non partagés sur l'antigène HLA-B60 contre 0 triplet sur l'antigène HLA-B8.*

L'algorithme HLAMatchmaker permet de convertir chaque antigène HLA en chaîne de triplets potentiellement immunogènes. En considérant uniquement l'incompatibilité HLA-B60 pour le premier donneur potentiel et l'incompatibilité HLA-B8 du deuxième donneur potentiel, il existe plusieurs incompatibilités au niveau des triplets du premier donneur par rapport au second donneur (Tableau 5). De ce fait, l'incompatibilité HLA-B60 présente un risque plus immunogène pour le receveur que l'incompatibilité HLA-B8. D'après le principe de HLAMatchmaker qui spécifie qu'on ne peut développer des anticorps que contre des antigènes étrangers, HLA-B8 peut être considéré comme une incompatibilité sérologique acceptable car elle ne présente pas d'incompatibilités épitopiques (triplet). Théoriquement, le patient ne peut pas développer d'anticorps contre l'antigène HLA-B8. De plus, si l'ensemble des typages des deux donneurs est considéré : le donneur 1 possède 13 incompatibilités épitopiques (4 sur le HLA-A30, 1 sur le HLA-B51, 6 sur le HLA-B60, 3 sur le HLA-Cw4) ; le donneur 2 de son côté ne possède aucune incompatibilité sur l'ensemble de ces triplets. Pour ce patient immunisé en attente de transplantation, le donneur 2 possède une compatibilité optimale malgré le fait qu'il ait plus d'incompatibilités sérologiques.



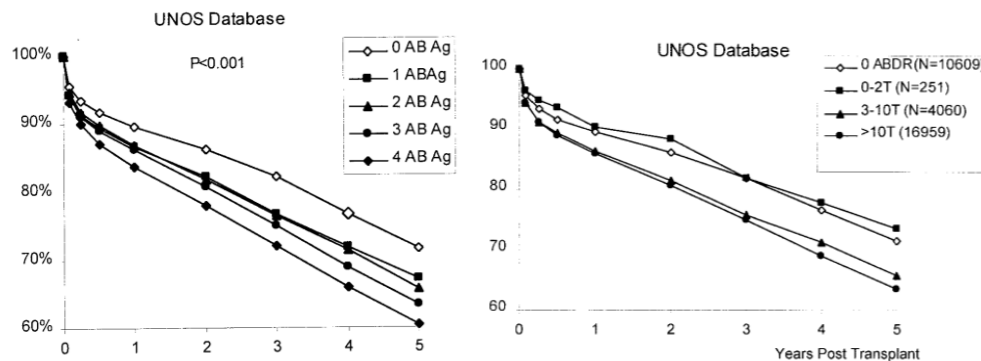
## ii. Exemple d'Eurotransplant

Eurotransplant est une organisation à but non lucratif responsable de l'allocation d'organes dans 8 pays d'Europe : l'Allemagne, l'Autriche, le Luxembourg, la Belgique, les Pays-Bas, la Croatie, la Slovénie et la Hongrie. Dans ces pays vivent environ 137 millions de personnes. Grâce à la taille de cette population, la compatibilité parfaite est permise lors de la transplantation d'organe (<https://www.eurotransplant.org>).

Eurotransplant utilise le logiciel HLAMatchmaker depuis plusieurs années pour les patients hyperimmunisés (PRA > 85%) de manière prospective afin de mettre en évidence tous les antigènes HLA contre lesquels le patient en attente de transplant ne possèdent pas d'anticorps : nommés « les incompatibilités acceptables », en utilisant la méthode décrite précédemment (52) consistant à répertorier les incompatibilités épitopiques avec le receveur. Néanmoins, il est important de préciser que les anticorps anti-HLA sont identifiés par technique de lymphocytotoxicité et non par des techniques Luminex pour plusieurs raisons. La première est que la technique est considérée comme trop sensible et peut donner des résultats faussement positifs à cause de la présence de molécules dénaturées sur les billes (53). La deuxième est qu'il est considéré que la présence d'anticorps spécifiques du donneur (DSA) détectés par *Single Antigen* Luminex n'a pas été associée à une survie du greffon plus faible par rapport aux patients sans DSA (54), même s'il est considéré que la présence de DSA détectés par Luminex est corrélée à un rejet accru dans les 6 mois post-transplantations (53). Grâce à l'algorithme, les chances de transplantation des patients hyperimmunisés d'Eurotransplant a été multiplié par 3 (53).

## c. Etudes des triplets : impact sur la survie du greffon

Duquesnoy et *al* étudient par la suite l'impact de la détermination épitopique par les triplets de la classe I sur la survie des greffons rénaux (55). Ils sélectionnent des patients qui ont été greffés avec aucune incompatibilité sérologique sur le *locus* HLA-DR dans les bases de données UNOS (*United Network for Organ Sharing*) et Eurotransplant et comparent le pourcentage de survie à 5 années post-transplantation en fonction du nombre d'incompatibilités sérologiques sur les *loci* HLA-A et HLA-B (Figure 16).



**Figure 16: Survie du greffon à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités sérologiques (à gauche) et en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplets) (à droite) (Duquesnoy et al, 2003)**

La survie du greffon rénal est inversement proportionnelle aux nombres d'incompatibilités sérologiques. Ils comparent ensuite la survie à 5 ans des patients greffés avec 0 incompatibilité sérologique avec des patients ayant un nombre croissant d'incompatibilités épitopiques (triplet). Ils constatent que la courbe de survie des patients avec 0 à 2 incompatibilités épitopiques se superpose à la courbe de survie des patients avec 0 incompatibilité sérologique et que le taux de survie à 5 ans reste excellent jusqu'à 4 triplets non appariés.

Dankers et Duquesnoy (56) vont plus loin en étudiant la valeur prédictive de la détermination épitopique sur la survenue de DSA. Ils effectuent une étude rétrospective sur une cohorte d'environ 150 patients greffés rénaux, entre 1973 et 2000, en attente d'une seconde transplantation pour lesquels ils comptabilisent le nombre d'incompatibilités épitopiques (triplets) entre les receveurs et les donneurs et la survenue éventuelle de DSA (Figure 17).

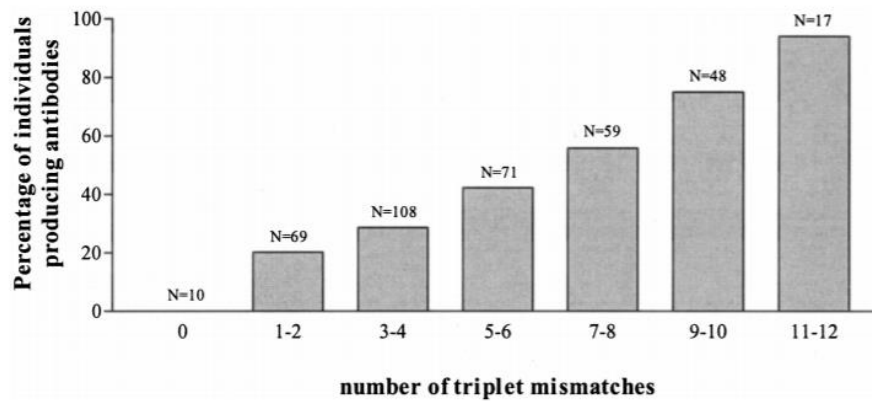


Figure 17 : Pourcentage d'individus produisant des DSA en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplet) (Dankers et al, 2004)

Ils ont constaté que les patients ne présentant pas d'incompatibilités épitopiques avec leurs donneurs ne développent pas de DSA. En revanche, plus le nombre d'incompatibilités épitopiques, augmente plus le risque de développer des DSA est élevé. Une corrélation est établie entre le nombre d'incompatibilités épitopiques et le risque de survenue de DSA.

Néanmoins, des études sont venues nuancer celles de Dankers et Duquesnoy. En 2004, Laux et al réalisent une étude rétrospective avec une cohorte de 17000 patients greffés rénaux entre 1991 et 2001 (57). L'objectif est d'étudier la survie du greffon à 5 ans. Les patients de la cohorte, comme pour les études de Duquesnoy, ne possèdent aucune ou plusieurs incompatibilités sur les *loci* HLA-A et HLA-B avec toujours zéro incompatibilité sur le *locus* HLA-DR (Tableau 6).

TABLE 1. Effect of amino acid triplet mismatches on kidney-graft survival

	Number of triplet mismatches (TMM)	Number of transplants	Graft-survival rate at 5 years (%±SE)
First transplants	0-6 TMM	357	73.31±2.90
	7-9 TMM	678	71.54±2.13
	10-12 TMM	898	71.00±1.87
	≥13 TMM	2,105	71.08±1.22
Retransplants	0-6 TMM	73	60.68±6.62
	7-9 TMM	137	57.10±6.16
	10-12 TMM	147	67.51±4.53
	≥13 TMM	316	67.99±3.12
Transplants PRA≥50%	0-9 TMM	40	50.08±8.97
	>9 TMM	92	63.05±5.54
First transplants Western Europe	0-6 TMM	279	76.30±3.11
	7-9 TMM	490	72.65±2.41
	10-12 TMM	649	71.32±2.14
	≥13 TMM	1,498	70.33±1.46
First transplants North America	0-6 TMM	44	65.61±10.32
	7-9 TMM	96	72.90±5.88
	10-12 TMM	36	72.44±10.23
	≥13 TMM	293	70.85±3.49
First transplants performed between 1991 and 1995	0-6 TMM	144	68.31±4.04
	7-9 TMM	286	73.13±2.75
	10-12 TMM	382	67.99±2.49
	≥13 TMM	864	68.40±1.67
First transplants performed between 1996 and 2001	0-6 TMM	213	76.96±4.75
	7-9 TMM	392	69.53±3.83
	10-12 TMM	516	73.69±3.11
	≥13 TMM	1,241	73.78±1.95

*P*=NS for all comparisons.

PRA, panel-reactive antibody.

Tableau 6 : Survie du greffon à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplet) (Laux et al, 2004)

L'étude ne démontre pas de différence significative de la survie à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplets).

#### d. Limites des triplets

Laux et al remettent en question l'utilisation des triplets de Duquesnoy en soulignant certaines limites (57). Tout d'abord, l'attribution des triplets d'acides aminés sur HLAMatchmaker est basée sur l'allèle le plus fréquent qui fait partie d'une spécificité HLA phénotypique définie sérologiquement. Ces affectations supposées sont par conséquent incorrectes dans tous les cas où le patient porte un allèle différent du plus commun. De plus, l'utilisation des incompatibilités HLA-A et/ou HLA-B sans incompatibilité sur le *locus* HLA-DR, comme dans les études de Duquesnoy, permet une corrélation entre le nombre d'incompatibilités épitopiques (triplets) et le nombre d'incompatibilités sérologiques. Ce qui signifie que, certes, la survie du greffon à 5 ans est significativement meilleure lorsque le nombre d'incompatibilités au niveau des triplets est faible mais, étant donné la corrélation entre les incompatibilités sérologiques et épitopiques, le nombre d'incompatibilités épitopiques n'est pas plus prédictif que le nombre d'incompatibilités sérologiques (Figures 18 et 19). Enfin, l'étude souligne que certaines incompatibilités épitopiques ne sont pas mises en

évidence car la clé épitopique ne se résume pas seulement à la séquence du triplet mais aussi à d'autres acides aminés présents sur l'épitope structurel. Pour les prendre en compte, il faut donc disposer de l'ensemble de la séquence d'acides aminés de l'épitope. Cela n'est réalisable qu'en effectuant un typage HLA des patients avec des techniques de biologie moléculaire en haute résolution qui permettent d'obtenir des résultats avec une résolution allélique (4 digits).

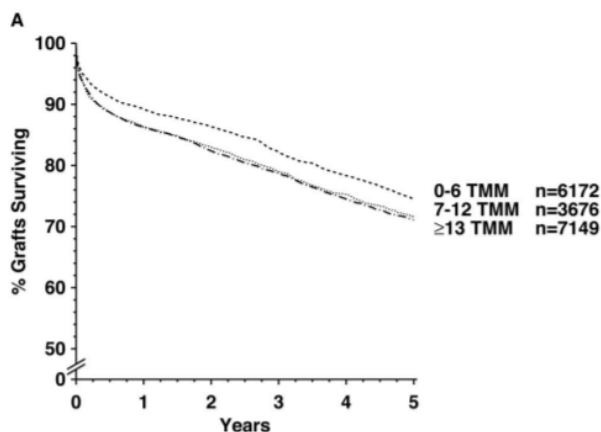


Figure 18 : Survie du greffon à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplet) (Laux et *al*, 2004)

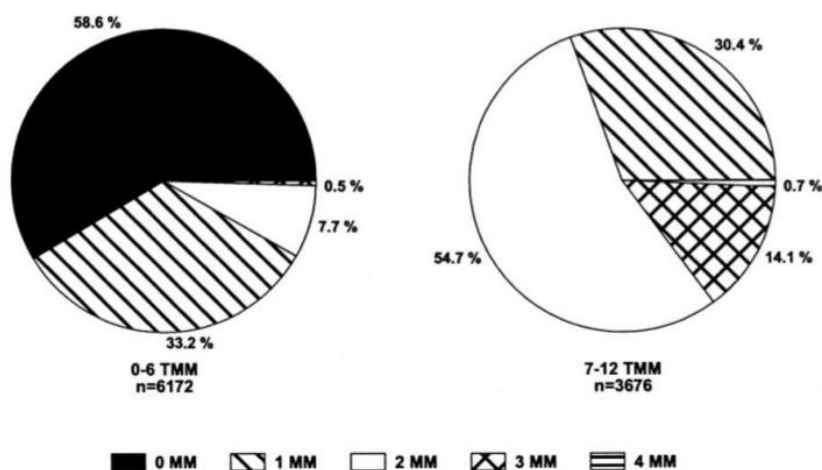


Figure 19 : Survie du greffon à 5 ans en fonction du nombre d'incompatibilités épitopiques (triplet) (Laux et *al*, 2004)

e. Vers les eplets

i. *Evolution de l'algorithme*

L'utilisation de la terminologie « triplet » est alors remise en question par Duquesnoy lui-même lorsqu'il étudie les anticorps développés par une femme venant d'accoucher (58). Cette femme a développé des anticorps anti-HLA-A3, l'antigène HLA-A3 du bébé provenant du père. Cinq anticorps monoclonaux anti-HLA-A3 ont été identifiés chez cette femme. Certains d'entre eux réagissaient avec plusieurs antigènes, dont le HLA-A3, sans pour autant réagir avec d'autres antigènes qui partagent les mêmes triplets. En utilisant la cristallographie et la modélisation en trois-dimensions, Duquesnoy s'est rendu compte que, pour que la réaction antigène – anticorps s'établisse, d'autres contacts, en dehors du triplet, devaient avoir lieu (58). Ces contacts critiques nommés « *hot spot* » correspondaient à d'autres acides aminés présents en contact avec d'autres CDRs que le CDR-H3. L'ensemble de ces résidus, en comprenant le triplet et ces *hots spots*, forme une séquence protéique conformationnelle qui a été nommée « eplet ». Depuis ces observations, le terme « triplet » est devenu complètement désuet.

En 2006, l'utilisation du concept des eplets, de par sa pertinence, est intégrée dans la nouvelle version de l'algorithme HLAMatchmaker. L'évolution de l'algorithme prend en compte dorénavant les épitopes de classe II en plus de ceux de classe I. Lors de cette mise à jour, l'algorithme comptabilise 199 eplets pour la classe I (59) ainsi que 146 eplets pour le *locus* HLA-DRB, 74 pour le HLA-DQB, 58 pour le HLA-DQA, 45 pour le HLA-DPB et 19 pour le HLA-DPA (60).

Le concept « d'eplet » démontre sa pertinence, entre autres, par rapport au « triplet » lorsqu'un patient développe un anticorps contre un eplet qui comprend 2 contacts critiques, qui, considérés séparément, sont des épitopes appartenant au soi. Pour l'exemple, Marrari et collab. (61) étudie le cas d'un patient transplanté rénal typé HLA-B13 (CREG : Bw4), donc possédant l'épitope Bw4 (82LR), et qui développe un anticorps contre tous les allèles Bw4 à l'exclusion du HLA-B13.

	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
A*02:01	T	H	R	V	D	L	G	T	L	R	G	Y	M	A	A	Q	T	T	K	H	K	W	E	A
A*11:01	T	D	R	V	D	L	G	T	L	R	G	Y	M	A	A	Q	I	T	K	R	K	W	E	A
B*13:01	T	Y	R	E	N	L	R	T	A	L	R	Y	T	A	A	Q	I	T	Q	L	K	W	E	A
B*40:10	T	Y	R	E	S	L	R	N	L	R	G	Y	T	A	A	Q	I	S	Q	R	K	L	E	A
Cw*03:04	T	D	R	V	S	L	R	N	L	R	G	Y	T	A	A	Q	I	T	Q	R	K	W	E	A
Cw*04:03	A	D	R	V	N	L	R	K	L	R	G	Y	T	A	A	Q	I	T	Q	R	K	W	E	A
B*53:01	T	Y	R	E	N	L	R	I	A	L	R	Y	T	A	A	Q	I	T	Q	R	K	W	E	A

**Tableau 7 : Séquence polymorphique d'acides aminés composant les épitopes des allèles du patient receveur en comparaison avec l'allèle à l'origine de l'immunisation (Ducreux et al, 2018 d'après Marrari et al, 2011)**

L'allèle immunisant est le HLA-B\*53:01, exprimant l'épitope Bw4 porteur de l'eplet 82LR, comme l'antigène HLA-B13 du patient receveur, mais aussi un autre eplet : le 145R, à la différence du HLA-B13 porteur de l'eplet 145L (Tableau 7). Bien que porteur de l'eplet 82LR mais aussi de l'eplet 145R sur des antigènes différents du HLA-B13, le receveur a développé un anticorps. Cela s'explique par la configuration tridimensionnelle de la molécule HLA-B\*53:01 qui montre une proximité entre ces deux eplets. En raison de cette configuration, l'anticorps va reconnaître ces deux eplets comme étant un eplet à part entière : le 82LR+145R (Figure 20), appartenant au non soi.

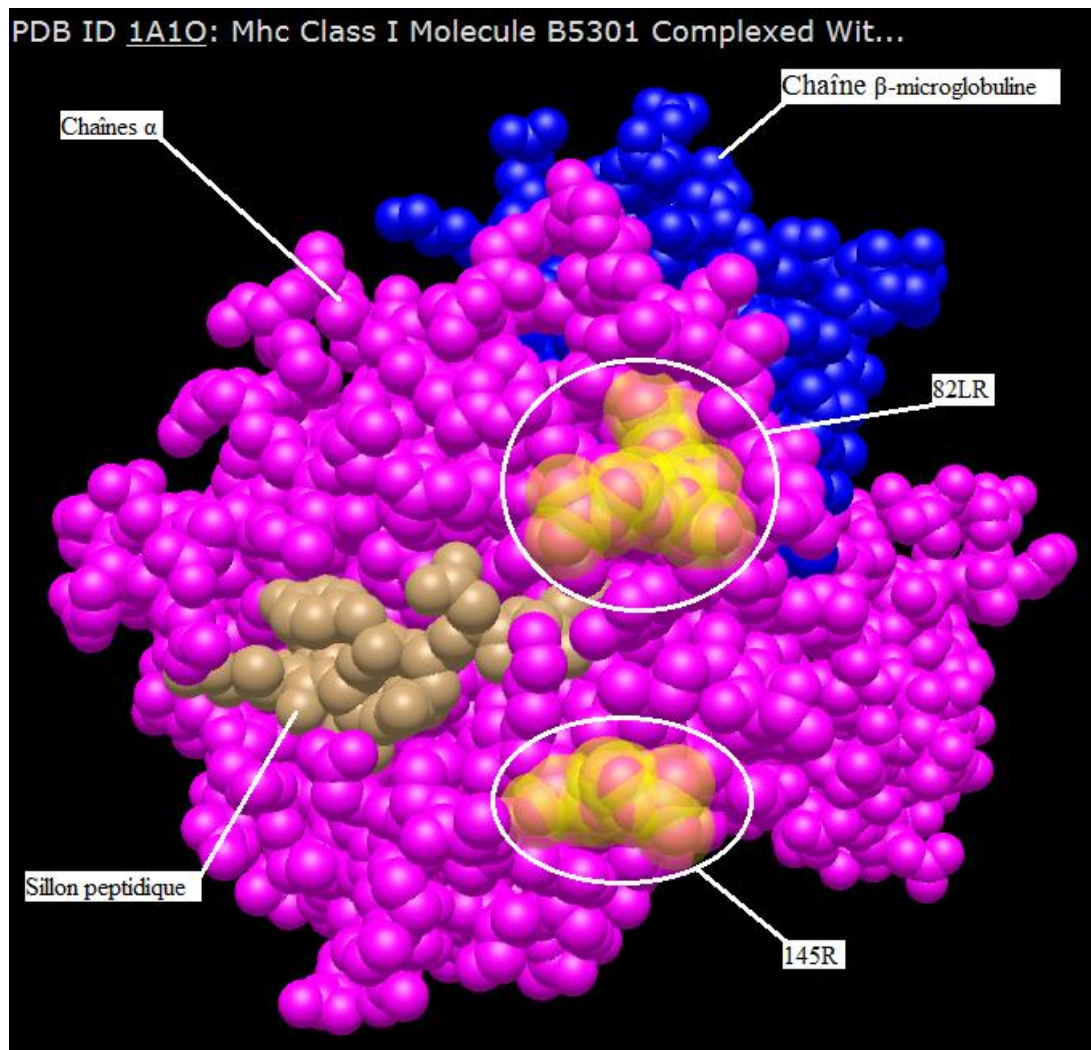


Figure 20 : Structure tridimensionnelle de la molécule HLA-B\*53:01 (extrait de OLIN FUSION ®)

## ii. Nomenclature des Eplets

Les eplets sont définis par la position des acides aminés distinctifs partagés par les antigènes réactifs à l'anticorps. Pour avoir la séquence d'acides aminés au complet de l'eplet, il est nécessaire de réaliser un typage HLA en biologie moléculaire en haute résolution qui permet d'obtenir un résultat avec une résolution allélique (4 digits). Il est également indispensable d'avoir une représentation en trois-dimensions de l'antigène pour savoir quelles sont les zones accessibles à l'anticorps. Les acides aminés définissant l'eplet doivent donc être à la surface de l'antigène et se trouver dans l'intervalle de liaison à l'anticorps (définis dans la littérature entre 494 Å et 750 Å) (62).



La nomenclature des eplets se présente de différentes façons :

- Eplet défini par la position d'un acide aminé ou d'un groupe d'acide aminé (Figure 21)

70DR

Figure 21 : Eplet défini par l'Acide aspartique en position 70 et l'Arginine en position 71.

*Eplet partagé par le HLA-DRB1\*07:01, -DRB1\*08:01, -DRB1\*08:02, -DRB1\*11:01, HLA-DRB1\*11:04, -DRB1\*12:01, -DRB1\*12:02, -DRB1\*13:05, -DRB1\*14:03, -DRB1\*16:01, -DRB1\*16:02, -DRB5\*01:01*

- Eplet défini par la position de plusieurs acides aminés (Figure 22)

43P+69A+76E

Figure 22 : Eplet défini par 3 acides aminés : la Proline en position 43, l'Alanine en position 69 ainsi que l'Acide glutamique en position 76.

*Eplet partagé par HLA-B7, HLA-B42, HLA-B67, HLA-B81, HLA-B63, HLA-B\*27:05, HLA-B\*27:08, HLA-B54, HLA-B55, HLA-B56, HLA-B\*57:01, HLA-B\*57:03, HLA-B58, et HLA-B82*

- Eplet défini par des positions alternatives des acides aminés (Figure 23)

44K/150V/158V

Figure 23 : Eplet pouvant être défini soit par la Lysine en position 44, soit par la Valine en position 150, soit par la Valine en position 158.

*Eplet partagé par HLA-A1 et HLA-A36*

- Eplet défini par plusieurs positions d'acides aminés dont certains par des positions alternatives (Figure 24)

145L/41T+46A

**Figure 24 : Eplet pouvant être défini soit par la Lysine en position 145, soit par la Thréonine en position 41, et par l'Alanine en position 46.**

*Eplet spécifique du HLA-B13*

### iii. Vérification des eplets

Il est primordial de s'assurer que les eplets identifiés sont effectivement capables de se lier à un anticorps. Un eplet est considéré théorique tant qu'il n'a pas été « vérifié par un anticorps ». Pour cela, leurs antigénicités peuvent être testées de plusieurs façons. L'une d'entre elle, consiste à utiliser un anticorps monoclonal murin ou un allo-anticorps isolé d'un sérum humain par adsorption. L'anticorps est mis en présence de billes coatées chacune avec un antigène unique (technique d'identification par *Single Antigen*). La réactivité des différentes billes par rapport à l'anticorps utilisé est mesurée en MFI et permet de mettre en évidence un épitope en fonction de la séquence d'acides aminés propres à chaque antigène HLA. Si une seule bille réagit à l'anticorps, l'épitope cible est considéré comme un épitope privé spécifique à l'antigène présent sur la bille. Si plusieurs billes réagissent à l'anticorps, l'épitope est donc partagé par les antigènes se trouvant sur ces billes (63). Ces eplets vérifiés par cette méthode sont nommés « *Terasaki epitope* » ou « TerEp » (64). Il est recommandé pour l'utilisation de l'algorithme HLAMatchmaker de ne considérer que les eplets qui ont été vérifiés par un anticorps.

## **C. Intérêts du raisonnement en incompatibilité épitopique**

### **a. Compréhension de l'immunisation chez le receveur**

Les identifications d'anticorps anti-HLA, réalisées chez les patients en attente de transplant, permettent de mettre en évidence une immunisation préexistante à la transplantation et ainsi éviter autant que faire se peut le phénomène de rejet. Les événements pouvant provoqués une allo-immunisation anti-HLA chez les patients en attente d'organe sont : la transfusion sanguine, la grossesse et la transplantation d'organes solides. Certains possèdent des anticorps naturels anti-HLA sans pour autant qu'il y ait eu un événement immunisant particulier (65). Il existe aussi des cas où un patient après un événement immunisant développe des anticorps contre des antigènes HLA pour lesquels il ne semble pas avoir été en contact. Snanoudj (66) rapporte le cas d'un homme de 65 ans pour lequel une transplantation rénale a été réalisée avec seulement une incompatibilité au niveau de l'antigène HLA-A23. Son sérum pré-transplantation ne présente pas de réactivité vis-à-vis des antigènes HLA et il n'a jamais eu d'événements immunisants avant la transplantation. Ce patient est transplantectomisé rapidement après l'intervention à cause d'une thrombose précoce post-transplantation. Une nouvelle transplantation rénale lui est proposée 2 ans plus tard qui nécessite préalablement une nouvelle identification des anticorps anti-HLA (Tableau 8).

	MFI
A23	9016
A24	12400
A25	2936
A32	8945
B27	1063
B37	1345
B38	5953
B44	913
B47	1218
B49	7685
B51	6720
B52	5440
B53	4331
B57	5955
B58	3656
B59	7377
B63	2965
B77	1560

**Tableau 8 : Spécificités HLA pour lequel le patient a développé des anticorps (Technique *Single Antigen* Luminex) (Snanoudj, 2016)**

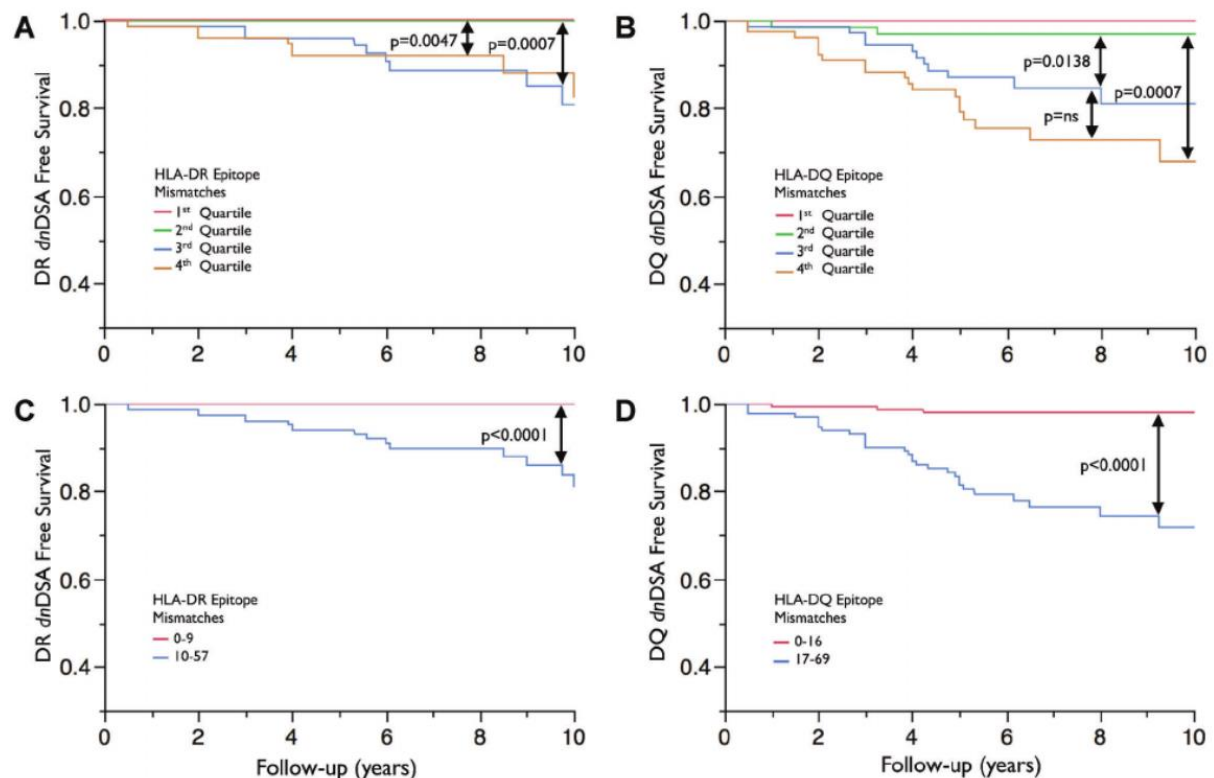
Cet homme, qui pour rappel n'a eu comme évènement immunisant que sa transplantation, s'avère hyperimmunisé. La question s'est posée de comment une immunisation aussi importante a pu avoir lieu alors que la précédente transplantation a été faite avec un appariement qui ne comportait qu'une seule incompatibilité sérologique (HLA-A23). Or, en terme de compatibilité épitopique, sur les 18 spécificités d'anticorps anti-HLA développées par cet homme, toutes ont en commun un épitope : le 82LR+145R partagé également par l'antigène HLA-A23. En conclusion, ce patient a développé un anticorps contre un seul épitope partagé par plusieurs antigènes HLA et non pas 18 anticorps différents comme le montrait le profil d'anticorps.

## b. Incompatibilité épitopique : charge épitopique

Suite à la mise en place du concept des eplets, Duquesnoy étudie les incompatibilités épitopiques de classe II chez les patients transplantés rénaux (67) et constate que certaines incompatibilités sont plus immunogènes que d'autres. En effet, les incompatibilités sur le *locus* HLA-DRB1 semblent induire moins d'anticorps que les *loci* HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5 et HLA-DQ. Pour les molécules HLA-DR surnuméraires, cela s'explique par un nombre important d'épitopes privés sur ces *loci* (67). Pour le *locus* HLA-DQ, l'analyse des incompatibilités épitopiques est beaucoup plus complexe : les eplets immunogènes se trouvent à la fois sur les chaînes alpha et bêta ; un anticorps peut donc se former contre un eplet de la chaîne bêta, ou bien de la chaîne alpha ou encore contre un eplet dont les contacts critiques sont présents sur la chaîne bêta et la chaîne alpha (43). L'immunogénicité des eplets n'étant pas la même en fonction des *loci*, les incompatibilités d'épitopes à immunogénicité élevée doivent être évitées alors que les épitopes à faible immunogénicité peuvent être considérés comme des mésappariements admissibles (67).

Grâce à l'algorithme HLAMatchmaker, de nombreux auteurs ont cherché à déterminer le seuil d'incompatibilités épitopiques associé à un risque accru de rejet. Pour déterminer le seuil optimal, il convient de prendre en compte l'immunogénicité et l'antigénicité de l'épitope. HLAMatchmaker peut être utilisé comme un outil quantitatif pour déterminer le degré de non-concordance et ainsi évaluer l'antigénicité. Mais il semble également utile comme outil pour évaluer l'immunogénicité des épitopes déterminés par la fréquence d'une réponse anticorps spécifique.

Dans une étude rétrospective avec une cohorte de 392 patients transplantés rénaux, les incompatibilités épitopiques (eplet) en fonction des *loci* de la classe II ont été recensées et l'apparition des DSA dans le temps a été répertoriée (68) (Figure 25).



**Figure 25 :** Représentation Kaplan-Meier du pourcentage de la survie sans rejet du greffon dans le temps en fonction des incompatibilités épitopiques (epit) des différents *loci* (Wiebe et al, 2013)

Wiebe et al démontrent que la survenue de DSA est corrélée au nombre d'incompatibilités épitopiques sur les *loci* HLA-DR et HLA-DQ et surtout que les incompatibilités au niveau du *locus* HLA-DQ par rapport au *locus* HLA-DR sont plus à risque de survenue de DSA de novo (68).

La réflexion se poursuit avec l'étude d'une cohorte de 195 patients transplantés rénaux pour lesquels il a comparé le nombre d'incompatibilités sur la classe II avec la durée de survie du greffon (69). La non-observance du traitement immunosuppresseur a été prise en compte pour éviter un éventuel biais d'interprétation (Figure 26).

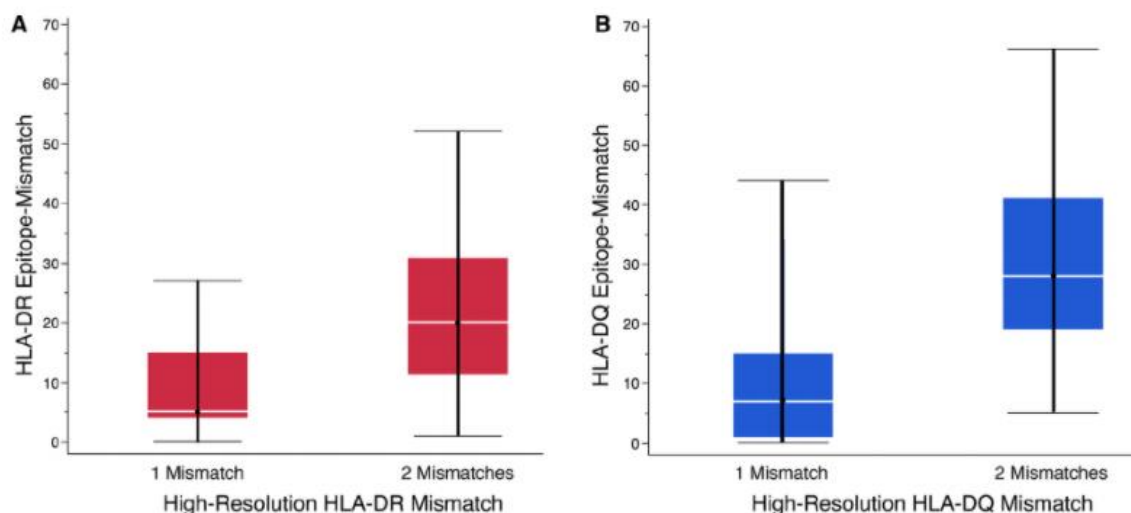


Figure 26 : Représentation en boîte à moustache du nombre d'incompatibilités épitopiques (eplet) en fonction du nombre d'incompatibilités sérologiques sur le *locus* HLA-DR (à gauche) et sur le *locus* HLA-DQ (à droite) (Wiebe et al, 2013)

Tout d'abord, il a démontré que le nombre d'incompatibilités alléliques n'est pas prédictible du nombre d'incompatibilités épitopiques et, de facto, le risque de rejet immunologique ne sera pas le même. Pour l'exemple, sur le *locus* HLA-DR : 2 incompatibilités alléliques peuvent entraîner entre 0 et plus de 50 incompatibilités épitopiques. Sur le *locus* HLA-DQ, 2 incompatibilités alléliques peuvent entraîner entre 5 et plus de 60 incompatibilités épitopiques.

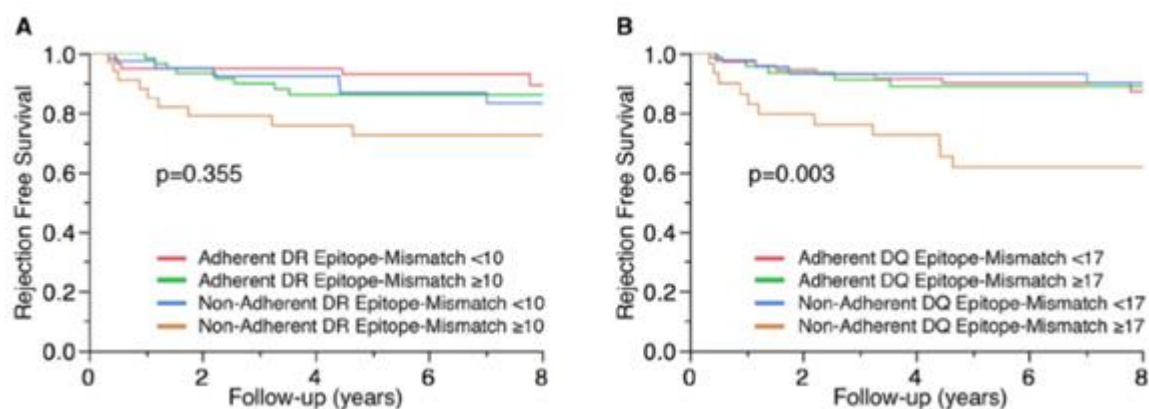
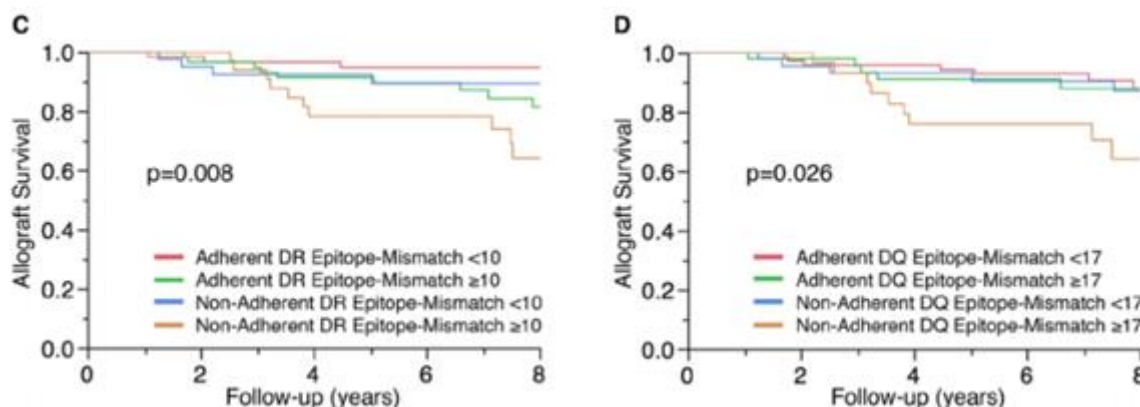


Figure 27 : Représentation Kaplan-Meier du pourcentage de la survie sans rejet du greffon dans le temps en fonction du seuil d'incompatibilités épitopiques (eplet) prédéfini pour le *locus* HLA-DR (à gauche) et sur le *locus* HLA-DQ (à droite) (Wiebe et al, 2013)



**Figure 28 : Représentation Kaplan-Meier du pourcentage de survie du greffon dans le temps en fonction du seuil d'incompatibilités épitopiques (eplet) prédéfini pour le *locus* HLA-DR (à gauche) et sur le *locus* HLA-DQ (à droite) (Wiebe et al, 2013)**

Enfin, il a étudié l'impact sur la survie du greffon sans rejet en fonction de l'observance ou non du traitement immunosuppresseur et du nombre d'incompatibilités épitopiques sur les différents *loci* (Graphique 27 et 28). A partir de là, il a cherché à définir un seuil d'incompatibilités acceptables au niveau épitopique en fonction du *locus* pour prévenir le rejet humoral. Le risque de survenue de DSA *de novo* a été défini ici comme acceptable pour un nombre d'incompatibilités épitopiques sur le *locus* HLA-DR inférieur à 10 et sur le *locus* HLA-DQ inférieur à 17. A partir de ces conclusions, il suggère d'allouer des points en fonction du *locus* où se situe l'incompatibilité épitopique. Le score d'incompatibilité peut être intéressant dans la prise en charge clinique du patient ainsi que pour son suivi car il fournit une évaluation plus détaillée du risque immunologique post-transplantation et peut éventuellement aider à proposer des stratégies immunosuppressives ainsi qu'à la surveillance, plus rapprochée ou non, de la survenue de DSA.

D'autres études ont été réalisées dans le but de corréler un seuil d'incompatibilités épitopiques et le risque de survenue de DSA *de novo* ou de baisse de la survie du transplant. Une étude sur les transplantations cardiaques pédiatriques suggère qu'un seuil inférieur à 10 incompatibilités épitopiques en classe I est un bon pronostic de survie du greffon (70). Une autre étude effectuée avec des transplantés rénaux suggère qu'un seuil supérieur à 6 incompatibilités épitopiques sur le *locus* HLA-B est un risque de survenue de DSA *de novo* (71). Enfin, une autre étude a été réalisée pour déterminer à partir de quels seuils d'incompatibilités épitopiques le risque de survenue de DSA *de novo* est le plus important tout en comparant les compatibilités alléliques et physico-chimiques (44). Un seuil de 11 incompatibilités épitopiques pour les *loci* HLA-A et HLA-B a été déterminé ainsi qu'un seuil de 25 incompatibilités épitopiques pour les *loci* HLA-DR et HLA-DQB1 associés.



A ce jour, aucun consensus n'a été établi sur l'application de ces seuils d'incompatibilités épitopiques dans la transplantation d'organes. Tout ce qui peut être affirmé à l'heure actuelle, c'est que plus le nombre d'incompatibilités épitopiques est important, plus le risque de perte du transplant est élevé.

### c. Paradigme du « *nonself-self* »

Le raisonnement en eplet permet d'apporter un angle de vue différent sur la compréhension de comment s'effectue l'immunisation HLA. Au cours du développement des lymphocytes B, les réarrangements des gènes  $V_H$  et  $V_L$  conduisent à l'expression de récepteurs d'immunoglobulines sur les lymphocytes B en développement. Ils passent par plusieurs étapes pour devenir des lymphocytes B matures. Ces récepteurs peuvent reconnaître des épitopes sur des protéines du soi après l'étape de sélection positive (72). Toutefois, après la sélection négative, les lymphocytes B restants ne portent que des récepteurs de faible avidité et ne doivent pas conduire à la production d'anticorps. C'est pourquoi, il a été suggéré que les lymphocytes B possèdent des récepteurs de faible avidité pour les molécules HLA du soi. Ces récepteurs peuvent interagir mais la force de liaison qui en découlerait ne permettrait pas l'activation du lymphocyte B (73).

Lors d'un événement immunisant, la mise en contact avec des incompatibilités HLA conduit normalement à une production d'anticorps. Il a été supposé que le CDR-H3, de par sa taille et son rôle dans la reconnaissance spécifique de la réaction anticorps – antigène, pourrait former plusieurs boucles dont l'une d'elle aurait la capacité de se lier avec un épitope du soi tandis que d'autres se lieraient plus fortement avec les motifs étrangers du reste de l'épitope. Cela signifierait que dans la reconnaissance entre un épitope et un anticorps, l'épitope doit posséder des motifs du soi pour être reconnu. C'est le paradigme du *nonself-self* (73). Duquesnoy a testé son hypothèse avec 6 patients qui ont développé un anticorps spécifique d'un épitope d'un antigène HLA de classe I (Tableau 9).

Eplet					Number of differences	Polymorphic surface residues											
Case 1																	
65RNA+s82LR	65	66	69			43	62	73	76	79	80	82	83	152	163	166	
A*32:01 Immunizer	R	N	A			Q	Q	T	E	R	I	L	R	V	T	E	
Antibody producer																	
A*02:01	R	K	A	6		-	G	-	V	G	T	R	G	-	-	-	
<b>A*24:02</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>2</b>		-	<b>E</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>D</b>	
B*07:02	Q	I	A	7		P	R	-	-	-	N	R	G	E	E	-	
B*40:01	Q	I	T	6		P	R	-	-	-	N	R	G	-	E	-	
C*07:02	Q	K	R	7		P	R	A	V	-	N	R	G	-	-	-	
C*03:04	Q	K	R	8		P	R	T	V	-	N	R	G	E	L	-	
Case 2																	
163EW+s73TE	163	167				62	65	66	69	71	73	76	109	131	151	158	166
B*27:05 Immunizer	E	W				R	Q	I	A	T	T	E	L	S	R	A	E
Antibody producer																	
A*01:01	R	G		10		Q	R	N	-	S	-	A	F	R	H	V	D
<b>B*08:01</b>	<b>T</b>	<b>W</b>		<b>2</b>		-	-	-	<b>T</b>	-	-	-	-	<b>R</b>	-	-	-
C*07:01	T	W		6		-	-	N	R	A	A	V	-	R	-	-	-
Case 3																	
163LW+s65RQI	163	167				62	65	66	69	71	73	76	107	109	151	152	166
B*35:01 Immunizer	L	W				R	Q	I	T	T	T	E	G	L	R	V	E
Antibody producer																	
A*02:01	T	W		9		G	R	K	A	S	-	V	W	F	H	-	-
A*24:02	T	G		8		E	G	K	A	S	-	-	-	F	H	-	D
B*07:02	E	W		3		-	-	-	A	A	-	-	-	-	-	E	-
<b>B*40:01</b>	<b>E</b>	<b>W</b>		<b>0</b>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C*07:02	T	W		6		-	-	K	R	A	A	V	-	-	-	A	-
Case 4																	
144KR+s151H	142	144	145			73	76	79	80	82	83	127	131	138	149	151	
A*11:01 Immunizer	I	K	R			T	V	G	T	R	G	N	R	M	A	H	
Antibody producer																	
<b>A*02:01</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>H</b>	<b>1</b>		-	-	-	-	-	-	<b>K</b>	-	-	-	-	-
A*25:01	I	Q	R	6		-	E	R	I	L	R	-	-	-	T	-	-
B*18:01	I	Q	R	6		-	E	R	N	-	-	-	S	T	-	R	-
B*51:01	I	Q	R	8		-	E	R	I	L	R	-	S	T	-	R	-
C*12:03	I	Q	R	5		A	-	R	N	-	-	-	-	T	-	R	-
C*15:02	I	Q	R	4		-	-	R	K	-	-	-	-	T	-	R	-
Case 5																	
65QIA+s76ES	65	66	69			43	62	73	76	79	80	82	83	151	163		
B*55:01 Immunizer	Q	I	A			P	R	T	E	R	N	R	G	R	T		
Antibody producer																	
A*02:01	R	K	A	6		Q	G	-	V	G	T	-	-	H	-	-	-
A*25:01	R	N	A	6		Q	-	-	-	-	I	L	R	H	R	-	-
<b>B*18:01</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>0</b>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B*51:01	Q	I	T	4		-	-	-	-	-	I	L	R	-	L	-	-
C*12:03	Q	K	R	2		-	-	A	V	-	-	-	-	-	-	-	-
C*15:02	Q	N	R	2		-	-	-	V	-	K	-	-	-	-	-	-
Case 6																	
142MI+s79GT	138	142	145			73	76	79	80	82	83	127	131	144	151		
A*03:01 Immunizer	M	I	R			T	V	G	T	R	G	N	R	K	H		
Antibody producer																	
<b>A*02:01</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>H</b>	<b>1</b>		-	-	-	-	-	-	<b>K</b>	-	-	-	-	-
<b>A*68:01</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>H</b>	<b>1</b>		-	-	-	-	-	-	<b>K</b>	-	-	-	-	-
B*07:02	T	I	R	5		-	E	R	N	-	-	-	-	Q	R	-	-
B*27:05	T	I	R	7		-	E	R	-	L	R	-	S	Q	R	-	-
C*02:02	T	I	R	4		-	-	R	K	-	-	-	-	Q	R	-	-
C*07:02	T	I	R	5		A	-	R	N	-	-	-	-	Q	R	-	-

Tableau 9 : Différence des acides aminés sur les eplets entre celui responsable de l'immunisation et ceux du patient (Duquesnoy, 2012)

Il a confronté l'ensemble des résidus polymorphiques composant l'épitope de l'allèle à l'origine de l'immunisation avec les épitopes du patient. L'eplet immunisant n'est pas retrouvé parmi les eplets du patient receveur. Toutefois, il est à noter que l'épitope de l'allèle immunisant présente de très nombreux motifs en commun avec au moins un des épitopes du soi (Tableau 9). Plus l'épitope immunisant présente des motifs similaires avec l'épitope du soi, à l'exception du motif immunisant, plus la probabilité d'une liaison entre l'antigène et l'anticorps est probable (73). Les motifs d'acides aminés similaires semblent permettre un contact critique avec l'une des boucles du CDR-H3. Les patients, en présence d'un évènement immunisant, ont tendance à développer des anticorps spécifiques seulement contre un nombre limité d'épitopes incompatibles (47), le paradigme *nonself-self* peut éventuellement expliquer cet état de fait.

#### d. L'algorithme PIRCHE

Le rejet médié par anticorps nécessite l'interaction entre les lymphocytes B qui reconnaissent l'antigène HLA du greffon et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du receveur, qui eux, reconnaissent les peptides issus du HLA du donneur (présentation indirecte). Cette interaction permet ainsi la commutation du lymphocyte B en plasmocyte, sécréteur ici de DSA. Dans ce processus de formation d'anticorps anti-HLA, les lymphocytes B et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> répondent à différents épitopes qui sont situés sur la même molécule HLA, ce que l'on nomme « reconnaissance liée » (74). Cela signifie que le phénotype HLA de classe II du receveur détermine l'immunogénicité des antigènes HLA de classe I du donneur (44). Un algorithme a été créé : PIRCHE (*Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes*) avec pour objectif de déterminer le nombre de peptides HLA de classe I du donneur potentiellement présentables par les molécules HLA de classe II (PIRCHE-II) (75). Dans le cas d'une transplantation, une détermination du typage HLA du donneur et du receveur doit être réalisée en haute-résolution afin de déterminer le nombre de PIRCHE-II, ce qui reflète théoriquement le niveau d'allo-réactivité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Plus le nombre de PIRCHE-II est élevé, plus le risque d'allo-réactivité par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est important (76). Ce point ne sera pas développé davantage, l'objectif étant seulement de comprendre que l'immunogénicité des épitopes sur les antigènes HLA ne dépend pas seulement de la reconnaissance de ces derniers par les lymphocytes B.

## V. Perspectives d'application

### A. Appariement épitopique en transplantation rénale

#### a. Patients hyperimmunisés

##### i. Le programme « Hyperimmunisé Antigènes permis » (HAP)

En France, les patients en attente de transplantation rénale sont considérés comme éligibles à la priorité « hyperimmunisés » lorsqu'ils possèdent un taux de greffons incompatibles (TGI)  $\geq$  à 85%. Le TGI permet de calculer le pourcentage de donneurs isogroupe ABO contre lequel le patient est immunisé en se basant sur les spécificités HLA-A,-B,-DR et -DQ *bêta* interdites, saisies dans la base de données Cristal. Ces patients vont accéder à la transplantation grâce au programme HAP, mis en place en 2005, qui va leur permettre de bénéficier de la priorité nationale « hyperimmunisation ». En 2009, l'accès à ce programme est conditionné par le TGI et non plus sur le taux d'anticorps anti-HLA identifiés par la technique de lymphocytotoxicité (PRA  $\geq$  80%) (77). Pour accéder à ce programme HAP et y rester, indépendamment du TGI historique  $\geq$  85% donnant droit à la priorité nationale « hyperimmunisation », les patients doivent être inscrits sur la liste d'attente antigènes permis dans Cristal depuis plus de 18 mois et le dernier sérum analysé au laboratoire et saisi dans Cristal doit dater de moins de 105 jours. L'objectif de ce programme est d'accroître le nombre de propositions d'organe HLA compatible sans augmenter significativement le risque de rejet, notamment en définissant le concept d'antigènes permis (78). Les « antigènes permis » sont définis par la technique de *Single Antigen* et correspondent à l'ensemble des spécificités HLA « permises » situées en dessous du seuil  $\leq$  à 500 en terme de moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) dans les sérums récents et historiques d'un patient. Les antigènes permis doivent être saisis dans la base de données Cristal pour que le programme HAP soit fonctionnel. Il a permis d'augmenter de 11% la probabilité de transplantation en 2 ans chez les patients hyperimmunisés (77).

En terme de compatibilité HLA, les règles de répartition et d'attribution des greffons pour ces patients sont les suivantes (79) :

- Les incompatibilités HLA-A, -B, -DR, -DQ *bêta* doivent appartenir aux antigènes permis
- Pas plus de 4 incompatibilités HLA-A, -B, -DR, -DQ *bêta*
- Pas plus de 2 incompatibilités HLA-B et HLA-DR,
- Pas plus d'une incompatibilité HLA-DR

- Pas plus d'une incompatibilité HLA-DQ bêta

## ii. *Mise en application en clinique*

En se basant sur les règles imposées par l'Agence de Biomédecine dans le cadre du programme HAP, le raisonnement serait de déterminer la présence d'incompatibilités épitopiques en identifiant les eplets communs entre les antigènes du receveur et les antigènes permis du patient. L'objectif est de vérifier que les incompatibilités antigéniques parmi les antigènes permis ne possèdent pas d'incompatibilités épitopiques au niveau des eplets du receveur. Dans ce cas-là, ces antigènes permis peuvent être assimilés à des antigènes du soi, puisqu'ils ne présentent aucune incompatibilité épitopique avec les antigènes du receveur. Par conséquent, l'appariement épitopique entre le receveur et un donneur avec des incompatibilités permises sans incompatibilités épitopiques, peut considérablement limiter le risque d'immunisation contre le greffon et donc le risque de rejet.

## Méthodologie

Le typage HLA du receveur est réalisé avec une technique de séquençage NGS permettant d'obtenir une résolution allélique. Les sérums informatifs et historiques du patient sont analysés en *Single Antigen* Luminex afin de définir les spécificités HLA anticorps interdites contre lequel le receveur est immunisé et les spécificités HLA « permises » permettant de définir les antigènes permis qui sont saisies dans la base de données Cristal. L'appariement épitopique dans le cadre d'une transplantation d'un patient hyperimmunisé est analysé via le logiciel « *HLA Epitope Registry* » mis à disposition gratuitement sur internet qui utilise l'algorithme HLA Matchmaker (<https://www.epregistry.com.br/>). L'utilisation de ce logiciel nécessite la saisie du typage allélique du receveur et la saisie de chaque antigène permis en allèles afin de déterminer le nombre d'incompatibilités épitopiques. L'analyse est réalisée uniquement avec les eplets vérifiés. A partir de ces informations, le logiciel génère soit une liste d'eplets incompatibles entre le typage du patient et l'allèle d'intérêt correspondant à l'antigène permis saisi, soit aucune liste indiquant que les eplets de l'allèle d'intérêt de l'antigène permis sont partagés par les allèles du patient receveur indiquant que l'incompatibilité antigénique est compatible au niveau épitopique car les eplets sont présents sur le soi.

Cas clinique : La patiente hyperimmunisée est une femme âgée de 64 ans avec un TGI de 85% éligible à la priorité nationale « hyperimmunisation », inscrite sur la liste nationale d'attente depuis 1 an (Tableau 10).

<u>Typage</u>	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
<b>Biologie moléculaire (technique NGS)</b>	<b>A*24:03</b>	<b>A*31:01</b>	<b>B*40:01</b>	<b>B*49:01</b>	<b>C*03:04</b>	<b>C*07:01</b>
<i>Equivalent sérologique</i>	<i>A24</i>	<i>A31</i>	<i>B60</i>	<i>B49</i>	<i>Cw10</i>	<i>Cw7</i>

<u>Typage</u>	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
<b>Biologie moléculaire (technique NGS)</b>	<b>DRB1*04:04</b>	<b>DRB1*13:02</b>	<b>DQB1*03:02</b>	<b>DQB1*06:04</b>	<b>DPB1*10:01</b>	<b>DPB1*11:01</b>
			<b>DQA1*03:01</b>	<b>DQA1*01:02</b>		
<i>Equivalent sérologique</i>	<i>DR4</i>	<i>DR13</i>	<i>DQ8</i>	<i>DQ6</i>	<i>DP10</i>	<i>DP11</i>

Tableau 10 : Typage HLA de la patiente hyperimmunisée en résolution allélique.

Les équivalents sérologiques sont indiqués en italique

NATT	Inscrit le	Org att.	Equipe	Etat	Date état	----- Equipe	Grefe Date	-----	HLA donneur ou (N)Fag
									NFag : 88

### Immunologie

Groupe sanguin	A +	Mismatch: max A	2	max B	2	max DR	2	max A+B+DR	6
<b>HLA</b>									
	A	B	C	DR		DQB	DQA	DP	
	24 : 31	60 : 49	10 : 7	4 : 13		8 : 6	1 : 3	10 : 11	

### Anticorps

% IgG anti-Ly T ou totaux*	Taux d'anticorps anti-HLA Classe II
%	%
Taux de greffons incompatibles 85 %	Taux de greffons incompatibles historisé 85 %

### Données saisies par le laboratoire HLA

Spécificités des Anticorps Classe I

**A2 A23 A28 A68 A69 B12 B44 B45 B76 B82**

Spécificités des Anticorps Classe II

**DR2 DQ7 DR15 DR16**

Spécificités HLA de la zone grise (Antigènes ni interdits ni permis)

Antigènes permis (ATP)

**A3 A10 A19 A25 A26 A29 A30 A32 A33 A34 A36 A43 A66 A74 B5 B7 B8 B14 B16 B18 B21 B22 B35 B38 B39 B40 B41 B42 B46 B48 B50 B51 B52 B53 B54 B55 B56 B59 B61 B62 B63 B64 B65 B67 B70 B71 B72 B73 B75 B77 B78 B81 DR3 DR5 DR6 DR7 DR8 DQ1 DQ2 DQ4 DQ5 DQ9 DR11 DR12 DR14 DR17 DR18**

Commentaire

**Patient - Anti A\*24:02, DP1, DP3, DP2, DP4, DP15, DP18, DP19, DP20, DP23, DP28 - Réactivité(s) dissociée(s) DP6, DP13 - Auto réactivité(s) DP11**

Date dernière recherche Ac anti-HLA validée: **07/04/2021**

Antigènes interdits (saisis par l'équipe) (ATI)

**A1 A80 B57 B58 DR1 DR9 DR95**

### Données saisies par l'équipe clinique

Spécificités des Anticorps Classe I

**A2 A23 A28 A68 A69 B12 B44 B45 B76 B82**

Spécificités des Anticorps Classe II

**DR2 DQ7 DR15 DR16**

71

### *Détermination des incompatibilités antigéniques compatibles au niveau épitopique parmi les antigènes permis*

Pour la classe I, sur l'ensemble des antigènes permis testés (Figure 29), seuls 8 antigènes permis partagent l'ensemble de leurs eplets avec le receveur : HLA-A74, HLA-B64 (*Broad* : HLA-B14), HLA-B65 (*Broad* : HLA-B14), HLA-B61, HLA-B48, HLA-B50, HLA-B59, HLA-B61. Ces incompatibilités antigéniques ne sont donc théoriquement pas à risque d'immunisation.

Parmi les spécificités anticorps, le patient présente des anticorps anti-HLA-B\*15:12 (B76, la MFI historiquement la plus forte est à 5428). Parmi les antigènes permis du receveur, y figurent le HLA-B71 et le HLA-B72 qui appartiennent au B\*15 et correspondent respectivement à l'allèle HLA-B\*15:10 et HLA-B\*15:03. Ces 2 antigènes ne présentent pas d'eplets différents de celui du receveur. En revanche, ils présentent plusieurs eplets en commun avec le HLA-B76. En raison de la forte homologie avec les eplets du HLA-B71 et -B72, il est préférable de ne pas considérer ces deux antigènes permis comme des incompatibilités antigéniques compatibles au niveau épitopique.

Pour la classe II, tous les antigènes permis ont au moins 1 eplet différent de ceux du receveur. Par conséquent, aucune incompatibilité antigénique compatible au niveau épitopique n'existe en classe II.



*Proposition de rein :*

Pour cette patiente, un rein lui est proposé pour la transplantation : le typage HLA du donneur cadavérique réalisé par PCR SSP à révélation par courbe de fusion par technique Linkage (technique de typage pour les donneurs cadavériques réalisés en urgence) est le suivant (Tableau 11) :

<u>Typage</u>	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Biologie moléculaire (technique Linkage)	A*32	A*26	B*14	B*50	C*06	C*08
<i>Equivalent sérologique</i>	<u>A32</u>	<u>A26</u>	B64	B50	Cw6	Cw8

<u>Typage</u>	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
Biologie moléculaire (technique Linkage)	DRB1*03	DRB1*04	DQB1*02	DQB1*03	DPB1*10:01	DPB1*10:01
			DQA1*05	DQA1*03		
<i>Equivalent sérologique</i>	<u>DR17</u>	DR4	<u>DQ2</u>	DQ8	DP10	DP10

En vert : compatibilité antigénique avec le receveur - En noir, les antigènes du donneur ne correspondant pas à des spécificités d'anticorps – En souligné : les antigènes du donneur appartenant aux antigènes permis - En bleu : les antigènes du donneur appartenant aux antigènes permis ayant une compatibilité épitopique avec le receveur

**Tableau 11 : Typage HLA du donneur potentiel**

*Six incompatibilités antigéniques sur les loci HLA-A, -B, -DR, -DQ bêta. Les équivalents sérologiques sont indiqués en italique.*

D'après les règles de répartition pour les patients hyperimmunisés, le rein ne peut être proposé au patient car il présente plus de 4 incompatibilités en équivalents sérologiques sur les loci HLA-A, -B, -DR, -DQ bêta et plus de 2 incompatibilités sur les loci HLA-B et HLA-DR. Or, sur le locus HLA-B, le donneur est typé HLA-B64 qui partage l'ensemble de ces eplets avec le receveur. Si l'antigène HLA-B64 (ou HLA-B65) et l'antigène HLA-B50 étaient considérés comme des antigènes du soi, le nombre d'incompatibilités antigéniques passerait de 6 à 4. Ainsi, l'ensemble des règles de répartition serait respecté et l'organe pourrait être proposé au receveur.

En pratique, cette méthodologie d'appariement épitopique avec HLAMatchmaker ne peut pas être appliquée. En effet, l'appariement épitopique pour être réalisé correctement, nécessite la réalisation du typage du receveur et donneur avec une résolution allélique. A ce jour, le typage HLA en urgence d'un donneur cadavérique est réalisé avec une technique de typage de résolution intermédiaire qui ne permet pas rendre un résultat allélique mais uniquement un résultat en 2 digits avec possibilité d'avoir l'allèle le plus probable mais pas systématiquement. Actuellement, le typage allélique ne peut pas être effectué en urgence, il est réalisé à postériori.

De plus, l'utilisation de l'algorithme HLAMatchmaker demande du temps et une certaine expertise. Ces deux points sont des limites non négligeables à prendre en compte dans les situations d'urgence.

#### b. Transplantation donneurs vivants

L'application de l'appariement épitopique présente un fort intérêt dans la sélection du donneur dans le cadre d'une transplantation donneur vivant (TDV). En effet, dans le contexte d'une TDV, le typage des donneurs potentiels et le typage du receveur sont effectués avec des techniques de séquençage haute-résolution permettant d'obtenir une résolution allélique. L'utilisation de l'algorithme HLAMatchmaker va permettre la comparaison des eplets entre les allèles du patient et ceux des donneurs potentiels. L'objectif est de dénombrer les incompatibilités épitopiques entre le receveur et chaque donneur potentiel afin de sélectionner celui qui sera le plus compatible au niveau épitopique. La détermination du nombre d'incompatibilités épitopiques permettrait d'avoir une analyse plus fiable et plus pertinente du risque immunologique par rapport à la méthode plus classique basée sur le dénombrement des incompatibilités antigéniques.

#### Méthodologie :

Les typages HLA du receveur et des donneurs potentiels sont réalisés avec une technique de séquençage NGS permettant d'obtenir une résolution allélique. L'appariement épitopique dans le cadre d'une TDV est analysée avec l'outil « *Epitope matching* » du module « Matchmaker », qui utilise l'algorithme HLAMatchmaker, du logiciel HLA FUSION ® de One Lambda. L'analyse est réalisée uniquement avec les eplets vérifiés. A partir des typages du donneur et du receveur, le logiciel génère :

- Une liste d'eplets incompatibles pour chaque *locus*

- Le nombre d'éplets incompatibles pour chaque *locus*
- Le nombre d'éplets incompatibles unique pour chaque *locus* pouvant partager des éplets (ne comptabilise qu'une fois un éplet unique s'ils se trouvent sur plusieurs *loci*)
- La somme du nombre d'éplets incompatibles par *locus* pour une classe

## Cas cliniques

□ Cas clinique N°1 : la patiente TDV n°1 est une femme âgée de 33 ans. Sa sœur, son frère et sa mère sont les donneurs potentiels (Tableau 12 et 14).

Typage	HLA-A		HLA-B		HLA-Cw	
Receveur	A*26:01	A*69:01	B*18:01	B*38:01	C*12:03	C*12:03
Sœur	A*02:01	A*26:01	B*38:01	B*40:01	C*03:04	C*12:03
Mère	A*02:01	A*26:01	B*15:01	B*38:01	C*03:03	C*12:03
Frère	A*02:01	A*26:01	B*38:01	B*40:01	C*03:04	C*12:03

Incompatibilités alléliques en rouge

**Tableau 12 : Typages alléliques de classe I du receveur et des donneurs potentiels.**

*Chaque donneur présente 3 incompatibilités alléliques avec le receveur*

Donneur	Eplets incompatibles locus HLA-A	Nombre incompatibilités locus HLA-A	Eplets incompatibles locus HLA-B	Nombre incompatibilités locus HLA-B	Eplets incompatibles locus HLA-Cw	Nombre incompatibilités locus HLA-Cw	Nombre eplets unique incompatibles	Somme eplets incompatibles par locus
Sœur	43Q+62GER, 62GE, 62GK2	3	41T, 143S+76ESN, 163EW, 163EW+66I, 163EW+73TE, 180E	6	21H, 163LW, 173K, 219W	4	13	13
Mère	43Q+62GER, 62GE, 62GK2	3	44RMA, 163LW, 163LW+65QIT	3	21H, 163LW, 173K, 219W	4	9	10
Frère	43Q+62GER, 62GE, 62GK2	3	41T, 143S+76ESN, 163EW, 163EW+66I, 163EW+73TE, 180E	6	21H, 163LW, 173K, 219W	4	13	13

**Tableau 13 : Eplets incompatibles entre le receveur et les donneurs potentiels pour la classe I.**

*La mère a 9 incompatibilités épitopiques avec le receveur. Le frère et la sœur en ont 13 (Extraction Excel du module MatchMaker du logiciel HLA FUSION® de One Lambda)*

Pour le même nombre d'incompatibilités alléliques sur la classe I, la mère possède 4 incompatibilités épitopiques de moins que le frère et la sœur. Pour la classe I, la mère est le donneur avec le risque immunogène le plus faible (Tableau 13).

Typage	HLA-DRB1		HLA-DQ		HLA-DPB1	
Receveur	DRB1*11:04	DRB1*13:01	DQB1*03:01 DQA1*05:05	DQB1*06:03 DQA1*01:03	DPB1*14:01	DPB1*15:01
Sœur	DRB1*04:04	DRB1*09:01	DQB1*03:02 DQA1*03:01	DQB1*03:03 DQA1*03:02	DPB1*01:01	DPB1*04:02
Mère	DRB1*04:04	DRB1*13:01	DQB1*03:02 DQA1*03:01	DQB1*06:03 DQA1*01:03	DPB1*01:01	DPB1*14:01
Frère	DRB1*09:01	DRB1*13:01	DQB1*03:03 DQA1*03:02	DQB1*06:03 DQA1*01:03	DPB1*04:02	DPB1*14:01

Incompatibilités alléliques en rouge

**Tableau 14 : Typage allélique de classe II du receveur et des donneurs potentiels.**

*La sœur a 8 incompatibilités alléliques avec le receveur. La mère et le frère n'en ont que 4.*

Donneur	Eplets incompatibles locus HLA-DRB1	Nombre incompatibilités locus HLA-DRB1	Eplets incompatibles locus HLA-DPB1	Nombre incompatibilités locus HLA-DPB1	Eplets incompatibles locus HLA-DQ	Nombre incompatibilités locus HLA-DQ	Nombre eplets unique incompatibles	Somme eplets incompatibles par locus
Sœur	13FE, 28H, 57V, 70QT, 70R, 78V2, 96Y2, 98E, 104A, 181M	10	56EE	1	/	0	11	11
Mère	70QT, 96Y2, 98E, 104A	4	/	0	/	0	4	4
Frère	13FE, 28H, 57V, 70R, 78V2, 98E, 104A, 181M	8	56EE	1	/	0	9	9

**Tableau 15 : Eplets incompatibles entre le receveur et les donneurs potentiels pour la classe II.**

*La mère a 4 incompatibilités épitopiques avec le receveur. Le frère et la sœur en ont respectivement 9 et 11 (Extraction Excel du module MatchMaker du logiciel HLA FUSION® de One Lambda)*

Pour le même nombre d'incompatibilités alléliques entre la mère et le frère sur la classe II, la mère possède 5 incompatibilités épitopiques de moins (Tableau 15). Pour la classe II, la mère est le donneur avec le risque immunogène le plus faible.

En conclusion, en répertoriant le nombre d'incompatibilités épitopiques sur les deux classes, la sœur en possède 24, la mère en possède 13 et le frère 22. D'un point de vue de l'appariement épitopique, le risque immunogène est moins important si la mère est le donneur de rein.

## □ Cas clinique N°2

La patiente TDV n°2 est une femme âgée de 68 ans. Deux de ses fils et 3 de ses filles sont des donneurs potentiels (Tableau 16 et 18).

Typage	HLA-A		HLA-B		HLA-Cw	
Receveur	A*03:01	A*24:02	B*08:01	B*15:16	C*07:01	C*14:02
Fille 1	A*02:01	A*24:02	B*08:01	B*50:01	C*06:02	C*07:01
Fils 1	A*02:01	A*03:01	B*15:16	B*50:01	C*06:02	C*14:02
Fils 2	A*02:01	A*03:01	B*15:16	B*35:01	C*04:01	C*14:02
Fille 2	A*03:01	A*24:02	B*08:01	B*35:01	C*04:01	C*07:01
Fille 3	A*03:01	A*03:01	B*15:16	B*35:01	C*04:01	C*14:02

Incompatibilités alléliques en rouge

**Tableau 16 : Typages alléliques de classe I du receveur et des donneurs potentiels.**

*La fille 1, le fils 1 et le fils 2 ont 3 incompatibilités alléliques avec le receveur contre seulement 2 pour la fille 2 et la fille 3.*

Donneur	Eplets incompatibles locus HLA-A	Nombre incompatibilités locus HLA-A	Eplets incompatibles locus HLA-B	Nombre incompatibilités locus HLA-B	Eplets incompatibles locus HLA-Cw	Nombre incompatibilités locus HLA-Cw	Nombre eplets unique Incompatibles	Somme eplets incompatibles par locus
Fille 1	43Q+62GER, 62GE, 62GK2, 107W, 144TKH, 145KHA	6	41T, 163LW+65QIT	2	73AN, 80K, 80K+14R	3	11	11
Fils 1	43Q+62GER, 62GE, 62GK2, 107W, 144TKH, 145KHA	6	41T, 163LW+65QIT	2	73AN, 80K, 80K+14R	3	11	11
Fils 2	43Q+62GER, 62GE, 62GK2, 107W, 144TKH, 145KHA	6	44RT, 44RT+69TNT, 163LW+65QIT	3	73AN, 80K	2	11	11
Fille 2	/	0	44RT, 44RT+69TNT, 163LW+65QIT	3	73AN, 80K	2	5	5
Fille 3	/	0	44RT, 44RT+69TNT, 163LW+65QIT	3	73AN, 80K	2	5	5

**Tableau 17 : Eplets incompatibles entre le receveur et les donneurs potentiels pour la classe I.**

*La fille 1, le fils 1 et le fils 2 ont 11 incompatibilités épitopiques avec le receveur. La fille 2 et la fille 3 en ont 5 (Extraction Excel du module MatchMaker du logiciel HLA FUSION® de One Lambda)*

Pour la classe I, que ce soit d'un point de vue épitopique et allélique, la fille 2 et la fille 3 sont les donneurs avec le risque immunogène le plus faible (Tableau 16 et 17).

Typage	HLA-DRB1		HLA-DQ		HLA-DPB1	
Receveur	DRB1*03:01	DRB1*04:05	DQB1*02:01 DQA1*05:01	DQB1*03:02 DQA1*03:03	DPB1*04:01	DPB1*05:01
Fille 1	DRB1*03:01	DRB1*03:01	DQB1*02:01 DQA1*05:01	DQB1*02:01 DQA1*05:01	DPB1*04:01	DPB1*04:01
Fils 1	DRB1*03:01	DRB1*04:05	DQB1*02:01 DQA1*05:01	DQB1*03:02 DQA1*03:03	DPB1*04:01	DPB1*05:01
Fils 2	DRB1*04:05	DRB1*11:01	DQB1*03:01 DQA1*05:05	DQB1*03:02 DQA1*03:03	DPB1*04:01	DPB1*05:01
Fille 2	DRB1*03:01	DRB1*11:01	DQB1*02:01 DQA1*05:01	DQB1*03:01 DQA1*05:05	DPB1*04:01	DPB1*04:01
Fille 3	DRB1*04:05	DRB1*11:01	DQB1*03:01 DQA1*05:05	DQB1*03:02 DQA1*03:03	DPB1*04:01	DPB1*05:01

Incompatibilités alléliques en rouge

**Tableau 18 : Typages alléliques de classe II du receveur et des donneurs potentiels.**

*La fille 1 et le fils 1 n'ont aucune incompatibilité allélique avec le receveur. Le fils 2, la fille 2 et la fille 3 en ont 2.*

Donneur	Eplets incompatibles locus HLA-DRB1	Nombre incompatibilités locus HLA-DRB1	Eplets incompatibles locus HLA-DPB1	Nombre incompatibilités locus HLA-DPB1	Eplets incompatibles locus HLA-DQ	Nombre incompatibilités locus HLA-DQ	Nombre eplets unique incompatibles	Somme eplets incompatibles par locus
Fille 1	/	0	/	0	/	0	0	0
Fils 1	/	0	/	0	/	0	0	0
Fils 2	56EDR11, 56EEDR11, 57DE, 57DEDP, 70D, 70DA	6	/	0	45EV	1	7	7
Fille 2	56EDR11, 56EEDR11, 57DE, 57DEDP, 70D, 70DA	6	/	0	45EV	1	7	7
Fille 3	56EDR11, 56EEDR11, 57DE, 57DEDP, 70D, 70DA	6	/	0	45EV	1	7	7

**Tableau 19 : Eplets incompatibles entre le receveur et les donneurs potentiels pour la classe II.**

*La fille 1 et le fils 1 n'ont aucune incompatibilité épitopique avec le receveur. Le fils 2, la fille 2 et la fille 3 en ont 7  
(Extraction Excel du module MatchMaker du logiciel HLA FUSION® de One Lambda)*

Pour la classe II, la fille 1 et le fils 1 sont les donneurs avec le risque immunogène le plus faible (Tableau 19). En répertoriant le nombre d'incompatibilités épitopiques sur les deux classes, la fille 1 et le fils 1 en possède 11, le fils 2 en possède 18, la fille 2 et la fille 3 en possède 12. D'un point de vue de l'appariement épitopique, le risque immunogène est moins important si la fille 1 ou le fils 1 sont donneurs de rein, de par le nombre plus faible d'incompatibilités épitopiques au total mais aussi de par leur compatibilité optimale avec le receveur sur la classe II qui est considérée comme plus immunogène.

En conclusion, ces 2 cas cliniques montrent que l'utilisation de l'appariement épitopique en routine dans le cas d'une TDV est très adaptée grâce à la réalisation des typages alléliques des receveurs et des donneurs en haute-résolution. L'utilisation conjointe de cet outil avec le *crossmatch* virtuel et le *crossmatch* CMF, pour la mise en évidence de DSA préformés, permettraient de prévenir de manière beaucoup plus forte le risque de rejet.

## **B. Analyse épitopique dans le suivi de DSA**

Il est possible de pouvoir réaliser le suivi de DSA chez des patients greffés avec l'algorithme HLAMatchmaker. La réalisation des typages des donneurs et les receveurs avec une technique de séquençage de haute-résolution est indispensable pour pouvoir utiliser l'algorithme dans ce contexte. Grâce à l'analyse des épitopes de chacune des spécificités d'anticorps, et la précision d'interprétation qu'elle permet par rapport à l'analyse antigénique dite plus « conventionnelle », la précision dans la compréhension de l'imputabilité de l'immunisation est possible.

### Méthodologie proposée

Les typages HLA du receveur et du donneur sont réalisés avec une technique de séquençage NGS permettant d'obtenir une résolution allélique. Les sérums informatifs du patient sont analysés en *Single Antigen* Luminex.

Tout d'abord, il est important d'établir la compatibilité épitopique entre le receveur et le donneur avec l'outil « *Epitope matching* » du module « Matchmaker » qui utilise l'algorithme HLAMatchmaker, du logiciel HLA FUSION ® de One Lambda. L'analyse est réalisée uniquement avec les eplets vérifiés. L'objectif est de déterminer quelles sont les incompatibilités épitopiques entre le receveur et le donneur pour déterminer les potentiels eplets immunisants du donneur.

Ensuite, le suivi de DSA est réalisé avec l'outil « *Epitope analysis* » du module « Matchmaker », qui utilise l'algorithme HLAMatchmaker, du logiciel HLA FUSION ® de One Lambda. L'analyse est réalisée uniquement avec les eplets vérifiés. A partir des spécificités anticorps identifiées par technique Luminex chez le receveur, il est possible de rechercher la présence d'anticorps vis-à-vis des eplets potentiellement immunisants du donneur. A partir des typages alléliques du donneur et receveur et des spécificités mises en évidence en *Single Antigen*, l'outil propose 2 listes d'eplets : les eplets du donneur

potentiellement responsables de l'immunisation et les eplets potentiellement responsables de l'immunisation n'appartenant pas au donneur. Selon les critères définis par le laboratoire HLA de Tours en concertation avec le service de néphrologie, les eplets pour lesquels une spécificité d'anticorps vis-à-vis d'eux peut être affirmée (« eplet positif »), doit comporter au moins une des spécificités anticorps présentant l'eplet d'intérêt à une MFI supérieure à 1000 avec les autres spécificités portant aussi l'eplet avec une MFI au moins supérieure à 500.

### Cas Clinique

Un homme âgé de 63 ans a bénéficié d'une transplantation rénale le 20 janvier 2019 sans aucun autre événement immunisant connu (Tableau 20). Les sérums pré-transplantation ne montrent pas d'anticorps vis-à-vis des antigènes HLA. Le patient est transplantectomisé le 12 octobre 2019. Les sérums étudiés sont un sérum prélevé à J+4 de la transplantectomie et un autre à M+4.

<b><u>Typage</u></b>	<b>HLA-A</b>		<b>HLA-B</b>		<b>HLA-Cw</b>	
<b>Receveur</b>	<b>A*26:01</b>	<b>A*26:01</b>	<b>B*27:02</b>	<b>B*38:01</b>	<b>C*02:02</b>	<b>C*12:03</b>
<b>Donneur</b>	<b>A*01:01</b>	<b>A*32:01</b>	<b>B*49:01</b>	<b>B*49:01</b>	<b>C*02:02</b>	<b>C*07:01</b>

Incompatibilités alléliques en rouge

**Tableau 20 : Typages HLA alléliques du patient et de son donneur.**

*Quatre incompatibilités au niveau des loci de classe I sont dénombrés.*

Eplets incompatibles locus HLA-A	Nombre incompatibilités locus HLA-A	Eplets incompatibles locus HLA-B	Nombre incompatibilités locus HLA-B	Eplets incompatibles locus HLA-Cw	Nombre incompatibilités locus HLA-Cw	Nombre eplets unique incompatibles	Somme eplets incompatibles par locus
44KM3, 62QE+56G, 76ESI, 82LR+138M, 144K, 144KR, 144KR+151H, 163RG, 166DG	9	41T, 163LW, 163LW+65QIT	3	193PL3, 267QE	2	14	14

**Tableau 21 : Liste des eplets incompatibles entre le receveur et le donneur en rouge pour la classe I (Extraction Excel du module MatchMaker du logiciel HLA FUSION ® de One Lambda)**

L'étude de la compatibilité épitopique entre le receveur et le donneur permet de répertorier la liste des eplets donneurs potentiellement immunisants (Tableau 21). Le patient possède 14 incompatibilités épitopiques sur l'ensemble des loci de classe I. A partir cette liste d'eplets donneurs, il est possible de faire un suivi de DSA et plus précisément des anticorps



anti-eplets du donneur potentiellement immunisants en les identifiant parmi les anticorps anti-HLA identifiés en *Single Antigen* (Tableau 22).

Allele	MFI	Cutoff positivité	Eplet positif présent chez le donneur	Eplet positif absent chez le donneur
<b>A*01:01</b>	16397	500	44KM3, 62QE+56G, 144KR, 144KR+151H,	
B*15:12	13264		166DG	163LS/G
B*45:01	11718			163LS/G
B*44:03	10694			163LS/G
A*24:02	10291		144KR, 144KR+151H, 166DG	62EE, 65GK, 144KR+127K
B*44:02	9295			163LS/G
A*23:01	8546		166DG	62EE, 65GK
A*11:02	8225		62QE+56G, 144KR, 144KR+151H	151AHA
A*36:01	7687		44KM3, 62QE+56G, 144KR, 144KR+151H	
<b>B*49:01</b>	5538		163LW,	
<b>A*32:01</b>	5302		62QE+56G	
A*11:01	5259		62QE+56G, 144KR, 144KR+151H	151AHA
B*50:01	5020		163LW,	
A*80:01	3825		144KR, 166DG	62EE
B*56:01	3453		163LW	
B*15:10	3359		163LW, 163LW+65QIT	
B*51:02	3319		163LW, 163LW+65QIT	
B*15:01	3312		163LW, 163LW+65QIT	
B*82:01	3052			163LS/G
B*52:01	2849		163LW, 163LW+65QIT	
B*15:16	2617		163LW	71SA
B*35:01	2514		163LW, 163LW+65QIT	
B*53:01	2439		163LW, 163LW+65QIT	
A*24:03	2373		144KR, 144KR+151H	62EE, 65GK, 144KR+127K
B*15:03	2307		163LW, 163LW+65QIT	
B*46:01	1874		163LW	
A*03:01	1785		62QE+56G, 144KR, 144KR+151H	161D
A*74:01	1763		62QE+56G	
B*15:13	1704		163LW, 163LW+65QIT	
B*51:01	1611		163LW, 163LW+65QIT	
B*15:02	1589		163LW, 163LW+65QIT	
C*03:02	1470		163LW	173K
B*78:01	1350		163LW, 163LW+65QIT	
B*15:11	1175		163LW, 163LW+65QIT	
Cut off MFI 1000				

Cut off MFI 1000				
C*03:03	968	500	163LW	173K
B*73:01	851			
B*57:03	776		163LW	62GRN, 71SA
A*30:02	769			76EG
B*58:01	748		163LW	62GRN, 71SA
C*03:04	711		163LW	173K
A*68:02	633			
A*31:01	600			
B*57:01	534		163LW	62GRN, 71SA

Tableau 22 : Spécificités HLA pour lequel le patient a développé des anticorps à J+4 post-transplantectomie.

*Les allèles en rouge et en gras appartiennent au donneur. Les eplets en rouge sont les eplets potentiellement immunisants du donneur. Les eplets en bleu sont les eplets immunisants absents chez le donneur (Extraction Excel du module MatchMaker du logiciel HLA FUSION ® de One Lambda)*

Sur le sérum à J+4 de la transplantectomie, d'un point de vue allélique, le patient a développé 3 DSA (anticorps anti-HLA-A\*01:01, anti-HLA-A\*32:01, anti-HLA-B\*49:01) mais aussi de nombreux autres anticorps anti-HLA. Or, d'un point de vue épitopique, le patient a développé des anticorps contre 7 eplets sur les 14 incompatibilités épitopiques provenant du donneur : 44KM3, 144KR, 144KR+151H et 166DG (eplets présents sur le HLA-A\*01:01), 62QE+56G (eplet présents sur le HLA-A\*32:01), puis, 163LW et 163LW+65QIT (eplets présents sur le HLA-B\*49:01). Il est à noter qu'une spécificité d'anticorps vis-à-vis d'un eplet ne s'explique pas par la transplantation : le 163LS/G.

Allele	MFI	Cutoff positivité	Eplet positif présent chez le donneur	Eplet positif absent chez le donneur
<b>B*49:01</b>	21715	500	41T, 163LW, 163LW+65QIT	
A*23:01	20961		82LR+138M, 166DG	62EE, 65GK, 127K
A*36:01	20635		44KM3, 62QE+56G, 144K, 144KR, 144KR+151H	
B*44:03	20388		41T	163LS/G
<b>A*01:01</b>	20384		44KM3, 62QE+56G, 144K, 144KR, 144KR+151H, 163RG, 166DG	
A*24:02	20226		82LR+138M, 144K, 144KR, 144KR+151H, 166DG	62EE, 65GK, 127K, 144KR+127K, 150AAH
B*15:12	20186		166DG	44RMA, 163LS/G
A*03:01	20175		62QE+56G, 144K, 144KR, 144KR+151H	150AAH, 161D
B*50:01	20154		41T, 163LW, 163LW+65QIT	
A*11:02	20055		62QE+56G, 144K, 144KR, 144KR+151H	150AAH, 151AHA
B*45:01	19888		41T	156DA, 163LS/G
B*44:02	19619		41T	156DA, 163LS/G
<b>A*32:01</b>	19448		62QE+56G, 76ESI, 82LR+138M	
A*11:01	19422		62QE+56G, 144K, 144KR, 144KR+151H	150AAH, 151AHA
A*02:01	19411		144K	43Q+62GER, 62GE, 62GK2, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA,
A*80:01	19304		144K, 144KR,	62EE
B*51:01	19128		163LW,	44RT, 44RT+69TNT
B*15:01	19004		163LW,	44RMA
B*51:02	18620		163LW, 163LW+65QIT	44RT, 44RT+69TNT
A*24:03	18597		82LR+138M, 144K, 144KR, 144KR+151H	62EE, 65GK, 127K, 144KR+127K, 150AAH
B*15:10	18549		163LW,	
A*74:01	18457		62QE+56G	
B*82:01	18221			156DA, 163LS/G
B*15:03	18129		163LW,	
B*56:01	18045		163LW	
B*15:02	17829		163LW, 163LW+65QIT	44RMA
B*15:16	17753		163LW	44RMA, 71SA
A*02:03	17738		144K	43Q+62GER, 62GE, 62GK2, 107W, 127K, 144TKH
B*13:02	17598		41T	44RMA, 144QL
B*15:13	17391		163LW, 163LW+65QIT	44RMA
A*02:06	17293		144K	43Q+62GER, 62GE, 62GK2, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA,
B*35:01	17251		163LW,	44RT, 44RT+69TNT
B*41:01	17148		41T	156DA
B*40:02	16727		41T	

B*52:01	16700	500	163LW,	44RT, 44RT+69TNT
B*46:01	16471		163LW	44RMA
B*53:01	15914		163LW,	44RT, 44RT+69TNT
A*68:01	15713		144K	127K, 144TKH, 145KHA, 150AAH
B*40:01	15266		41T	
B*57:03	15245		163LW	44RMA, 62GE, 62GRN, 71SA
B*13:01	15065		41T	44RMA, 144QL
B*78:01	15004		163LW, 163LW+65QIT	44RT, 44RT+69TNT
B*15:11	14573		163LW, 163LW+65QIT	44RMA
B*58:01	14568		163LW	44RT, 62GE, 62GRN, 71SA
A*68:02	14507		144K	127K, 144TKH, 145KHA, 150AAH
A*30:02	14257			56R, 76EG
B*40:06	13798		41T	
A*31:01	13597			56R
A*69:01	13528		144K	107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 150AAH
B*57:01	12971		163LW	44RMA, 62GE, 62GRN, 71SA
A*30:01	12638			56R
B*47:01	11321		41T	
C*03:02	10992		163LW	173K
C*03:03	10369		163LW	173K
A*29:01	9341			62LQ
C*03:04	8266		163LW	173K
B*55:01	7734			
A*29:02	7479			62LQ
B*14:01	6594			
A*25:01	3289		76ESI, 82LR+138M	
B*14:02	2928			
B*73:01	2568		267QE	
B*18:01	2405			44RT, 44RT+69TNT
B*42:01	2379			156DA
B*59:01	1906			66IF+163TEW
C*07:02	1865		193PL3, 267QE	
A*43:01	1761			62LQ
B*54:01	1708			
A*33:01	1444			
A*33:03	1108			

Cut off MFI 1000

Cut off MFI 1000				
C*15:02	932	500		44RT, 44RT+69TNT, 156DA
B*37:01	693			66IF+163TEW, 156DA
B*08:01	655			
B*48:01	645			
B*27:08	517			

Tableau 23 : Spécificités HLA pour lequel le patient a développé des anticorps à M+4 post-transplantectomie.

Les allèles en rouge et en gras appartiennent au donneur. Les eplets en rouge sont les eplets potentiellement immunisants du donneur. Les eplets en bleu sont les eplets immunisants absents chez le donneur (Extraction Excel du module MatchMaker du logiciel HLA FUSION © de One Lambda)

Sur le sérum à M+4 de la transplantectomie, d'un point de vue allélique, les 3 DSA mis en évidence à J+4 de la transplantectomie (anticorps anti-HLA-A\*01:01, anti-HLA-A\*32:01, anti-HLA-B\*49:01) persistent ainsi que de nombreux autres anticorps anti-HLA. Mais, d'un point de vue épitopique, le patient a développé de nombreux autres anticorps dirigés contre des eplets du donneur (Tableau 23). En effet, à J+4 il possédait des anticorps dirigés contre 7 eplets sur les 14 incompatibilités. A M+4, il possède dorénavant des anticorps contre les 14 eplets incompatibles. Il est important de noter que plusieurs anticorps ne sont pas dirigés contre les eplets du donneur. Cela peut s'expliquer par la transfusion de 3 culots globulaires à M+1 post-transplantectomie.

## Discussion

Le suivi de DSA à partir de l'étude des anticorps anti-eplets du donneur est particulièrement intéressant pour bien appréhender l'immunisation post-transplantation des patients greffés. Comme démontré sur ce cas, le patient possède 3 DSA dirigés contre les allèles du donneur à J+4 tout comme à M+4. En revanche, d'un point de vue épitopique, il est constaté que l'immunisation vis-à-vis du donneur a évolué de manière très importante avec un nombre d'anticorps dirigés contre les eplets du donneur qui a fortement augmenté.

Cet outil posséderait un intérêt non négligeable pour la prise en charge clinique des patients. En effet, l'évolution de l'immunisation vis-à-vis du greffon par l'analyse des cibles des anticorps semble imperceptible avec un raisonnement conventionnel et un nombre de DSA stables dans le temps alors que celle-ci peut varier de manière importante avec l'étude des eplets. Cet outil pourrait permettre ainsi d'adapter les posologies d'immunosuppresseurs et faire un suivi particulièrement précis de l'efficacité des traitements mis en place.

De plus, l'outil est pertinent dans l'étude de la « force » du DSA. En effet, lors de la mise en évidence ou du suivi d'un DSA, celui-ci est toujours rapporté à sa MFI afin d'étudier son évolution notamment lors des protocoles de désensibilisation. Or, si nous prenons l'exemple du DSA dirigé contre l'allèle du donneur HLA-A\*32:01 sur le sérum à M+4, il possède une MFI à 19448. L'eplet responsable de l'immunisation vis-à-vis de cet allèle est, entre autres, le 62QE+56G se trouvant sur d'autres antigènes possédant des spécificités d'anticorps avec des MFI plus hautes comme l'anticorps dirigé contre le HLA-A\*36:01 avec une MFI à 20635. En considérant la MFI la plus haute comme étant le reflet de la « force » du DSA, celle-ci peut être mal estimée avec un raisonnement conventionnel en particulier pour les DSA dits « de faibles réactivités » (MFI comprise entre 500 et 1000) pour lesquels l'eplet responsable de l'immunisation peut se trouver à des MFI beaucoup plus fortes.

En conclusion, l'outil proposé possède une pertinence non négligeable dans la compréhension de l'immunisation des patients mais surtout un intérêt très fort dans la prévention du rejet.

## **VI. Conclusion**

L'appariement épitopique est un outil intéressant qui peut être utilisé dans la prévention et la prise en charge de l'immunisation des patients transplantés. En effet, la détermination de la charge épitopique est plus précise sur la compatibilité entre un receveur et son donneur que l'appariement antigénique. De même, l'utilisation de cet outil dans le suivi de DSA permet une analyse plus fine des anticorps et de leurs cibles. L'utilisation de l'appariement épitopique peut être réalisée à condition que les typages HLA du receveur et du donneur soient réalisés en haute résolution permettant d'obtenir une résolution allélique. Dans le cadre des transplantations avec donneurs cadavériques, le typage du donneur réalisé en urgence ne permet pas d'obtenir une résolution suffisante pour utiliser cet outil dans l'attribution de l'organe. Il peut par contre être utilisé de manière rétrospective après la transplantation afin de déterminer la charge épitopique et d'évaluer le risque d'immunisation. Pour les transplantations avec donneurs vivants, le typage étant réalisé avec des techniques de séquençage de haute résolution, la détermination de la charge épitopique est un outil de choix à ajouter aux différentes techniques de *crossmatch* afin de trouver le donneur le plus adéquat. A l'heure actuelle, il est intéressant de développer cet outil et d'évaluer sa valeur ajoutée en routine que ce soit pour l'évaluation de la charge épitopique mais aussi dans le suivi d'immunisation.

## Références bibliographiques

1. Agence de Biomédecine. Rapport d'activité Greffe rénale 2020. 2020 mars p. 81.
2. Bariéty M. Courty CH. Histoire de la Médecine. Librairie Arthème Fayard. 1963. 401-468 p.
3. Ménard S. An Unknown Renaissance Portrait of Tagliacozzi (1545–1599), the Founder of Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 4 janv 2019;7(1):e2006.
4. Gnudi MT, Webster JP. The life and times of Gaspare Tagliacozzi. New York: H. Reichner; 1950. 538 p.
5. Pasche P. Principes de la reconstruction des pertes de substance nasale. *Rev Med Suisse*. 2007;
6. Montandon D. Jaques Reverdin. La première greffe de peau. Edilivre. Saint-Denis, France; 2014.
7. Hirschberg T.v. Haugwitz. History of ophthalmology. Vol. 11. 1991.
8. Debongnie J. Alexis Carrel : une étoile aux talents multiples, nobélisée, une fin en trou noir éthique. AMA. 2019;
9. Carrel A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. Lyon, France; 1902. (Lyon médical : Gazette médicale et Journal de médecine réunis).
10. Laios K, Bontinis V, Bontinis A, Mavrommatis E, Lytsikas-Sarlis P, Tsoucalas G, et al. Mathieu Jaboulay (1860-1913) and His Innovations in Vascular and General Surgery. *Surg Innov*. 1 févr 2020;27(1):120-3.
11. Hausmann H. Ernst Unger (1875-1938), a pioneer in kidney transplantation. On the 50th anniversary of the death of the Berlin surgeon. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 1988;82(17):843-5.
12. Matevossian E, Kern H, Hüser N, Doll D, Snopok Y, Nährig J, et al. Surgeon Yurii Voronoy (1895–1961) – a pioneer in the history of clinical transplantation: in Memoriam at the 75th Anniversary of the First Human Kidney Transplantation. *Transpl Int*. 2009;22(12):1132-9.
13. Starzl TE. Peter Brian Medawar. *J Am Coll Surg*. mars 1995;180(3):332-6.
14. McAlister VC. Clinical kidney transplantation: a 50th anniversary review of the first reported series. *Am J Surg*. sept 2005;190(3):485-8.
15. Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation in the human : report of nine cases. *J Clin Invest*. févr 1955;34(2):327-82.
16. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens*. août 2009;74(2):101-16.
17. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*. oct 1958;20(1-4):156-66.
18. Carosella ED. La découverte du système HLA par le Professeur Jean DAUSSET, Prix Nobel de Médecine. *Hist Sci Évolution Discip Hist Découv*. avr 2015;
19. Rood JJV, Leeuwen AV. Leukocyte Grouping. A method and its application. *J Clin Invest*. sept 1963;42(9):1382-90.
20. Terasaki PI, Vredevoe DL, Porter KA, Mickey MR, Marchioro TL, Faris TD, et al. Serotyping for homotransplantation. V. Evaluation of a matching scheme. *Transplantation*. nov 1966;4(6):688-99.

21. Terasaki PI, Vredevoe DL, Mickey MR, Porter KA, Marchioro TL, Faris TD, et al. Serotyping for homotransplantation. VII. Selection of kidney donors for thirty-two recipients. *Ann N Y Acad Sci.* 1 déc 1966;129:500-20.
22. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. 1999;167:193.
23. Cesbron-Gauthier A, Gagne K, Retière C, Devys A, Bignon J-D. Système HLA. *EMC Hématologie.* 2007;
24. Delbos F, Malard S, Congy N. Le système HLA : génétique, structure et fonctions. *Courr Transplant.* déc 2018;18(3-4).
25. Moalic V. Comment est réalisé un typage HLA ? *Réanimation.* 1 juin 2008;17(4):407-11.
26. Elsermans V, Guidicelli LG, Walencik A. Les méthodes de typage HLA. *Courr Transplant.* déc 2018;18(3-4).
27. Cai J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol.* avr 2005;66(4):334-42.
28. Port FK, Dykstra DM, Merion RM, Wolfe RA. Organ donation and transplantation trends in the USA, 2003. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2004;4 Suppl 9:7-12.
29. Baron C, Blanche G, Bittencourt M de C, Labalette M, Moins-Teisserenc H, Sterkers G, et al. Mécanismes de l'alloréactivité, des rejets de greffe et la réaction du greffon contre l'hôte. In: *Immunologie fondamentale et immunopathologie. Collège des Enseignants d'Immunologie.* 2013. p. 172-5. (Elsevier Masson).
30. Jeong HJ. Diagnosis of renal transplant rejection : Banff classification and beyond. *Kidney Res Clin Pract.* 31 mars 2020;39(1):17-31.
31. Chatenoud L, Bach J-F. *Immunologie. Médecine Science Publications.* 2012. (De la biologie à la clinique).
32. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* mars 2010;10(3):464-71.
33. Justiz Vaillant AA, Mohseni M. Chronic Transplantation Rejection. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.*
34. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol JASN.* avr 2007;18(4):1046-56.
35. Smith RN, Kawai T, Boskovic S, Nadazdin O, Sachs DH, Cosimi AB, et al. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in Cynomolgus monkeys. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* août 2008;8(8):1662-72.
36. Agence de Biomédecine. *Guide du Score Rein.* 2020.
37. Moalic-Allain V. Pièges de l'interprétation des anticorps anti-HLA par technologie Luminex™. *Ann Biol Clin (Paris).* 1 mars 2014;72(2):178-84.
38. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FHJ, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation.* 15 janv 2013;95(1):19-47.



39. Jollet I, Aarninck A, Visentin J. Limites des méthodes de recherche des anticorps anti-HLA par technique Luminex® “Single Antigen”. *Courr Transplant.* déc 2018;18(3-4).
40. Kheav VD, Labalette M, Filloux M, Guillaume N. Anticorps anti-HLA : méthodes cellulaires et crossmatch. *Courr Transplant.* déc 2018;18(3-4).
41. Rouzaire P. Les interactions antigène-anticorps et leurs applications pratiques. 2013.
42. Jaspard E. Les immunoglobulines et la recombinaison V(D)J. 2014.
43. Kramer CSM, Roelen DL, Heidt S, Claas FHJ. Defining the immunogenicity and antigenicity of HLA epitopes is crucial for optimal epitope matching in clinical renal transplantation. *HLA.* juill 2017;90(1):5-16.
44. Delion A. Impact de la compatibilité HLA épitopique et physico-chimique sur la survenue d’anticorps spécifique du donneur en transplantation rénale à bas risque immunologique. Université de Lorraine; 2017.
45. Sinha N, Mohan S, Lipschultz CA, Smith-Gill SJ. Differences in electrostatic properties at antibody–antigen binding sites: implications for specificity and cross-reactivity. *Biophys J.* 83(6):2946–2968 2002;
46. Ducreux S, Celton J-L, Taupin J-L. Les enjeux actuels : explorer mieux le HLA et aborder le monde du “non-HLA”. *Courr Transplant.* déc 2018;18(3-4).
47. Duquesnoy RJ, White LT, Fierst JW, Vanek M, Banner BF, Iwaki Y, et al. Multiscreen serum analysis of highly sensitized renal dialysis patients for antibodies toward public and private class I HLA determinants. Implications for computer-predicted acceptable and unacceptable donor mismatches in kidney transplantation. *Transplantation.* sept 1990;50(3):427-37.
48. Colombani J. HLA. Le complexe majeur de présentation et d’histocompatibilité humain. 1993.
49. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker : a molecularly based donor selection algorithm for highly alloimmunized patients. *Transplant Proc.* mars 2001;33(1-2):493-7.
50. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol.* mai 2002;63(5):339-52.
51. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* oct 1987;329(6139):506-12.
52. Duquesnoy RJ, Witvliet M, Doxiadis IIN, Fijter H de, Claas FHJ. HLAMatchmaker-based strategy to identify acceptable HLA class I mismatches for highly sensitized kidney transplant candidates. *Transpl Int.* 2004;17(1):22-30.
53. Claas FHJ, Doxiadis IiIN. Human leukocyte antigen antibody detection and kidney allocation within Eurotransplant. *Hum Immunol.* 1 août 2009;70(8):636-9.
54. Zoet YM, Eijssink C, Kardol MJ, Franke-van Dijk MEI, Wilson GL, de Paus R, et al. The single antigen expressing lines (SALs) concept: an excellent tool for screening for HLA-specific antibodies. *Hum Immunol.* mai 2005;66(5):519-25.
55. Duquesnoy RJ, Takemoto S, de Lange P, Doxiadis IIN, Schreuder GMT, Persijn GG, et al. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival. *Transplantation.* 27 mars 2003;75(6):884-9.
56. Dankers MKA, Witvliet MD, Roelen DL, de Lange P, Korfage N, Persijn GG, et al. The number of amino acid triplet differences between patient and donor is predictive for the

- antibody reactivity against mismatched human leukocyte antigens. *Transplantation*. 27 avr 2004;77(8):1236-9.
57. Laux G, Mytilineos J, Opelz G. Critical evaluation of the amino acid triplet-epitope matching concept in cadaver kidney transplantation. *Transplantation*. 27 mars 2004;77(6):902-7.
  58. Duquesnoy RJ, Mulder A, Askar M, Fernandez-Vina M, Claas FHI. HLAMatchmaker-based analysis of human monoclonal antibody reactivity demonstrates the importance of an additional contact site for specific recognition of triplet-defined epitopes. *Hum Immunol*. juill 2005;66(7):749-61.
  59. Duquesnoy RJ. A Structurally Based Approach to Determine HLA Compatibility at the Humoral Immune Level. *Hum Immunol*. nov 2006;67(11):847-62.
  60. 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*. janv 2007;68(1):12-25.
  61. Marrari M, Conca R, Praticò-Barbato L, Amoroso A, Duquesnoy RJ. Brief report : Why did two patients who type for HLA-B13 have antibodies that react with all Bw4 antigens except HLA-B13? *Transpl Immunol*. déc 2011;25(4):217-20.
  62. Duquesnoy RJ, Marrari M. Correlations between Terasaki's HLA class I epitopes and HLAMatchmaker-defined eplets on HLA-A, -B and -C antigens. *Tissue Antigens*. 2009;74(2):117-33.
  63. El-Awar N, Lee J-H, Tarsitani C, Terasaki PI. HLA Class I Epitopes: Recognition of Binding Sites by mAbs or Eluted Alloantibody Confirmed With Single Recombinant Antigens. *Hum Immunol*. 1 mars 2007;68(3):170-80.
  64. Cai J, Kohanof S, Terasaki PI. HLA-DR antibody epitopes. *Clin Transpl*. 2006;103-14.
  65. Benseffaj N, Ouadghiri S, Bourhanbour AD, Zerrouki AN, Essakalli M. Cytotoxicity of natural anti-HLA antibodies in Moroccan patients awaiting for kidney transplantation. *Nephrol Ther*. févr 2017;13(1):26-9.
  66. Snanoudj R. Le système HLA en transplantation. 2016.
  67. Duquesnoy RJ. Clinical usefulness of HLAMatchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation. *Curr Opin Immunol*. oct 2008;20(5):594-601.
  68. Wiebe C, Pochinco D, Blydt-Hansen TD, Ho J, Birk PE, Karpinski M, et al. Class II HLA Epitope Matching - A Strategy to Minimize De Novo Donor-Specific Antibody Development and Improve Outcomes. *Am J Transplant*. 2013;13(12):3114-22.
  69. Wiebe C, Nevins TE, Robiner WN, Thomas W, Matas AJ, Nickerson PW. The Synergistic Effect of Class II HLA Epitope-Mismatch and Nonadherence on Acute Rejection and Graft Survival. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. août 2015;15(8):2197-202.
  70. Sullivan PM, Warner P, Kemna MS, Albers EL, Law SP, Weiss NS, et al. HLA molecular epitope mismatching and long-term graft loss in pediatric heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. juill 2015;34(7):950-7.
  71. Silva E, Alba A, Castro A, Carrascal M, Buckel E, Aguiló J, et al. Evaluation of HLA Matchmaker compatibility as predictor of graft survival and presence of Anti-HLA antibodies. *Transplant Proc*. févr 2010;42(1):266-9.

72. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*. 5 sept 2003;301(5638):1374-7.
73. Duquesnoy RJ. The antibody response to an HLA mismatch: a model for nonself-self discrimination in relation to HLA epitope immunogenicity. *Int J Immunogenet*. févr 2012;39(1):1-9.
74. Mitchison NA. T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol*. avr 2004;4(4):308-12.
75. Geneugelijk K, Hönger G, Deutekom HWM van, Thus KA, Keşmir C, Hösli I, et al. Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes Presented by HLA-DRB1 Are Related to HLA Antibody Formation During Pregnancy. *Am J Transplant*. 2015;15(12):3112-22.
76. Geneugelijk K, Spierings E. PIRCHE-II: an algorithm to predict indirectly recognizable HLA epitopes in solid organ transplantation. *Immunogenetics*. févr 2020;72(1-2):119-29.
77. Antoine C. Accès à la greffe pour les malades hyperimmunisés. *Courr Transplant*. juin 2012;12(2).
78. Antoine C. Histocompatibilité et modalités d'accès à la greffe d'organe. *Courr Transplant*. déc 2018;18(3-4).
79. Agence de Biomédecine. Procédures d'application des règles de répartition et d'attribution des greffons prélevés sur personne décédée. 1996.

## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) MOREL Thomas .....

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : 21809595

N° Thèse : 80

Nom et Prénom : MOREL Thomas

Sujet : ...Appariement en transplantation d'organes : vers la compatibilité épitopique ?

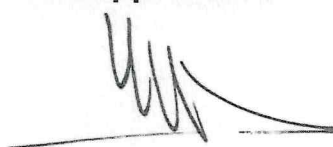
Tours, le : 30/09/2021

Les Directeurs de Thèse :

Dr Barbara Proust



Pr Philippe Gatault



Vu et  
Transmis :  
Le Doyen



MOREL Thomas  
N°80

Appariement en transplantation d'organes : vers la compatibilité  
épitopique ?

## RÉSUMÉ DE LA THÈSE

LA TRANSPLANTATION RENALE S'EST PARTICULIÈREMENT DÉVELOPÉE DEPUIS LE DÉBUT DU XXÈME SIÈCLE. ELLE EST LA THÉRAPIE PAR EXCELLENCE DE L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE. L'UN DES ENJEUX AUX TRANSPLANTATIONS EST LA PRÉVENTION DU REJET IMMUNOLOGIQUE. AUJOURD'HUI, CETTE PRÉVENTION EST PERMISE DANS UN PREMIER TEMPS GRÂCE À LA RÉPARTITION DES ORGANES TRANSPLANTÉS SELON DES RÈGLES DE COMPATIBILITÉ ANTIGÉNIQUE HLA ENTRE UN DONNEUR ET SON RECEVEUR, PUIS DANS UN SECOND TEMPS PAR L'UTILISATION DE TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS.

L'ÉVOLUTION DES TECHNIQUES DE SÉQUENÇAGE PERMETTENT DORENAVANT DE DÉTERMINER LES TYPAGES HLA EN HAUTE-RÉSOLUTION. GRÂCE À CELA, L'ALLELE CODANT POUR L'ANTIGÈNE HLA PEUT ÊTRE ÉTABLI AINSI QUE LA CHAÎNE D'ÉPITOPE COMPOSANT L'ANTIGÈNE. L'OBJECTIF DE CE TRAVAIL EST D'ÉVALUER L'INTÉRÊT DU RAISONNEMENT DE LA COMPATIBILITÉ ÉPITOPIQUE PAR RAPPORT AU RAISONNEMENT HISTORIQUE DE LA COMPATIBILITÉ ANTIGÉNIQUE ET PAR LA MÊME OCCASION METTRE EN ÉVIDENCE DE NOUVELLES PERSPECTIVES D'APPLICATION EN ROUTINE AU LABORATOIRE HLA.

L'UTILISATION DU RAISONNEMENT PAR COMPATIBILITÉ ÉPITOPIQUE EST PERMISE GRÂCE À L'UTILISATION DE L'ALGORITHME HLA-MATCHMAKER, CRÉÉ PAR LE DOCTEUR RJ DUQUESNOY. CET ALGORITHME DÉTERMINE LES ÉPITOPES, NOMMÉS ÉPLET, IMMUNOGÈNE ET CEUX NON-IMMUNOGÈNE, CAR PORTÉS PAR LE SOI, GRÂCE AUX TYPAGES HLA HAUTE-RÉSOLUTION DU RECEVEUR ET DU DONNEUR D'ORGANE AINSI QUE DES IDENTIFICATIONS DES ANTICORPS ANTI-HLA DU RECEVEUR. L'APPARIEMENT ÉPITOPIQUE, PAR RAPPORT À L'APPARIEMENT ANTIGÉNIQUE, OFFRE UNE COMPRÉHENSION PLUS FINE DE L'IMMUNISATION DES PATIENTS EN ATTENTE, OU RECEVEURS, D'ORGANES. DANS LE SUIVI DE DSA, L'ANALYSE DES CIBLES DES ANTICORPS AVEC CET OUTIL PERMET DE CARACTÉRISER DE MANIÈRE PLUS FIABLE LA « FORCE » DES DSA. DE MÊME, LA DÉTERMINATION DE LA CHARGE ÉPITOPIQUE EST PLUS PRÉCISE SUR LA COMPATIBILITÉ ENTRE UN RECEVEUR ET SON DONNEUR QUE LA COMPATIBILITÉ ANTIGÉNIQUE. TOUTEFOIS, DANS LE CADRE DE L'ATTRIBUTION D'ORGANES EN URGENCES, CET OUTIL NE PEUT ÊTRE UTILISÉ DE MANIÈRE FIABLE CAR LA RÉSOLUTION DES TYPAGES DU DONNEUR OBTENUES DANS CE CONTEXTE N'EST PAS SUFFISANTE.

*HLA, eplet, triplet, épitope, appariement épitopique, transplantation, greffe, rejet, compatibilité, HLA-Matchmaker*

## JURY

PRÉSIDENT : M. le Professeur Gilles Thibault, PU-PH, Faculté de Pharmacie et CHRU de TOURS

MEMBRES : M. le Professeur Philippe Gatault, PU-PH, Faculté de Médecine et CHRU de TOURS

Mme le Docteur Barbara Proust, Pharmacien, EFS CPDL de Tours

Mme le Docteur Camille Humeau, Pharmacien, EFS CPDL de Tours

Soutenue publiquement le 30 septembre 2021 à la faculté de pharmacie de Tours