



Prévalence des anticorps anti-HLA chez les enfants en attente de greffe rénale au CHU de Bordeaux

Laura Jauhier

► To cite this version:

Laura Jauhier. Prévalence des anticorps anti-HLA chez les enfants en attente de greffe rénale au CHU de Bordeaux. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01651111

HAL Id: dumas-01651111

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01651111>

Submitted on 28 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES MÉDICALES

Année 2017

N° 3145

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ÉTAT de DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par Laura Jauhier

Née le 29 novembre 1989, à Palo Alto (États-Unis)

Le 16 octobre 2017

Prévalence des anticorps anti-HLA chez les enfants en attente de greffe rénale au CHU de Bordeaux

- Directrice de thèse -

Madame le Docteur Astrid Godron-Dubrasquet

- Jury -

Monsieur le Professeur Jérôme Harambat, Président

Madame le Docteur Gwendaline Guidicelli

Monsieur le Docteur Jonathan Visentin

Monsieur le Professeur Lionel Couzi

- Rapporteur -

Monsieur le Professeur Pierre Merville

Table des matières

I. INTRODUCTION.....	5
A. EPIDEMIOLOGIE DE LA GREFFE RENALE PEDIATRIQUE	5
B. PREPARATION A LA TRANSPLANTATION	6
C. ALLOCATION DU GREFFON, PLACE DES CRITERES IMMUNOLOGIQUES	7
D. SYSTEME HLA.....	9
E. TECHNIQUES DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-HLA.....	10
1. <i>Tests cellulaires</i>	11
2. <i>Immuno-essais en phase solide</i>	14
F. FACTEURS RESPONSABLES D'IMMUNISATION ANTI-HLA	20
1. <i>Anticorps anti-HLA développés secondairement à une exposition à des antigènes HLA étrangers</i>	20
2. <i>Autres anticorps</i>	23
II. JUSTIFICATION DE L'ETUDE ET OBJECTIFS.....	26
A. JUSTIFICATION DE L'ETUDE.....	26
B. OBJECTIFS.....	26
III. MATERIEL ET METHODES.....	27
A. TYPE D'ETUDE	27
B. POPULATION.....	27
1. <i>Critères d'inclusion</i>	27
2. <i>Critères d'exclusion</i>	27
C. RECUEIL DE DONNEES	27
D. ANALYSE STATISTIQUE	29
E. ETHIQUE.....	29
IV. RESULTATS	30
A. DESCRIPTION DE LA POPULATION	30
B. IMMUNISATION HLA.....	32
1. <i>Prévalence des anticorps anti-HLA en pré-greffe et retentissement sur l'accès à la greffe...</i>	32
2. <i>Evolution de la proportion de patients immunisés</i>	33
3. <i>Anticorps naturels</i>	34
4. <i>Facteurs de risque avérés et suspectés d'immunisation anti-HLA</i>	35
5. <i>Association entre événements immunisants connus et anticorps anti-HLA</i>	35
6. <i>Association entre événements immunisants suspectés et anticorps anti-HLA</i>	36
7. <i>Description des immunisations</i>	37
8. <i>Risque immunologique au moment de la greffe</i>	40
9. <i>Devenir post-greffe des patients</i>	41
V. DISCUSSION	42
VI. CONCLUSION	50
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51

Liste des figures

Figure 1. Structure des molécules HLA de classe I et de classe II à la membrane cellulaire....	9
Figure 2. Techniques de détection des anticorps anti HLA	11
Figure 3. Principe d'une réaction positive en microlymphocytotoxicité.....	12
Figure 4. Evolution du pourcentage de patients immunisés en pré-greffe en fonction de l'année du bilan pré-greffe	33
Figure 5. Evolution du nombre de patients immunisés et non immunisés en fonction de l'année du bilan pré-greffe	34
Figure 6. Evolution du nombre de patients transfusés et non-transfusés selon l'année du bilan pré-greffe.....	34
Figure 7. Profil d'immunisation de la patiente 1 (n'ayant pas d'antécédent d'événement immunisant): anticorps anti-IALR.....	40

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques générales de la population.....	31
Tableau 2. Caractéristiques des patients greffés	32
Tableau 3. Immunisation HLA pré-greffe	32
Tableau 4. Facteurs de risques avérés et suspectés d'immunisation anti-HLA chez les patients immunisés et non immunisés.....	35
Tableau 5. Association entre événements immunisants connus et anticorps anti-HLA	36
Tableau 6. Association entre antécédents des patients et présence d'anticorps anti-HLA.....	36
Tableau 7. Fréquence des spécificités en classe I.....	38
Tableau 8. Fréquence des spécificités en classe II.....	38

Liste des Abréviations

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

ADN : acide desoxyribonucléique

CGR : culot de globules rouges

CHU : centre hospitalo-universitaire

CMF: cytométrie de flux

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

cPRA : *calculated panel-reactive antibody*

CREG : groupe de réactivité croisée

DSA : *donor specific antibody*

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

Fc : fragment cristallisable

HLA : *human leucocyte antigen*

IC95% : intervalle de confiance à 95%

Ig : immunoglobuline

LCT : microlymphocytotoxicité dépendante du complément

MFI: *mean fluorescence intensity*

OPTN : *organ procurement and transplantation network*

PFC : plasma frais congelé

PRA : *panel-reactive antibody*

Ratio NBG : *normalized background ratio*

SAB : *single antigen bead*

TGI : taux de greffons incompatibles

Prévalence des anticorps anti-HLA chez les enfants en attente de greffe rénale au CHU de Bordeaux

I. Introduction

A. Epidémiologie de la greffe rénale pédiatrique

La maladie rénale chronique stade 5 (ou insuffisance rénale terminale) est définie, comme chez l'adulte, par un débit de filtration glomérulaire inférieur à 15 ml/min/1,73 m².

Le traitement optimal de suppléance de la maladie rénale chronique stade 5 chez l'enfant est la transplantation rénale. En effet, la survie des enfants après transplantation est supérieure à celle des enfants traités par dialyse, quel que soit l'âge au moment de la transplantation¹. De plus, la transplantation permet une meilleure qualité de vie que la dialyse.

La prévalence de l'insuffisance rénale chronique terminale traitée chez les moins de 20 ans est de 54 par millions d'enfants. L'incidence est de 8 par million d'enfants. L'âge médian de ces enfants et adolescents est de 13,3 ans avec un sexe-ratio équilibré.

Les étiologies principales de la maladie rénale chronique stade 5 à l'âge pédiatrique sont les néphropathies génétiques (responsables de 30% des insuffisances rénales chroniques terminales) et les uropathies et/ou hypodysplasies rénales (responsables de 27% des insuffisances rénales chroniques terminales). Viennent ensuite les glomérulopathies acquises, qui représentent 15% des causes d'insuffisance rénale chronique terminale et sont dominées par les hyalinoses segmentaires et focales associées aux syndromes néphrotiques idiopathiques de l'enfant.

L'insuffisance rénale chronique terminale survient plus tôt dans le groupe des pathologies congénitales (âge médian des maladies génétiques : 10,5 ans et des uropathies/hypodysplasies : 12,9 ans) que dans le groupe des glomérulopathies acquises (âge médian : 15,4 ans).

Ces étiologies sont très différentes de celles de l'insuffisance rénale chronique terminale de l'adulte pour lequel le diabète, les néphropathies hypertensives et la polykystose autosomique dominante sont les étiologies principales².

En France, au 1^{er} janvier 2016, 172 patients âgés de 0 à 18 ans sont inscrits sur liste d'attente de greffe rénale. On totalise 97 greffes rénales pédiatriques (0-18 ans) en 2015 dont 20 greffes avec donneur vivant. Parmi les enfants greffés en 2015, 26% ont bénéficié d'une greffe préemptive (sans dialyse préalable).

Le nombre annuel de greffes rénales pédiatriques reste relativement stable depuis 2006³.

Au CHU de Bordeaux, la première greffe rénale réalisée par l'équipe pédiatrique a eu lieu en 2005. La première greffe rénale pédiatrique avec donneur vivant a été réalisée en 2014.

B. Préparation à la transplantation

Les conditions d'accès à la liste nationale d'attente de greffe rénale ont fait l'objet d'une recommandation de la Haute Autorité de Santé en Octobre 2015⁴.

L'équipe médicale doit préalablement à la transplantation réaliser le recueil des antécédents personnels (dont les antécédents transfusionnels) et familiaux, l'historique des accès vasculaires, le portage de bactéries multi résistantes, le recueil précis de la néphropathie initiale, de son évolution, l'évaluation du risque de récurrence après transplantation, et réaliser un examen clinique détaillé.

Les examens complémentaires à réaliser lors de la préparation à la transplantation incluent une évaluation de l'appareil urinaire et la correction d'éventuelles malformations, une évaluation échographique de la fonction cardiaque, une évaluation de la perméabilité des axes vasculaires, la recherche d'une thrombophilie, un bilan infectieux avec réalisation de sérologies et la réalisation d'un bilan immunologique (groupe sanguin, groupage HLA, recherche d'anticorps anti-HLA et cross-match final).

La mise à jour des vaccinations selon le calendrier vaccinal en vigueur et des vaccinations supplémentaires spécifiques sont recommandées lors de la préparation à la transplantation⁵. En effet, du fait de l'immunosuppression, les receveurs d'une transplantation d'organe solide

sont plus à risque de contracter des infections pouvant être prévenues par la vaccination. Il est recommandé de pratiquer le plus tôt possible ces vaccinations au cours de l'évolution de la maladie pour qu'elles puissent dans la mesure du possible être réalisées avant la greffe. Les vaccins inactivés peuvent être pratiqués après la greffe mais leur immunogénicité est moindre, tandis que les vaccins vivants atténués sont généralement contre-indiqués après la greffe. La prévention des infections inclut également la vaccination de l'entourage des patients greffés ou en attente de greffe.

La préparation à la greffe comprend également une consultation avec le néphrologue, le chirurgien, l'anesthésiste, le psychologue et l'équipe d'éducation thérapeutique.

C. Allocation du greffon, place des critères immunologiques

En France, l'organisation générale des prélèvements et des transplantations d'organes est sous la responsabilité d'un établissement public, l'agence de la biomédecine qui gère la liste d'attente des receveurs, répartit les greffons disponibles, assure la vigilance sanitaire et évalue les résultats de la transplantation. L'application en ligne Cristal permet la gestion des patients inscrits sur liste d'attente de greffe. Les résultats des tests immunologiques en pré-greffe y sont rapportés par l'équipe qui prend en charge le patient : y figurent les résultats du typage HLA du receveur et des recherches d'anticorps anti-HLA (avec définition des antigènes « interdits », c'est-à-dire que si le donneur possède ces antigènes, le greffon ne sera pas proposé au receveur).

L'allocation des greffons se fait selon de nombreux critères : le groupe sanguin, les groupes HLA, la présence dans le sérum d'anticorps anti-HLA, la durée d'attente et l'âge des receveurs. En outre, l'équipe médicale qui réalise la transplantation peut accepter ou refuser le greffon proposé s'il juge qu'il n'est pas adapté au receveur. Les enfants âgés de moins de 18 ans ont une priorité d'accès à la transplantation par rapport aux adultes. Cette règle de priorité des enfants jusqu'à 18 ans, qui existe également dans d'autres pays, permet de réduire de façon significative la durée de la dialyse, voire de l'éviter, diminuant l'impact que ce traitement a sur la scolarité et la vie sociale de l'enfant⁶.

Pour les malades pédiatriques inscrits entre 2011 et 2015, la probabilité d'être greffé est de 53% à 1 an et 78 % à 2 ans. Elle est sous-estimée du fait de la part des malades inscrits en contre-indication temporaire (passée de 18 à 40% entre 2008 et 2014).

En France, grâce à la priorité qui leur est accordée, les receveurs pédiatriques ont un accès à la greffe plus rapide que les receveurs adultes qui, sur la même période ont une probabilité d'être greffés de 25% à 1 an et 43 % à 2 ans.

La principale difficulté d'accès à la greffe en pédiatrie est l'existence d'une hyper immunisation, définie par un taux de greffons incompatibles (TGI) supérieur ou égal à 85%. Le taux de greffons incompatibles est calculé par l'Agence de biomédecine, il permet de déterminer le pourcentage de la population de donneurs isogroupe contre lequel le patient est immunisé, d'après les spécificités HLA interdites saisies dans la base de données Cristal, prenant en compte les loci A, B, DRB1 et DQB1. L'équivalent international du TGI est le taux calculé de *panel-reactive antibody* (cPRA). Le taux de greffe est de seulement 26% à 1 an et 49% à 2 ans chez les receveurs pédiatriques hyperimmunisés. Dans ces conditions, les malades s'accumulent sur la liste d'attente représentant 24% des malades restant en attente au 1er janvier 2015 alors qu'ils représentent 9% des nouveaux inscrits et 5,5% des greffés dans l'année. Les patients hyper immunisés bénéficient de ce fait d'une priorité d'accès à la greffe³.

La présence d'anticorps anti-HLA chez les patients en attente de transplantation constitue donc l'un des facteurs qui influencent le choix du greffon. Ceux-ci sont recherchés avant l'inscription sur liste d'attente de greffe puis tous les trois mois. Ils doivent également être recherchés de façon systématique après tout événement immunisant potentiel (grossesse, transfusion, transplantation) à deux reprises (entre J15 et J21 et à J30)⁷.

La présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur est un facteur de risque de rejet, qui peut ou non contre-indiquer la greffe. Il faut dans ce cas évaluer la balance bénéfice/risque en tenant compte du contexte clinique (durée de dialyse, temps d'attente sur liste, donneur vivant ou décédé) et de la stratification du risque immunologique⁸.

Il est particulièrement important en pédiatrie d'avoir le risque immunologique le plus faible possible, notamment en limitant au maximum le nombre d'incompatibilités HLA, en raison de la nécessité de transplantations répétées au cours de la vie.

D. Système HLA

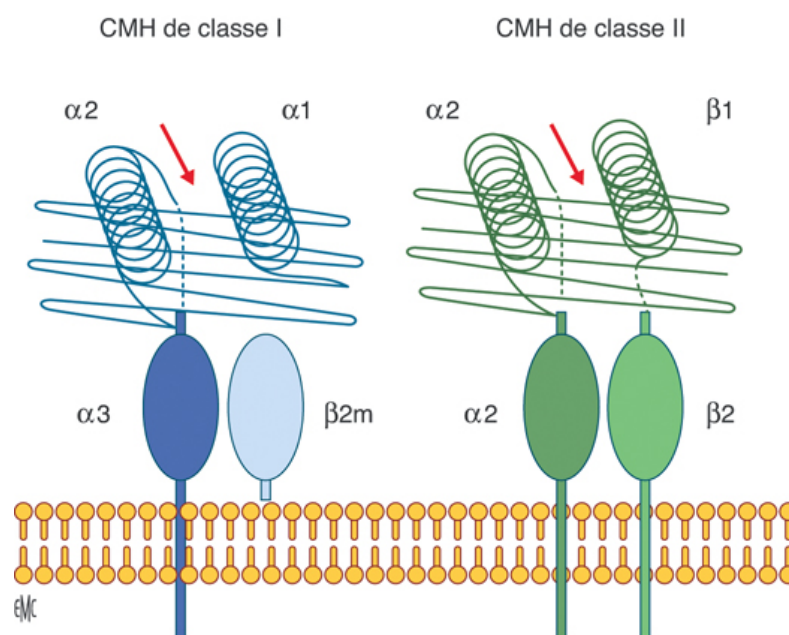
L'allogreffe expose à un risque de rejet qui peut aboutir à la perte de l'organe transplanté. Ce rejet peut être médié par une réaction cellulaire (faisant intervenir les lymphocytes T) ou par une réaction humorale (faisant intervenir les anticorps) dirigée contre les antigènes reconnus comme étrangers, constitués principalement par les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), également appelés antigènes HLA.

Les antigènes HLA sont des glycoprotéines membranaires impliquées dans la présentation antigénique. Ils sont codés par les gènes HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) et les gènes HLA de classe II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR).

Les molécules HLA de classe I sont composées d'une chaîne lourde α polymorphe, codée par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C associée de façon non-covalente à une chaîne légère de β 2-microglobuline.

Les molécules HLA de classe II sont également composées de deux chaînes toutes deux polymorphes : une chaîne α codée par les gènes DRA, DPA et DQA et une chaîne β codée par les gènes DRB, DPB et DQB (Figure 1).

Figure 1. Structure des molécules HLA de classe I et de classe II à la membrane cellulaire.



D'après S. Candon⁹

Il existe une variabilité allélique très importante pour chaque gène HLA, correspondant à une très grande variabilité polypeptidique des antigènes HLA entre les individus. Ainsi la probabilité que deux individus non apparentés possèdent les mêmes allèles HLA et expriment les mêmes antigènes HLA de classe I et II est estimée en moyenne à 10^{-6} .

Les épitopes sont de courtes séquences d'acides aminés qui sont communes à des molécules HLA différentes. Si l'on s'immunise contre un épitope partagé par différentes molécules HLA, on s'immunise contre l'ensemble de ces molécules HLA qui portent cet épitope. Les molécules HLA présentant un épitope commun sont appelées groupes de réactivité croisée (CREG).

L'étude du système HLA en pré-greffe rénale est primordiale. Elle permet :

- d'effectuer le typage HLA chez le donneur et le receveur pour allouer le greffon en limitant les incompatibilités, en effet toutes les molécules HLA de classe I et II sont des cibles antigéniques potentielles et le nombre d'incompatibilités a une influence cruciale sur la survie à long terme du greffon.
- de rechercher une immunisation anti-HLA préexistante. En effet, la présence d'immunoglobulines G dirigées contre les antigènes HLA du donneur (DSA) est associée à un pronostic de greffe défavorable en lien avec des réactions de rejet hyper-aigu, aigu et chronique. La détection de ces anticorps permet d'allouer au mieux le greffon pour limiter ces réactions de rejet et d'adapter les thérapies immunosuppressives.

L'identification de patients hyperimmunisés peut conduire à accroître la priorité d'accès à un greffon ou d'établir des stratégies préemptives pour réduire cette immunisation.

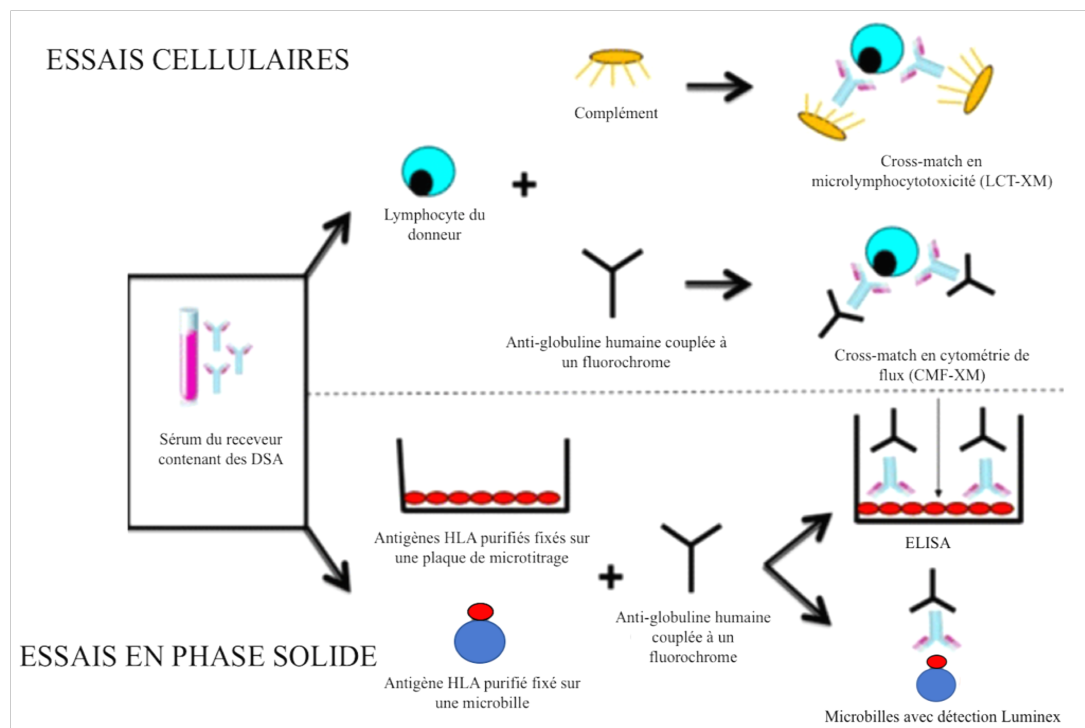
La recherche d'immunisation anti-HLA en post-greffe est également essentielle au suivi et au traitement post-greffe.

E. Techniques de détection des anticorps anti-HLA

Les techniques permettant de rechercher une immunisation anti-HLA en pré-greffe rénale chez le receveur ont évolué récemment. Elles visent à identifier les anticorps anti-HLA

cliniquement significatifs, c'est-à-dire ceux qui vont augmenter le risque de rejet aigu ou chronique du greffon, et devraient idéalement permettre de les distinguer d'éventuels anticorps anti-HLA qui peuvent être détectés mais n'influencent pas le pronostic de la greffe.

Figure 2. Techniques de détection des anticorps anti HLA



D'après L. Rees et al.¹⁰

1. Tests cellulaires

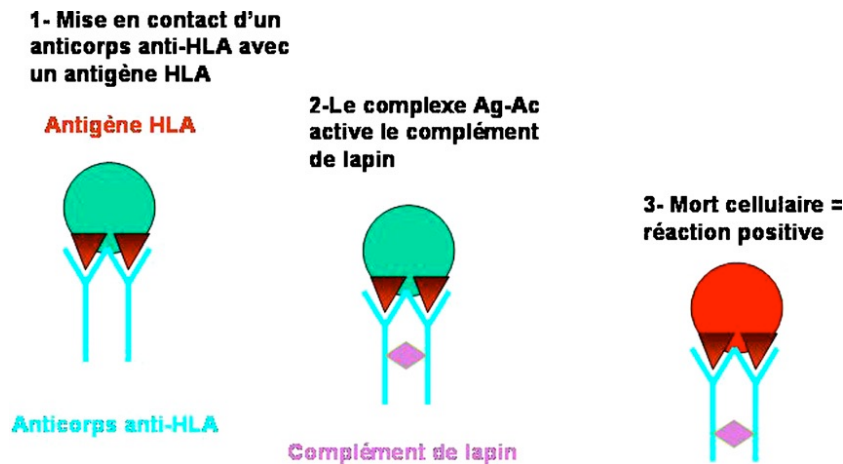
a) Cytotoxicité dépendant du complément ou microlymphocytotoxicité (LCT)

Apparue dans les années 1960, la méthode de référence historique pour rechercher des anticorps anti-HLA est le test de cytotoxicité dépendant du complément qui consiste à incuber le sérum du patient en présence de complément avec un panel de lymphocytes de typage HLA connu. La survenue d'une lyse des lymphocytes, observée au microscope après coloration des cellules, indique la présence d'un anticorps anti-HLA fixant le complément (Figure 3). Les résultats sont exprimés en pourcentage de lyse cellulaire, le seuil de positivité étant fixé à 20%. La séparation entre lymphocytes B et T permet d'identifier si les anticorps sont dirigés

contre des molécules HLA de classe I ou II. Le test peut également détecter des anticorps auto-immuns, des IgM (il est possible d'empêcher la détection d'IgM par l'adjonction de DTT) ou d'autres anticorps non dirigés contre des molécules HLA.

Il s'agit d'un test fonctionnel qui permet d'objectiver la destruction des cellules cibles et qui reflète donc probablement le mieux les mécanismes du rejet humoral qui ont lieu in vivo.

Figure 3. Principe d'une réaction positive en microlymphocytotoxicité.



D'après V. Moalic¹¹

Ce test présente plusieurs limites dont certaines ont pu être corrigées par des modifications de la technique :

- Il s'agit d'un test moins sensible que les tests en cytométrie de flux. Le test peut-être faussement négatif si l'anticorps anti-HLA est présent à faible concentration ou si les anticorps n'agissent pas via l'activation du complément (s'ils déclenchent la lyse cellulaire via des cellules inflammatoires recrutées par des fragments du complément, ou via la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendant des anticorps (ADCC)). L'adjonction d'anti-globuline humaine permet d'augmenter la sensibilité du test en révélant les anticorps n'activant pas le complément, cependant cette technique est difficilement utilisable avec les lymphocytes B du fait de la présence à leur surface d'immunoglobulines et de récepteurs aux fragment cristallisable (Fc) des anticorps. L'allongement du temps d'incubation a également permis d'accroître la sensibilité de la LCT.
- Il s'agit d'une évaluation qualitative qui peut être opérateur-dépendant.
- La lyse cellulaire peut être affectée par les conditions de culture et la manipulation. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être effectués simultanément. Les

lymphocytes B sont des cellules fragiles qui peuvent induire un bruit de fond important rendant difficile l'interprétation du test.

- Il est impossible de déterminer avec précision les antigènes HLA ciblés par les anticorps.
- Il ne s'agit pas d'un test standardisé, la reproductibilité entre différents laboratoires est limitée¹².
- C'est une technique qui requiert du temps.

La LCT peut être utilisée pour effectuer le cross-match final avant transplantation mais aussi pour dépister des anticorps anti-HLA lors du suivi pré-greffe.

En utilisant un panel de cellules sélectionnées sur la base du typage HLA pour représenter la fréquence antigénique de la population locale, le test de cytotoxicité dépendant du complément peut permettre de déterminer un taux de *Panel Reactive Antibody* (PRA en %) permettant d'estimer les chances de trouver un donneur compatible dans une population donnée.

Le cross-match permet la recherche ultime avant greffe d'immunisation dirigée contre le donneur. Le test de cytotoxicité dépendant du complément permet de réaliser un cross-match en utilisant des lymphocytes B et T provenant du donneur. En 1969, Terasaki *et al.* ont montré que la présence de DSA en pré-greffe rénale détectés sur un cross-match en microlymphotoxicité augmentait fortement le risque de perte du greffon suite à un rejet hyperaigu¹³. Ce test a donc été utilisé pendant de nombreuses années (et est toujours utilisé par certaines équipes), permettant d'améliorer le pronostic de greffe en récusant la transplantation en cas de cross-match positif.

b) Cross-match en cytométrie de flux (CMF)

Le cross-match en cytométrie de flux, décrit pour la première fois en 1983 a été utilisé de façon croissante en raison d'une sensibilité supérieure au test de cytotoxicité dépendant du complément.

Ce test consiste en l'incubation de lymphocytes du donneur avec le sérum du receveur puis avec un anticorps anti-globuline humaine couplé à un marqueur fluorescent qui permet de révéler les anticorps dirigés contre le donneur qui se sont fixés sur les cellules cibles. Il

détecte à la fois les anticorps anti-HLA de classe I (cross-match réalisé sur des lymphocytes T) et les anticorps anti-HLA de classe II (cross-match réalisé sur des lymphocytes B). Il peut également détecter des anticorps anti-lymphocytes qui ne sont pas des anticorps anti-HLA. En fonction de l'anticorps anti-globuline utilisé, on peut détecter les isotypes d'immunoglobulines fixant le complément (sous-classes d'IgG et IgM) mais aussi les autres isotypes d'immunoglobulines.

Contrairement au test de cytotoxicité dépendant du complément, il ne s'agit pas d'un test fonctionnel puisqu'il détecte la liaison des anticorps aux lymphocytes mais ne donne pas d'information sur leur cytotoxicité¹⁴.

Même à de faibles concentrations, les IgG anti-HLA dirigées contre le donneur qui sont détectées par cross-match en cytométrie de flux sont cliniquement significatives : elles sont associées aux rejets aigu et chronique et à la perte du greffon^{15,16}.

2. Immuno-essais en phase solide

a) Principe général

Les immuno-essais en phase solide englobent la technique ELISA et l'utilisation de billes recouvertes d'antigènes HLA avec détection en cytométrie de flux. Ils utilisent des molécules HLA de classe I ou de classe II purifiées à partir de lignées cellulaires de typage HLA connu qui sont liées de façon covalente à un support solide (plaque ELISA ou microbilles en polystyrène), et permettent la capture des anticorps anti-HLA sériques.

Dans la technique ELISA, les anticorps capturés par les molécules HLA liées à la plaque sont révélés par un anticorps anti-globuline couplé à la peroxydase.

Dans les techniques utilisant des microbilles, les anticorps capturés par les molécules HLA liées aux microbilles sont révélés secondairement par un anticorps anti-IgG couplé à un fluorochrome, la phycoérythrine, avec détection en cytométrie de flux (classique ou Luminex[®]). Les contrôles comportent une bille contrôle négatif, une bille contrôle positif et un sérum négatif. La technologie Luminex[®] permet à l'aide d'un premier laser d'identifier les billes (chaque bille contenant un mélange différent de deux fluorochromes) et à l'aide d'un deuxième laser de mesurer la fluorescence liée à la fixation de l'anticorps secondaire couplé à la phycoérythrine.

La technique ELISA apparue dans les années 1990 est aujourd'hui largement supplantée par la technique des billes avec détection en cytométrie de flux par Luminex[®], qui permet de

rechercher simultanément des anticorps anti-HLA chez 96 patients en single-antigen alors que la technique ELISA requiert une plaque par patient en single-antigen¹⁴.

b) Avantages

Il existe trois types de microbilles utilisées à des fins différentes :

- dépistage des anticorps anti-HLA : chaque bille est recouverte d'un mélange d'antigènes HLA de classe I ou de classe II obtenues à partir de lignées cellulaires lymphoblastoïdes),
- identification précise de la spécificité des anticorps anti-HLA (*single-antigen bead* (SAB)) : chaque bille est recouverte avec un antigène HLA recombinant correspondant à une seule spécificité HLA.
- détermination du taux de cPRA : chaque bille est recouverte de molécules HLA issues d'une seule lignée cellulaire.

L'identification des spécificités des anticorps anti-HLA permet de faire un cross-match virtuel, c'est-à-dire de ne pas proposer les greffons issus de donneurs qui possèdent des antigènes HLA contre lesquels sont dirigés les anticorps du receveur (en France, ils sont rapportés dans le logiciel Cristal comme antigènes « interdits »). Dans certaines conditions, des équipes pratiquent la greffe uniquement sur la base d'un cross-match virtuel négatif, permettant de réduire le temps d'ischémie froide¹⁷. L'identification des patients hyper-immunisés permet de leur donner une priorité d'accès à la greffe.

L'immuno-essai en phase solide utilisant les microbilles est la technique la plus sensible pour détecter les anticorps anti-HLA. Elle rend possible l'identification des anticorps dirigés contre les antigènes DQA1, DQB1, DRB3, DRB4, DRB5, et DPB1 qui ne peut pas être faite par les autres méthodes.

c) Limites

Bien que la recherche d'anticorps anti-HLA grâce aux microbilles avec détection en cytométrie de flux par Luminex[®] soit devenue la méthode de référence pour la recherche d'anticorps anti-HLA, il existe d'importantes limites à son interprétation :

- La présence d'anticorps anti-HLA est déterminée de manière semi-quantitative par une mesure d'intensité de fluorescence ou Mean Fluorescence Intensity (MFI). Plusieurs études ont essayé de déterminer un seuil de MFI qui soit le mieux corrélé au pronostic de greffe^{15,18,19,20,21}. En France, l'agence de biomédecine retient un seuil de 500 pour les antigènes « permis », mais il n'existe pas de seuil consensuel qui soit parfaitement corrélé au pronostic de greffe. Dans la pratique clinique courante, chaque laboratoire fixe un seuil qui lui est propre (généralement entre 500 et 2000) en fonction de son expérience clinique et de tests réalisés sur des contrôles.

- Plusieurs facteurs peuvent être responsables d'une variabilité de la MFI. Elle peut varier en fonction de la densité de molécules HLA présentes sur les billes (en fonction des billes au sein d'un même test, des lots, du type de test : dépistage vs. SAB vs. panel, du fournisseur). Depuis la création de ces tests, les fournisseurs essaient de réduire cette variabilité. La MFI peut également varier en fonction des manipulations qui sont réalisées (dialyse hypotonique, adjonction de DTT, quantité de sérum/billes, technique de lavage...), avec un impact sur les valeurs de MFI de l'ensemble des billes et des contrôles positif et négatif^{22,23}.
 La MFI peut être artificiellement abaissée si l'anticorps est dirigé contre un épitope présent sur de nombreuses billes différentes, ce qui peut aboutir à une « dilution » de la MFI qui peut se trouver sous le seuil de significativité pour l'ensemble des billes portant l'épitope.
 Le manque de reproductibilité de la mesure de MFI entre différents laboratoires et au sein d'un même laboratoire constitue une limite : si le changement de valeur s'effectue autour du seuil de positivité, certains antigènes pourront être ou non répertoriés comme interdits. La variabilité entre laboratoires peut avoir des conséquences sur la répartition des greffons, elle pourrait être réduite par une meilleure standardisation du test^{24,25}.
 Par ailleurs, il existe un effet de saturation des billes qui résulte en une MFI identique malgré une dilution du sérum en cas d'immunisation forte²⁴.

- Cette technique détecte des anticorps dirigés contre des molécules HLA dénaturées présentes à la surface des billes. Les molécules HLA de classe I dénaturées, dont la chaîne α est dissociée de la β 2-microglobuline et du peptide présenté, exposent des

épitopes habituellement inaccessibles. Des molécules HLA de classe II dénaturées ont été mises en évidence récemment²⁶. Un des enjeux de l'interprétation de la technique est de distinguer les anticorps dirigés contre les molécules HLA natives et ceux dirigés contre les molécules HLA dénaturées²⁷. Les anticorps dénaturés sont détectés et par les billes *single antigen* et par les billes de dépistage et de PRA. Il est possible de mettre en évidence ces anticorps dirigés contre des molécules HLA dénaturées en appliquant un traitement acide aux billes qui dénature les molécules HLA à leur surface²⁸. Lorsque le sérum est testé avec ces billes, la MFI des anticorps dirigés contre les molécules HLA natives est nettement diminuée, au contraire, la MFI des anticorps dirigés contre des molécules HLA dénaturées augmente. Cependant certains épitopes présents à l'état natif résistent au traitement acide. La présence d'anticorps anti-HLA dénaturé n'exclue pas la présence concomitante d'anticorps anti-HLA natif. D'après certaines études, les anticorps dirigés contre des molécules HLA dénaturées ne seraient pas cliniquement significatifs: ils ne seraient pas capables de reconnaître les molécules HLA à la surface des cellules (cross-match et tests de cytotoxicité significativement moins positifs lorsqu'il y a des anticorps dénaturés que lorsqu'il n'y a que des anticorps natifs)²⁷ et leur présence ne serait pas associée à un pronostic de greffe péjoratif^{29,30}. Un nouveau type de billes dépourvues de molécules HLA dénaturées a été développé (iBeads; One Lambda Inc., Canoga Park, CA) pour limiter les faux positifs liés à la détection d'anticorps dirigés contre des molécules HLA dénaturées. Cependant, Visentin *et al.* ont montré qu'il pouvait y avoir des cross-match en cytométrie de flux positifs malgré la négativité des iBeads suggérant que la sensibilité de ce type de bille est inférieure à celle des SAB classiques. Il pouvait également y avoir des cross-match en cytométrie de flux négatifs malgré des valeurs de MFI élevées détectées avec les iBeads, suggérant une spécificité également limitée²⁷. Les iBeads ne sont plus commercialisées à l'heure actuelle. Les anticorps naturels anti-HLA et les anticorps dirigés contre des molécules HLA dénaturées sont à suspecter chez tous les patients chez qui on détecte des anticorps. En effet, il n'existe pas de technique permettant de les différencier formellement des anticorps anti-HLA natif d'origine allogénique.

- Il peut exister des faux négatifs chez des patients présentant des anticorps anti-HLA en présence de complément en quantité importante (qui gêne la fixation de l'anticorps marqué par fluorochrome aux anticorps anti-HLA)³¹. Le traitement des sérums par

EDTA ou par DTT ou par la chaleur (56°C pendant 30 min) permet de supprimer ces faux négatifs.

- Les traitements par immunoglobulines polyvalentes, sérum anti-lymphocytaire induisent de faux positifs, tandis que le bortezomib et l'eculizumab peuvent induire une réduction de la détection d'anticorps anti-HLA.
- Il ne s'agit pas d'un test fonctionnel.
- On ne détecte pas les anticorps dirigés contre des molécules non-HLA¹⁴.
- Des essais modifiés pour différencier les anticorps anti-HLA fixant le complément et anticorps anti-HLA ne fixant pas le complément sont en cours d'évaluation²⁴.

En couplant cette technique avec un logiciel permettant de connaître les épitopes portés par les différents antigènes (HLA Matchmaker), il est possible de déterminer certains épitopes qui sont reconnus par les anticorps anti-HLA. Il est ainsi possible d'identifier une immunisation contre des allèles non représentés sur les billes qui sont porteurs de ces épitopes. L'identification d'une immunisation dirigée contre plusieurs antigènes partageant un épitope pourrait également aider à distinguer les anticorps cliniquement significatifs²².

Du fait de leurs nombreuses limites, l'interprétation des tests de recherche d'anticorps anti-HLA et la détermination des antigènes « interdits » nécessite une véritable expertise et doit être réalisée par une équipe expérimentée^{32,33}. La Transplantation Society a établi en 2013 des recommandations dans lesquelles sont abordés les problèmes soulevés par l'interprétation des tests de recherche d'anticorps anti-HLA²⁴. Il est nécessaire de prendre en compte la concordance entre les différents tests réalisés, le phénotype HLA du receveur (pour ne pas interdire un antigène du soi), l'existence d'événements allo-immunisants (transfusion, grossesse, greffe préalable). Le phénotype HLA des donneurs précédents en cas de re-transplantation et du père en cas d'antécédents de grossesse doivent idéalement être recueillis pour vérifier les spécificités des anticorps. Un typage HLA haute résolution peut être nécessaire en cas d'immunisation contre un épitope porté par un allèle du même groupe antigénique que celui du patient. L'obtention d'informations sur la survenue d'événements pro-inflammatoires est importante pour expliquer les variations du profil d'anticorps.

d) *Impact sur le pronostic de greffe de la détection de DSA en pré-greffe par immuno-essais en phase solide*

Dans une méta-analyse datant de 2012³⁴ qui intègre les résultats de sept études rétrospectives^{35,36,37,38,39,40,41}, la détection de DSA en pré-greffe par des immuno-essais en phase solide, alors que le cross-match en LCT et en CMF était négatif, est associée à une augmentation du risque de rejet humoral et à une diminution de la survie du greffon.

Bien qu'individuellement seules deux études montrent une augmentation significative du risque de rejet humoral, la méta-analyse retrouvait un risque relatif de rejet humoral à 1,98 avec un IC95% [1,36-2,89].

Seule une étude réalisée sur une population pédiatrique montrait individuellement une augmentation significative du risque de perte du greffon³⁹, la méta-analyse montrait une augmentation significative du risque de perte du greffon, avec un risque relatif à 1,76 avec un IC95% [1,13-2,74].

D'autres études rapportent un moins bon pronostic de greffe en cas de détection de DSA préformés par immuno-essais en phase solide en présence d'un cross-match cellulaire négatif:

- Dans une étude monocentrique espagnole de 2012, sur 892 greffes rénales avec cross-match négatif en LCT avec adjonction d'anti-globuline, la survie du greffon était significativement inférieure dans le groupe DSA préformés détectés par immuno-essai en phase solide (dépistage et identification *single antigen* sur microbilles avec détection Luminex® avec un seuil de MFI à 1500) que dans les groupes absence d'anticorps anti-HLA et anticorps anti-HLA non DSA⁴².
- Dans une étude de 2006 portant sur 55 greffes rénales avec cross-match négatif en LCT avec adjonction d'anti-globuline, chez des patients avec un cPRA>15% (PRA et identification sur microbilles *single antigen* avec détection Luminex®), la survenue de rejet aigu documentée par biopsie était significativement augmentée et la survie du greffon à 6 mois était significativement diminuée dans le groupe avec DSA préformés comparée au groupe anticorps anti-HLA non DSA⁴³.
- Dans une étude monocentrique hollandaise de 2012 portant sur 837 greffes rénales avec cross-match négatif en LCT sans adjonction d'anti-globuline, la survie du greffon à 10 ans était significativement inférieure dans le groupe DSA + en classe I et II préformés détectés par immuno-essai en phase solide (dépistage et identification *single antigen* sur microbilles avec détection Luminex® avec un seuil de MFI à 1000)

comparé aux groupes DSA + seulement en classe I ou II, anticorps anti-HLA non DSA et absence d'anticorps anti-HLA¹⁸.

- Dans une étude monocentrique américaine de 2011 portant sur 587 greffes rénales avec cross-match négatif en LCT avec adjonction d'anti-globuline, le taux de rejet humoral et de rejet cellulaire ainsi que la perte du greffon à long terme sont significativement associés à la présence de DSA préformés détectés par immuno-essai en phase solide (dépistage et identification *single antigen* sur microbilles avec détection Luminex® avec un seuil de MFI à 500) comparés aux groupes sans DSA⁴⁴.
- Dans une étude de 2010 portant sur 402 greffes rénales avec cross match négatif en LCT du jour de greffe, la détection de DSA préformés par immuno-essai en phase solide (*single antigen* et Luminex®) qu'ils soient de classe I ou II était associée à une diminution de la survie du greffon à 5 et 8 ans comparativement à l'absence de DSA¹⁵.

F. Facteurs responsables d'immunisation anti-HLA

1. Anticorps anti-HLA développés secondairement à une exposition à des antigènes HLA étrangers

Les événements connus pour influencer le développement d'anticorps anti-HLA sont les expositions à des antigènes HLA étrangers lors d'une transplantation, d'une transfusion de produits sanguins ou d'une grossesse. Dans tous les cas précédents, l'introduction de tissu comportant des antigènes du non-soi peut être responsable de la reconnaissance par les lymphocytes B et T de ces antigènes HLA étrangers, pouvant entraîner une réaction inflammatoire médiée par les lymphocytes T ainsi que l'activation des lymphocytes B dont résulte la production d'anticorps anti-HLA qui peuvent être détectés dans le sérum. La production de lymphocytes B mémoire peut être à l'origine d'une réaction humorale rapide en cas de re-stimulation par un antigène similaire⁹.

a) Grossesse

Le passage dans le sang maternel de cellules fœtales entraîne une exposition à des molécules HLA étrangères. Plusieurs études réalisées chez des populations de donneurs de sang ont démontré une prévalence significativement plus élevée d'anticorps anti-HLA chez les femmes ayant des antécédents de grossesse, comparativement aux hommes et aux femmes sans

antécédents de grossesse. La prévalence augmente de façon significative avec le nombre de grossesses et diminue avec le temps après la grossesse.

Ces résultats sont retrouvés quelle que soit la méthode de recherche d'anticorps anti-HLA (microlymphocytotoxicité⁴⁵ et essais en phase solide^{46,47,48}).

b) Transfusion

(1) Transfusion de culots de globules rouges

Les globules rouges présentent à leur surface des molécules HLA de classe I en faible quantité (entre 100 et 2000 antigènes par cellule). Les culots de globules rouges, qu'ils soient ou non déleucocytés, contiennent également des leucocytes qui présentent une quantité plus importante de molécules HLA de classe I à leur surface (10^5 antigènes par cellule)⁴⁹.

Le rôle joué par la transfusion de globules rouges dans l'immunisation anti-HLA et ses conséquences sur le rejet de greffe d'organe solide a été l'objet de nombreuses publications. Dans les années 1970-1980, des études rapportaient un meilleur pronostic de greffe chez les patients ayant été transfusés, suggérant un rôle immuno-modulateur de la transfusion, induisant une tolérance^{50,51}. Depuis, cet effet positif de la transfusion a été écarté avec l'évolution de la prise en charge immunologique⁵².

Les études récentes montrent que le risque de développer des anticorps anti-HLA en lien avec une transfusion est faible^{53,54}, et lorsqu'ils se développent, ils sont détectés à de faibles taux et disparaissent après quelques mois^{53,55}.

Deux études récentes réalisées avec des essais en phase solide sur une population de donneurs de sang ayant des antécédents de transfusion ancienne ne retrouvent pas d'association significative entre transfusion et présence d'anticorps anti-HLA. Les auteurs hypothétisent que ce résultat est dû à un délai long, avec une médiane à environ 10 ans et 20 ans, entre la transfusion et la recherche d'anticorps dans les deux études respectives^{46,56}.

Le risque d'immunisation anti-HLA après transfusion de globules rouges est augmenté dans certaines situations : il apparaît plus important chez les enfants dans deux études réalisées avec des tests cellulaires^{55,57}.

Le risque d'immunisation s'accroît avec le nombre de transfusions, ainsi il existe une prévalence élevée d'anticorps anti-HLA, à des taux élevés chez des populations de

drépanocytaires et de patients porteurs de dispositifs d'assistance ventriculaire multi-transfusés^{58,59}.

Le risque d'immunisation est également accru lorsque la transfusion est effectuée chez une patiente ayant des antécédents de grossesse⁶⁰.

Le risque d'allo-immunisation HLA suite aux transfusions de globules rouges doit être pris en compte avant d'effectuer une transfusion chez un patient à risque de nécessiter une transplantation d'organe solide. Certains auteurs proposent également de réfléchir à des transfusions de culots globulaires HLA-compatibles, ce que l'organisation des établissements gérant les transfusions ne rend pas possible à ce jour. L'intérêt de réaliser les transfusions sous couvert d'une immunosuppression est également discuté⁶¹.

(2) Transfusion de plaquettes

Les plaquettes présentent à leur surface des molécules HLA de classe I en quantité importante (10^5 à 10^6 molécules HLA par cellule)⁶². Plusieurs études ayant trait à la thrombopénie réfractaire aux transfusions montrent un taux élevé d'anticorps anti-HLA parmi les patients ayant reçu des transfusions itératives de plaquettes, et une réduction du risque d'allo-immunisation HLA par l'administration de concentrés plaquettaires déleucocytés⁶³.

(3) Transfusion de plasma frais congelé

Le plasma contient des molécules HLA solubles⁶⁴, qui sont retrouvées dans les préparations de plasma frais congelé⁶⁵. Le rôle potentiel de ces molécules HLA solubles dans une allo-immunisation HLA n'est pas démontré ou infirmé en l'absence d'études récentes à ce sujet. Une étude datant de 1982 évaluant par microlymphotoxicité la présence d'anticorps anti-HLA avant et après l'injection de plasma allogénique chez 18 patients hémodialysés montrait l'apparition d'anticorps anti-HLA⁶⁶.

A l'heure actuelle, les préparations de plasma frais congelé sont déleucocytées et contiennent moins de 10^4 leucocytes par unité⁶⁷. La possibilité d'immunisation anti-HLA suite à la transfusion de plasma frais congelé non déleucocyté a été suggérée, mais elle reste à démontrer in vivo et à étudier suite à la transfusion de plasma déleucocyté⁶⁸.

c) *Transplantation*

La transplantation d'organe solide est une cause majeure de développement d'anticorps anti-HLA chez le receveur. La proportion de patients qui présentent des anticorps anti-HLA augmente avec le temps passé depuis la transplantation. Ces immunisations ne sont pas limitées aux spécificités incompatibles de classe I ou de classe II du greffon⁶⁹.

2. Autres anticorps

a) *Anticorps anti-HLA naturels*

Depuis l'avènement des immuno-essais en phase solide, l'existence d'anticorps anti-HLA spontanés ou naturels, c'est-à-dire en l'absence d'événement immunisant avéré a été décrite.

Dans une étude portant sur des donneurs de sang suisses (262 femmes et 118 hommes), 24% des 238 sujets n'ayant pas d'antécédent d'événement immunisant présentaient des anticorps anti-HLA en technique Luminex[®] (tests de dépistages avec un ratio NBG à 2 et identifications *single antigen* avec un seuil de MFI de 500)⁷⁰.

Morales-Buenrostro *et al.*, dans une étude portant sur 424 donneurs de sang mexicains de sexe masculin sans antécédent d'événement immunisant, montrent que des anticorps anti-HLA étaient détectés chez 63% d'entre eux avec un seuil fluorescence de 1000 en technique *single antigen* avec détection Luminex[®]. Ces résultats étaient reproductibles sur plusieurs sérums successifs⁷¹.

Une fréquence élevée d'anticorps dirigés contre certaines spécificités antigéniques était observée : en classe I, les anticorps dirigés contre A*3002, A*3101, B*1512 (B76), B*8201, Cw*1701 étaient retrouvés chez plus de 10% des sujets. En classe II, les anticorps dirigés contre DPA1*0201/DPB1*0101 (DPw1) et DQA1*0503/DQB1*0301 étaient les plus fréquents, également retrouvés chez plus de 10% des sujets⁷¹.

Dans la même étude, un typage HLA a été effectué chez 30 des sujets testés pour savoir si les anticorps anti-HLA détectés correspondaient à des auto-anticorps : seul un des sujets présentait un auto-anticorps, ce sujet possédait également des allo-anticorps.

L'origine suspectée de ces anticorps naturels est une réaction d'immunité croisée suite à une infection, une vaccination, une réaction allergique ou l'ingestion de protéines, favorisés par un contexte pro-inflammatoire. Aucune étude n'a véritablement démontré de lien entre ces facteurs suspectés et l'apparition d'anticorps anti-HLA.

Une autre hypothèse est que certains anticorps anti-HLA naturels sont des auto-anticorps anti-HLA-E (les molécules HLA-E sont des antigènes HLA non classiques ou de type Ib, peu polymorphes). En effet, une association a été montrée entre la présence d'anticorps anti-HLA de classe I classiques et la présence d'anticorps anti-HLA-E dans le sérum de sujets de sexe masculin en bonne santé sans antécédent d'événement immunisant⁷².

Gao *et al.* ont mis en évidence chez deux patients transplantés rénaux la présence de clones de lymphocytes B monoclonaux sécrétant des immunoglobulines G poly réactives capables de lier des molécules HLA dénaturées, des molécules HLA natives n'ayant pas d'épitopes partagés, divers auto-antigènes (lipopolysaccharide, insuline, ADN double-brin) et des cellules Jurkat apoptotiques. Les auteurs ont également mis en évidence à partir de sérums de patients en attente de greffe une corrélation entre le nombre de spécificités reconnues par les anticorps anti-HLA détectés par SAB et la réactivité par rapport à des cellules Jurkat (lignées immortalisées de lymphocytes T humains) apoptotiques. Ces anticorps poly réactifs pourraient correspondre aux anticorps anti-HLA naturels détectés chez les sujets n'ayant pas d'antécédent d'événement immunisant. Les auteurs de cette étude suggèrent que ces clones de lymphocytes B ont été activés soit suite à l'exposition à un antigène spécifique, soit qu'il s'agit de lymphocytes B « innés » qui produisent des immunoglobulines M poly réactives ayant subi une commutation isotypique suite à une stimulation par un antigène non-spécifique, en contexte inflammatoire⁷³.

Il existe peu d'études sur la pertinence clinique des DSA naturels. Sicard *et al.* ont étudié 37 patients de sexe masculin ayant une 1^{ère} transplantation rénale et n'ayant pas d'antécédent de transfusion mais présentant des DSA en pré-greffe détectés par la technique *single antigen* avec une MFI seuil à 300. Six patients ont présenté un rejet humoral. Sur 21 patients chez qui un cross-match en cytométrie de flux a été réalisé, 10 étaient positifs. Cette étude ne comparait cette population avec aucune autre et ne permettait pas de conclure à une différence

de risque par rapport à l'absence de DSA ou la présence de DSA avec antécédent d'événement immunisant⁷⁴.

b) Anticorps dirigés contre des molécules HLA dénaturées

La prévalence importante d'anticorps anti-HLA naturels détectés avec les immuno-essais en phase solide a généré une interrogation sur la cible exacte de ces anticorps naturels. Parmi les anticorps anti-HLA naturels qui peuvent être détectés, il a été identifié que certains sont dirigés contre des molécules HLA de classe I dénaturées (dont la chaîne α est dissociée de la β 2-microglobuline et du peptide présenté). Il a par la suite été démontré qu'il existait également des anticorps dirigés contre des molécules HLA de classe II dénaturées^{75,26}.

Les anticorps naturels dirigés contre des molécules HLA dénaturées ne semblent pas avoir de retentissement sur le risque de rejet et la survie du greffon, ils seraient à considérer comme des faux positifs de certaines techniques de détection^{27,28,29,30}.

Cependant, en 2016, Cai *et al.* ont publié une étude selon laquelle les anticorps anti-HLA dénaturé fixant le complément détectés en post-greffe étaient associés à un moins bon pronostic de greffe. Au contraire, les anticorps anti-HLA dénaturé ne fixant pas le complément n'étaient pas associés à un pronostic péjoratif. Il est à noter que cette étude n'intègre pas de données sur les anticorps en pré-greffe⁷⁵.

II. Justification de l'étude et objectifs

A. Justification de l'étude

L'origine de ce travail de thèse est le ressenti d'une augmentation récente de la prévalence des immunisations anti-HLA en pré-greffe chez les enfants suivis au CHU de Bordeaux, en particulier chez ceux n'ayant pas d'événement immunisant connu préalable. Peu d'études existent en pédiatrie sur la prévalence des anticorps anti-HLA, soulevant ainsi plusieurs questions : facteurs favorisant leur apparition, impact sur l'accès à la greffe et risque immunologique pour la greffe.

B. Objectifs

Les objectifs de cette thèse sont :

- de déterminer la prévalence de l'immunisation anti-HLA en pré-greffe rénale chez les enfants suivis au CHU de Bordeaux ;
- de décrire ces immunisations : existence d'un événement immunisant préalable, intensité de l'immunisation, évolution dans le temps des anticorps anti-HLA, pertinence clinique ;
- d'étudier l'hypothèse d'une association entre immunisation HLA et certains facteurs tels que la vaccination, l'infection, l'allergie, la chirurgie, la dialyse, l'auto-immunité.

III. Matériel et méthodes

A. Type d'étude

Il s'agit d'une étude observationnelle rétrospective monocentrique.

B. Population

1. Critères d'inclusion

Ont été inclus tous les patients ayant eu un suivi pré-greffe à l'hôpital des enfants de Bordeaux, depuis l'ouverture du programme de greffe pédiatrique (1^{ère} greffe le 18 Mai 2005) jusqu'au 1^{er} Avril 2017. Certains des patients inclus ont été greffés au CHU de Toulouse ou de Lyon mais le bilan pré-greffe avec recherche d'anticorps anti-HLA a été effectué au CHU de Bordeaux.

2. Critères d'exclusion

Ont été exclus les patients ayant un antécédent de transplantation d'organe.

C. Recueil de données

Le recueil de données a été effectué à partir des dossiers des patients :

- Les résultats des tests de dépistage et d'identification des anticorps anti HLA et des crossmatch ainsi que les typages HLA des donneurs et receveurs ont été fournis par le laboratoire d'immunogénétique du CHU de Bordeaux.
- Le risque immunologique pré-greffe a été évalué selon le protocole du CHU de Bordeaux : risque faible (absence d'anticorps), le patient bénéficie d'un traitement immunosuppresseur standard (traitement d'induction par basiliximab puis une corticothérapie jusqu'à équilibration du traitement par tacrolimus en association au mycophénolate mofétil). Si le risque immunologique est intermédiaire (patients immunisés HLA sans DSA) ou élevé (patients immunisés HLA avec DSA), l'immunosuppression est majorée avec administration de thymoglobuline et, en cas de risque élevé de rituximab.

- Les dates des événements immunisants à type de transfusion de produits sanguins (culots de globules rouges, concentrés plaquettaires, plasma frais congelé) ont été recueillies dans le dossier transfusionnel des patients et vérifiées auprès de l'Etablissement français du sang Aquitaine-Limousin.
- L'existence d'événements immunisants à type de grossesse a été recueillie dans le dossier médical.
- Les vaccinations ont été relevées à partir des carnets de santé et du dossier médical des patients.
- Les antécédents d'allergie, de chirurgie, d'infection avec documentation microbiologique et/ou sévère ayant nécessité une hospitalisation, d'auto-immunité ou de maladie auto-inflammatoire ont été recueillis à partir des dossiers des patients.

Concernant les tests immunologiques :

- Tous les patients inclus ont eu au moins une recherche d'anticorps anti-HLA en pré-greffe effectuée au laboratoire d'immunogénétique du CHU de Bordeaux. La recherche d'anticorps anti-HLA a été effectuée par immuno-essais en phase solide, avec utilisation de microbilles recouvertes d'antigènes HLA avec détection en cytométrie de flux par Luminex[®]. Un premier test de dépistage est réalisé, utilisant le test LABScreen[®] Mixed (One Lambda, Los Angeles, CA). Le seuil de positivité du test de dépistage est réévalué en fonction de chaque lot pour assurer la meilleure reproductibilité possible des résultats. En cas de positivité du test de dépistage, l'identification des spécificités des anticorps est effectuée à l'aide du test LABScreen[®] Single Antigen (One Lambda, Los Angeles, CA) en classe I et II. Un seuil de MFI de 1000 est retenu en pré-greffe pour les antigènes « interdits » rapportés dans Cristal. En post-greffe, un seuil de MFI de 500 est retenu pour la présence de DSA.
- Depuis 2011, les sérums sont préalablement traités à l'EDTA pour éviter les faux négatifs liés à l'interférence du complément.
- Pour 2 patients avec un bilan pré-greffe commencé dans un autre centre, des données supplémentaires de sérums analysés dans d'autres laboratoires selon la même méthode ont été incluses.
- Le taux de greffons incompatibles rapporté dans le logiciel Cristal n'étant pas disponible pour tous les patients, le cPRA a été calculé en utilisant le site américain de l'OPTN (Organ Procurement and Transplantation Network) :

<https://optn.transplant.hrsa.gov/resources/allocation-calculators/cpra-calculator/>. Le calcul a été fait en ne prenant en compte que les loci A, B, DRB1 et DQB1 pour se calquer sur la méthode de calcul du TGI. Ce cPRA est calculé avec une population de donneurs américains, il s'agit donc d'une approximation du TGI.

- Les cross-match ont été réalisés en cytométrie de flux le jour de la greffe pour tous les patients greffés. Les patients présentant un DSA en pré-greffe ont également eu un cross-match en microlymphocytotoxicité.

D. Analyse statistique

Pour la comparaison des valeurs quantitatives, nous avons utilisé le test de Student (Welch Two Sample t-test).

Pour rechercher une association entre l'immunisation anti-HLA et la transfusion de produits sanguins labiles, l'infection, l'allergie, la chirurgie, la dialyse, l'auto-immunité, nous avons calculé des risques relatifs en analyse univariée. Le test du χ^2 de Pearson a été utilisé pour déterminer la valeur de p.

Pour rechercher une association entre la vaccination et l'immunisation anti-HLA, nous avons calculé un risque relatif en analyse univariée. En raison du faible effectif, le test exact de Fisher a été utilisé pour déterminer la valeur de p.

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel en ligne : <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>

E. Ethique

S'agissant d'une étude observationnelle rétrospective, l'étude n'a pas été soumise à l'approbation d'un comité de protection des personnes.

IV. Résultats

A. Description de la population

Un total de 60 patients ont eu un bilan pré-greffe à l'hôpital des enfants au CHU de Bordeaux depuis l'ouverture du programme de greffe pédiatrique (1^{ère} greffe le 18 Mai 2005) jusqu'au 1^{er} Avril 2017.

Un patient a été exclu car il avait eu une greffe rénale préalable. Un autre patient greffé à 2 reprises à l'âge pédiatrique n'a été inclus que pour sa première greffe.

Au total, 59 patients ont donc été inclus dans l'étude avec un sexe ratio garçon/fille de 1,7.

Les étiologies de leur insuffisance rénale chronique sont représentées dans 39 % des cas par des maladies génétiques, dans 34% des cas par des hypodysplasies rénales et/ou uropathies malformatives. Les maladies immunologiques représentent 14% des cas. L'étiologie de l'insuffisance rénale terminale n'est pas connue pour 7% des patients.

Parmi ces patients, 47 sont greffés soit 80% de la population (dont 40 greffés au CHU de Bordeaux) avec un âge moyen à la greffe de 10,6 ans. Vingt pour cent des patients sont en attente de greffe au 1er Avril 2017, leur moyenne d'âge est de 11,8 ans.

Tableau 1. Caractéristiques générales de la population

	N	% de la population totale
Nombre de patients	59	100%
Sexe :		
- Féminin	22	37%
- Masculin	37	63%
Etiologies de l'insuffisance rénale :		
- Génétique	23	39%
- Uropathie malformative / hypodysplasie rénale	20	34%
- Immunologique	8	14%
- Autre	4	7%
- Indéterminé	4	7%
Greffes	47	80%
En attente de greffe	12	20%
Dont dialysés	5	
Age moyen à la greffe, en années	10,6 Min - max [1,7-18,9]	-
Age moyen au 1 ^{er} avril 2017 des patients en attente de greffe, en années	11,8 Min - max [4-18,8]	-

On compte 42 greffes avec donneur décédé et 5 greffes avec donneur vivant. Parmi les transplantés, 32% des patients ont reçu une greffe préemptive. Le temps moyen d'attente sur liste de greffe est de 180 jours. Les patients ont en moyenne 2,5 incompatibilités en classe I et 1,8 incompatibilités en classe II. Toutes les greffes sont ABO compatibles.

Tableau 2. Caractéristiques des patients greffés

	N (%)
Greffés	47
Greffe donneur vivant	5 (11%)
Greffe donneur décédé	42 (89%)
Greffe préemptive	15 (32%)
Dialyse pré-greffe	32 (68%)
Temps moyen d'attente sur liste de greffe en jours (donneur décédé)	180 1 ^{er} - 3 ^{ème} quartile : [51-254]
Temps moyen d'attente sur liste de greffe après levée de la CIT en jours (donneur décédé)	141 1 ^{er} - 3 ^{ème} quartile : [48-202]
Nombre moyen d'incompatibilité classe I (HLA-A et B)	2,5 1 ^{er} - 3 ^{ème} quartile : [2-3]
Nombre moyen d'incompatibilités classe II (HLA-DR et DQ)	1,8 1 ^{er} - 3 ^{ème} quartile : [1-2]
Nombre de greffes ABO incompatibles	0

B. Immunisation HLA

1. Prévalence des anticorps anti-HLA en pré-greffe et retentissement sur l'accès à la greffe

Dans notre population, une immunisation anti-HLA a été retrouvée dans 37% des cas.

Parmi les 22 patients immunisés en pré-greffe, 8 le sont en classe I seulement, 6 en classe II seulement et 8 dans les 2 classes (Tableau 3).

Chez les patients immunisés, le cPRA moyen est de 32%. Parmi ces patients, 3 sont hyperimmunisés (cPRA > 85%).

Tableau 3. Immunisation HLA pré-greffe

Immunisés (total)	22	37%
- Classe I seulement	8	14%
- Classe II seulement	6	10%
- Classe I et II	8	14%
Non immunisé	37	63%

La durée moyenne d'attente sur liste de greffe (greffés avec donneur décédé) après levée de la contre-indication temporaire est de 141 jours. Elle est de 175 jours chez les patients immunisés en pré-greffe contre 133 jours chez les patients non-immunisés. Cette différence est non significative ($p=0,38$).

Si nous considérons la durée totale moyenne d'attente sur liste de greffe (greffés donneur décédé), elle est significativement plus longue chez les patients immunisés, avec une durée d'attente moyenne de 304 jours contre 151 jours chez les non immunisés ($p=0,04$).

2. Evolution de la proportion de patients immunisés

Il est à noter une augmentation significative de la proportion de patients avec présence d'anticorps anti-HLA en pré greffe avec les années (Figure 4 et Figure 5). En régression linéaire, le coefficient de corrélation est à 0,8 ($p=0,0003$). En parallèle, on n'observe pas d'augmentation de la proportion de patients ayant eu des événements immunisants tels que la transfusion (Figure 6).

Figure 4. Evolution du pourcentage de patients immunisés en pré-greffe en fonction de l'année du bilan pré-greffe

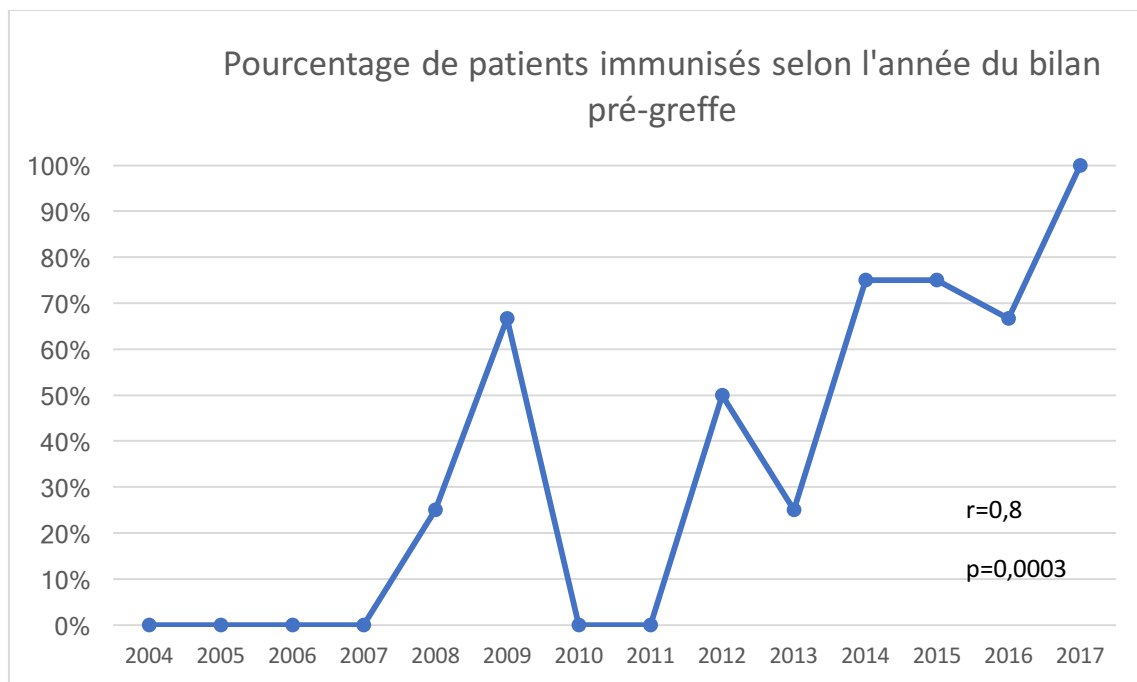


Figure 5. Evolution du nombre de patients immunisés et non immunisés en fonction de l'année du bilan pré-greffe

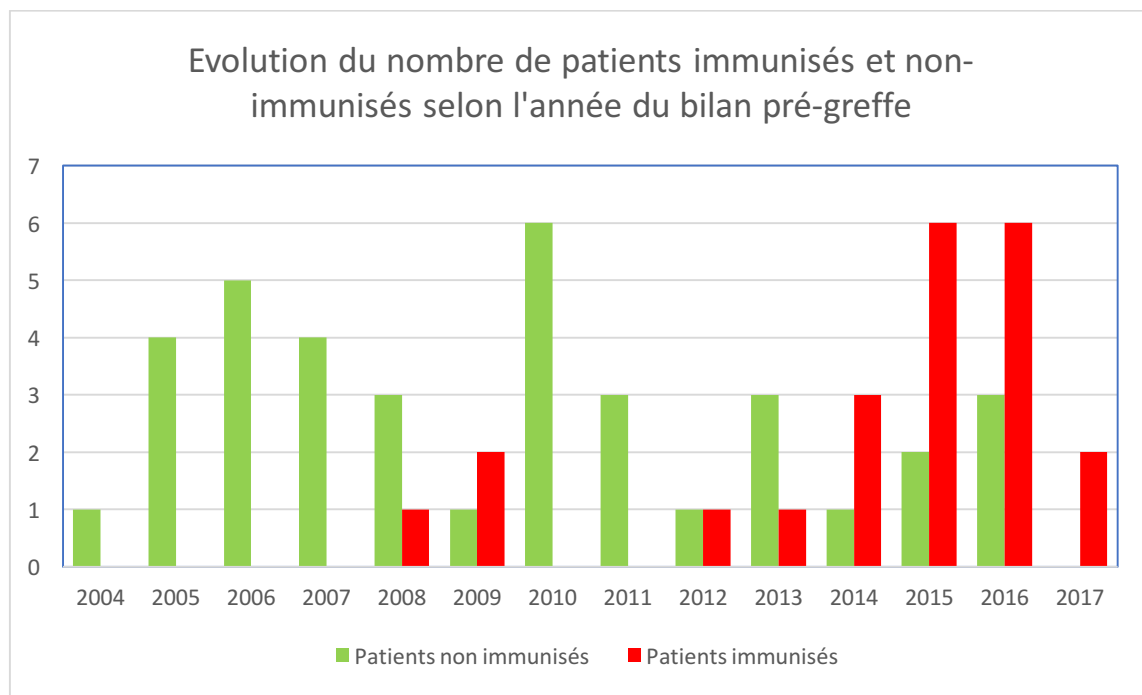
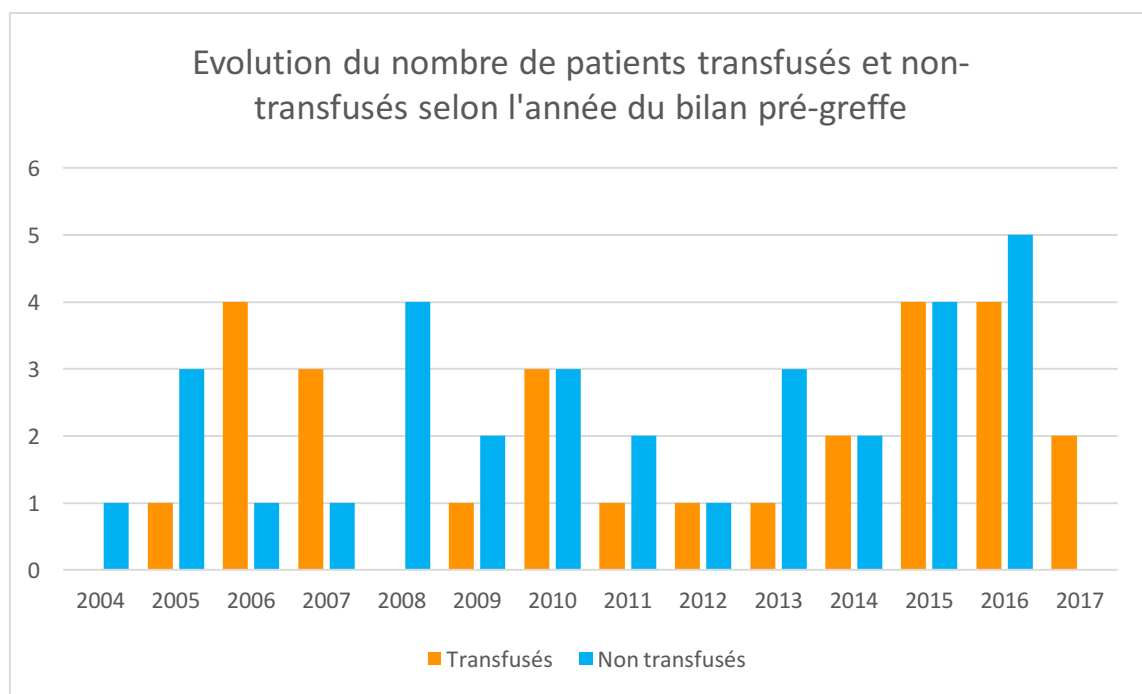


Figure 6. Evolution du nombre de patients transfusés et non-transfusés selon l'année du bilan pré-greffe



3. Anticorps naturels

On détecte des anticorps anti-HLA chez 28% soit 9 des 32 patients sans antécédent d'événement immunisant.

4. Facteurs de risque avérés et suspectés d'immunisation anti-HLA

Sur la population totale, 27 patients ont un antécédent de transfusion soit 46% de la population. Aucune des patientes n'a d'antécédent de grossesse.

Tableau 4. Facteurs de risques avérés et suspectés d'immunisation anti-HLA chez les patients immunisés et non immunisés

Antécédents	Immunisés N =22	Non immunisés N=37	Population totale N=59
Transfusion	13 (59%)	14 (38%)	27 (46%)
- CGR	12 (55%)	14 (38%)	26 (44%)
- plaquettes	3 (14%)	3 (8%)	6 (10%)
- PFC	2 (9%)	3 (8%)	5 (8%)
Grossesse	0	0	0
Allergie	10 (45%)	6 (16%)	16 (27%)
Infection sévère et/ou documentée microbiologiquement	17 (77%)	24 (65%)	41 (69%)
Chirurgie	20 (91%)	34 (92%)	54 (92%)
Dialyse	13 (59%)	24 (65%)	37 (63%)
Auto-immunité ou auto-inflammation	2 (9%)	4 (11%)	6 (10%)
Vaccinations	22 (100%)	37 (100%)	59 (100%)

5. Association entre événements immunisants connus et anticorps anti-HLA

Le cPRA moyen est de 35% pour les patients ayant des antécédents de transfusion contre 26% pour les patients n'ayant pas d'antécédent d'événement immunisant ($p=0,50$).

Les patients hyperimmunisés avaient tous des antécédents de transfusion.

59% des patients immunisés ont un ou plusieurs antécédents de transfusion (tous types) contre 38% des non immunisés.

Le risque relatif d'immunisation anti-HLA en cas de transfusion (tous types) est de 1,71 avec un IC95% [0,87 ; 3,37] ; $p=0,11$; il n'apparaît pas comme significatif.

Il n'y avait pas de différence significative pour la transfusion de culots de globules rouges (CGR), de plaquettes ou de plasma frais congelé (PFC) entre immunisés et non immunisés.

La durée moyenne entre la dernière transfusion et la greffe est de 4 ans et 1 mois.

Tableau 5. Association entre événements immunisants connus et anticorps anti-HLA

Antécédents	Risque relatif	IC95%	p
Transfusion (tous types)	1,71	[0,87 ; 3,37]	0,11
Transfusion de CGR	1,52	[0,78 ; 2,96]	0,21
Transfusion de plaquettes	1,39	[0,58 ; 3,35]	0,66
Transfusion de PFC	1,08	[0,35 ; 3,34]	1

6. Association entre événements immunisants suspectés et anticorps anti-HLA

En analyse univariée, seul l'antécédent d'allergie apparaît corrélé à la présence d'anticorps anti-HLA en pré-greffe, avec un risque relatif à 2,24 ; IC95% [1,21 ; 4,13] ; $p=0,01$.

Les antécédents d'infection sévère, de chirurgie, de dialyse, d'auto-immunité n'apparaissent pas comme associés à la présence d'anticorps anti-HLA en pré-greffe (Tableau 4).

Tableau 6. Association entre antécédents des patients et présence d'anticorps anti-HLA.

Antécédents	Risque relatif	IC95%	p
Allergie	2,24	[1,21 ; 4,13]	0,01
Infection sévère et/ou documentée microbiologiquement	1,49	[0,65 ; 3,42]	0,31
Chirurgie	0,93	[0,30 ; 2,86]	0,89
Dialyse	0,86	[0,44 ; 1,67]	0,65
Auto-immunité	0,88	[0,27 ; 2,88]	0,83

Tous les enfants de la cohorte ont été vaccinés en suivant les recommandations du Haut Conseil de la santé publique sur les vaccinations des personnes immunodéprimées.

Nous avons étudié la corrélation entre l'apparition d'une immunisation pendant le bilan pré-greffe et une vaccination pendant le bilan.

Deux groupes ont été constitués :

- un premier groupe « absence d'immunisation en cours de bilan » incluant tous les patients ayant un 1^{er} sérum négatif et au moins un sérum de suivi en pré-greffe et pour lesquels les vaccinations ont pu être recueillies (19 patients). 7 patients pour lesquels les vaccinations n'ont pas pu être recueillies n'ont pas été pris en compte.
- un deuxième groupe « immunisation en cours de bilan », incluant tous les patients ayant un premier sérum négatif dans une classe et au moins un sérum de suivi pré-greffe positif dans cette même classe (9 patients dont 3 s'immunisent en classe I, 3 en classe II et 3 en classe I et II).

Nous avons comparé la proportion d'enfants ayant reçu des vaccinations pendant le bilan pré-greffe (entre 1 semaine avant le 1^{er} sérum et 1 semaine avant le dernier sérum) dans ces 2 groupes.

Le risque relatif d'immunisation en cas de vaccination au cours de bilan était de 0,8 avec un IC95% [0,26-2,44] ; p=1.

Nous avons également étudié le risque relatif dans les sous-groupes vaccins vivants et vaccins non vivants, il n'existait pas de différence significative.

7. Description des immunisations

a) Dans l'ensemble de la population

En classe I, le nombre médian d'antigènes interdits par patient est de 3 (minimum 1 et maximum 26).

Les antigènes interdits les plus fréquents sont A24, B49, B67 et B76 (5 patients soit 8% de la population totale sont immunisés contre ces spécificités) (Tableau 7).

En classe I, on retrouve 100 spécificités avec une MFI > 1000 dont 7 spécificités avec une MFI > 10000 qui sont toutes observées chez un seul patient (7%), 25 spécificités avec une MFI entre 3000 et 10000 (25%) et 68 spécificités avec une MFI entre 1000 et 3000 (68%).

Tableau 7. Fréquence des spécificités chez les patients immunisés en classe I

A24	B49	B67	B76	A23	B44	B57	B58	B82	A25	A68	B37	B45	B52	B63
31%	31%	31%	31%	25%	25%	25%	25%	25%	19%	19%	19%	19%	19%	19%

A 1	A 2	A26	A29	A32	A34	A66	B38	B46	B51	B53	Cw15	A69	A80	B 8
13%	13%	13%	13%	13%	13%	13%	13%	13%	13%	13%	13%	6%	6%	6%

B13	B35	B41	B48	B50	B55	B59	B71	B73	B77	Cw 1	Cw 4	Cw 5	Cw12	Cw16
6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%	6%

Cw17	A11	A30	A31	A33	A36	A43	A74	B 7	B18	B27	B39	B42	B47	B54
6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

B56	B60	B61	B62	B64	B65	B72	B75	B78	B81	Cw 2	Cw 6	Cw 7	Cw 8	Cw 9
0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Cw10	Cw14	Cw18
0%	0%	0%

En classe II, le nombre médian d'antigènes interdits par patient est de 2 (minimum 0 et maximum 8).

Les deux antigènes contre lesquelles on trouve le plus de patients immunisés sont DR4 et DR16 (Tableau 8).

Treize patients (soit 22% de la population totale et 93% des patients immunisés en classe II) possèdent des anticorps dirigés contre l'ensemble ou une partie des allèles DR4 dont 5 patients qui sont eux-mêmes DR4 et ont donc des anticorps dirigés contre des antigènes du soi.

Sept patients (soit 12% de la population totale et 50% des patients immunisés en classe II) possèdent des anticorps dirigés contre l'ensemble ou une partie des allèles DR16 dont 1 patient qui est lui-même DR16.

En classe II, on retrouve 92 spécificités avec une MFI>1000, dont 1 spécificité avec une MFI>10000 (1%), 16 spécificités avec une MFI entre 3000 et 10000 (17%) et 75 spécificités avec une MFI entre 1000 et 3000 (82%).

Tableau 8. Fréquence des spécificités chez les patients immunisés en classe II

DR4	DR16	DP11	DR17	DR12	DR 7	DQ9	DQ8	DR18	DR11	DR9	DQ7	DP19	DP1	DR13
93%	50%	43%	36%	29%	29%	29%	29%	21%	21%	21%	21%	21%	21%	14%

DQ6	DQ5	DQ4	DP5	DP3	DR15	DR14	DR103	DR10	DR1	DP28	DP23	DP20	DP15	DP13
14%	14%	14%	14%	14%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%	7%

DP10	DP9	DP6	DP4	DR8	DQ2	DP18	DP17	DP14	DP2
7%	7%	7%	7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

b) Profils notables d'immunisation anti-HLA chez des patients sans antécédent d'événement immunisant

Nous décrivons ci-après deux patients qui présentent des anticorps anti-HLA préformés en l'absence d'antécédent d'événement immunisant.

La patiente 1 présente sur tous les sérums prélevés des anticorps anti-HLA uniquement en classe I, avec 19 antigènes interdits dans Cristal et une MFI moyenne élevée, à 8897. Son cPRA est à 57%. Elle présente une immunisation dirigée contre l'épitope Bw4 (séquence IALR) (Figure 3).

Deux cross matches en cytométrie de flux ont été réalisés avec les cellules de deux donneurs :

- Le premier crossmatch était positif sur lymphocytes T avec un donneur porteur hétérozygote des antigènes HLA A24 et B58 (pour une valeur de MFI de 5940 pour l'antigène A24 et 6443 pour l'antigène B58 sur le sérum testé)
- Le deuxième crossmatch était négatif sur lymphocytes T avec un donneur porteur hétérozygote de l'antigène HLA B57 (pour une valeur de MFI de 5737 pour l'antigène B57 sur le sérum testé)

La patiente 1 n'a aucun antécédent de transfusion ou de grossesse. Elle a des antécédents de chirurgie, d'infections virales documentées (non sévères) et d'allergie. Elle n'a pas d'antécédent d'auto-immunité et n'a jamais été dialysée. Elle possède des anticorps dirigés contre des antigènes HLA portés par son père et sa mère.

Figure 7. Profil d'immunisation de la patiente 1 (n'ayant pas d'antécédent d'événement immunisant) : anticorps anti-IALR

EVENEMENT										13/12/16	03/08/16	18/05/16
1	NC									EDTA	EDTA	EDTA
10	A*2301	A23	Bw4	IALR		1C	2C			2583	5448	3894
11	A*2402	A24	Bw4	IALR		1C	2C			3347	5406	3295
12	A*2403	A24	Bw4	IALR		1C	2C			4437	6474	3957
13	A*2501	A25	Bw4	IALR	A10				10C	11968	14119	10933
21	A*3201	A32	Bw4	IALR	A19				10C	14511	15853	13143
45	B*1513	B77	Bw4	IALR			5C			5275	6402	4290
46	B*1516	B63	Bw4	IALR			5C			13337	15143	11558
51	B*3801	B38	Bw4	IALR						2823	5215	3334
60	B*4901	B49	Bw4	IALR			5C		12C	21621	21874	20101
65	B*5101	B51	Bw4	IALR			5C			19306	20337	18140
66	B*5102	B51	Bw4	IALR			5C			19963	21375	19376
67	B*5201	B52	Bw4	IALR			5C			19820	21114	18375
68	B*5301	B53	Bw4	IALR			5C			3059	4588	3051
72	B*5701	B57	Bw4	IALR		2C	5C			3699	6771	4152
73	B*5703	B57	Bw4	IALR		2C	5C			2738	4703	3224
74	B*5801	B58	Bw4	IALR		2C	5C			4272	6443	4182
75	B*5901	B59	Bw4	IALR				8C		15140	17038	13549
36	B*1302	B13	Bw4	TALR			7C		12C			
57	B*4402	B44	Bw4	TALR					12C	4068	273	78
58	B*4403	B44	Bw4	TALR					12C	337	243	106
97	B*1301	B13	Bw4	TALR			7C		12C	54	80	-4
16	B*2705	B27	Bw4	TLLR			7C			99	200	54
50	B*3701	B37	Bw4	TLLR			7C		12C	1402	783	599
61	B*4701	B47	Bw4	TLLR			7C		12C	70	99	0
1	NC raw									36	49	20
2	PC raw									16870	13032	11865
3	A*0101	A 1			A1	1C				93	110	15
4	A*0201	A 2				2C				34	173	21
5	A*0203	A 2				2C				114	382	99
6	A*0206	A 2				2C				-48	42	-65
7	A*0301	A 3			A1	1C				66	143	40
8	A*1101	A11			A1	1C			10C	32	32	-27
9	A*1102	A11			A1	1C			10C	748	364	179
14	A*2601	A26			A10				10C	35	71	-13
15	A*2901	A29			A19	1C				213	719	183
17	A*2902	A29			A19	1C				277	818	229
18	A*3001	A30			A19	1C				-6	59	-16
19	A*3002	A30			A19	1C				-16	44	-41
20	A*3101	A31			A19	1C				-50	9	-71
22	A*3301	A33			A19				10C	68	219	40

Le patient 2 présente sur tous les sérums prélevés des anticorps anti-HLA uniquement en classe II, avec 7 spécificités interdites dans Cristal. La MFI moyenne pour ces anticorps est à 2440. Son cPRA est à 71%. Il présente des anticorps anti-DR4 et anti-DR16 dirigés contre des antigènes du soi.

8. Risque immunologique au moment de la greffe

Sur les 47 patients greffés au 1^{er} Avril 2017, les résultats des cross-match en cytométrie de flux sont disponibles pour 42 patients. Ils sont tous retenus comme négatifs (tous étaient négatifs sur lymphocytes T. Quatorze étaient positifs sur lymphocytes B dont 12 avec un auto-crossmatch positif également et 2 avec un auto-crossmatch négatif en l'absence d'immunisation connue et d'événement immunisant récent).

Quatre patients (9% des greffés) ont été greffés avec un cross-match négatif alors qu'un DSA était détecté en pré-greffe, avec une MFI comprise entre 500 et 1000 pour 3 d'entre eux (2 en classe II et 1 en classe I) et une MFI=1100 pour l'un d'entre eux (en classe II).

Chez 3 d'entre eux, le DSA était présent sur le dernier sérum avant greffe (3 patients avec greffe donneur vivant). Chez l'un d'entre eux, le DSA était détecté sur un sérum historique uniquement (greffe donneur décédé).

Le traitement immunosuppresseur d'induction a été majoré pour 2 de ces patients (induction par thymoglobuline en remplacement du basiliximab).

Huit patients (17% des greffés) ont été greffés alors qu'ils avaient des anticorps anti-HLA non dirigés contre le donneur.

Enfin, 35 patients greffés n'avaient pas d'immunisation en pré-greffe.

9. Devenir post-greffe des patients

On ne dispose pas des données du suivi après 3 mois post-greffe pour l'un des patients greffés avec un DSA préformé (suivi hors-centre).

Concernant les 3 autres patients, aucun n'a présenté d'épisode de rejet cellulaire ou humoral, avec un recul entre 4 mois et 2 ans.

Pour l'un des patients, le suivi des DSA en post-greffe est extrêmement compliqué à cause de perfusions hebdomadaires immunoglobulines polyvalentes.

Pour les deux patients restants, le DSA préformé a disparu en post greffe.

On dispose des données d'une biopsie protocolaire à 3 mois de la greffe chez 24 patients. Seul un patient a présenté un épisode de rejet, il s'agit d'un rejet cellulaire. Le débit de filtration glomérulaire moyen calculé selon la formule de Schwartz à 1 an post-greffe est de 89 mL/min/1,73m² contre 82 mL/min/1,73m² à 1 mois post-greffe.

V. Discussion

Les caractéristiques démographiques et cliniques de notre population d'étude sont globalement comparables à celles des enfants présentant une insuffisance rénale terminale dans la population française concernant les étiologies de l'insuffisance rénale chronique, l'âge à la greffe, le sexe ratio, le temps d'attente sur liste de greffe.^{2,3}

Cette étude met en évidence des anticorps anti-HLA préformés chez un tiers (37%) des patients. Dans la littérature, avec le même type de test (dépistage puis identification avec des microbilles et détection Luminex[®]), dans la population de patients adultes en attente de greffe rénale, une prévalence de 20% d'immunisation pré-greffe a été rapportée dans une cohorte Portugaise entre 2007 et 2012 et de 35% en 2010 chez les patients inscrits sur liste d'attente à l'hôpital Saint-Louis à Paris⁷⁶. Nous n'avons pas trouvé de données sur la population pédiatrique en attente de greffe rénale.

Ce résultat n'est pas absolu car il dépend de la technique de recherche d'anticorps, qui n'ont pas toutes la même sensibilité. De plus, avec une même technique, il existe une variabilité inter et intra-laboratoire non négligeable avec les essais utilisant les microbilles avec détection Luminex^{®77,78,79}. Elle est due à l'utilisation de kits provenant de fournisseurs différents, aux lots variables, aux différences de protocole appliqué (réactifs utilisés...) et au seuil de positivité choisi. Cette variabilité peut être corrigée par l'application d'un protocole standardisé^{80,25}. Le réseau Eurotransplant n'utilise pas cette méthode pour définir les antigènes interdits, en raison des disparités qui pourraient en résulter entre les centres en fonction de la façon de définir les antigènes interdits⁸¹.

Nous observons dans notre étude une augmentation au cours des dernières années de la proportion de patients immunisés en pré-greffe. Plusieurs hypothèses ont été étudiées pour expliquer cette augmentation. Nous avons tout d'abord regardé si la population d'étude avait changé au cours des dernières années en termes d'événement immunisant avéré mais nous ne retrouvons pas plus de patients avec des antécédents de transfusions.

Une autre hypothèse peut être une augmentation de sensibilité de la technique de recherche d'anticorps anti-HLA. D'après les observations des immunologistes du CHU de Bordeaux, la détection d'anticorps anti-HLA a également augmenté dans la population adulte. Il est possible que cette augmentation de la proportion de patients immunisés avec le temps soit en

partie expliquée, premièrement par le traitement des sérums par EDTA qui est appliqué depuis 2011, deuxièmement par les changements de lots (le dernier en septembre 2015) et possiblement par d'autres modifications du protocole que nous n'avons pas identifié. Les seuils de MFI n'ont pas été modifiés. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en testant à nouveau les sérums historiques. Une dernière hypothèse peut être une augmentation fortuite liée au faible nombre de patients.

La détection d'anticorps anti-HLA préformés a un impact sur l'accès à la greffe. Dans notre étude, sur les 22 patients immunisés de 2005 à 2017, 3 étaient hyperimmunisés avec un cPRA supérieur à 85%. Ainsi 5% de notre population totale est hyperimmunisée. En comparaison, en France, 11% des patients inscrits entre 2011 et 2015 âgés de 0 à 17 ans ont été hyperimmunisés sur au moins un sérum⁸². La plus faible proportion de patients hyperimmunisés dans notre cohorte peut s'expliquer par l'exclusion des patients ayant déjà été transplantés.

La présence d'anticorps anti-HLA préformés contre-indique certains donneurs potentiels avec comme conséquence une augmentation possible de la durée d'attente sur liste de greffe. Certains patients pourraient voir augmenter la durée du traitement par dialyse avec ses conséquences sur la morbi-mortalité et toutes les répercussions psychosociales. Notre étude retrouve une durée d'attente significativement plus longue pour les patients immunisés par rapport aux patients non immunisés (304 jours contre 151 jours en moyenne). Cette différence peut sembler importante, elle reste cependant bien inférieure aux durées d'attente pour les receveurs adultes.

De nombreux articles débattent chez l'adulte de la balance bénéfice-risque des transplantations en présence de DSA détectés par immuno-essais en phase solide lorsque le cross-match cellulaire est négatif, avec un protocole d'immunosuppression ou de « désimmunisation » adapté, par rapport au traitement par dialyse prolongé⁸³.

L'évaluation du risque lié à la transplantation en présence de DSA ne faisait pas partie des objectifs de l'étude, mais nous notons qu'au 1^{er} Avril 2017, 4 patients de notre cohorte avaient été greffés avec des DSA avec une MFI faible et des crossmatch négatifs. Pour 3 d'entre eux chez qui les données du suivi sont disponibles, il n'y a pas eu d'épisode de rejet humoral (avec un recul entre 4 mois et 2 ans).

La pertinence clinique des anticorps anti-HLA détectés en pré-greffe par la technique des microbilles avec détection Luminex[®] est une question primordiale qui reste à ce jour encore à éclaircir. Une méta-analyse datant de 2012 ³⁴ qui intègre les résultats de sept études rétrospectives ^{35,36,37,38,39,40,41}, montre que la détection de DSA en pré-greffe par des immuno-essais en phase solide, alors que le cross-match en LCT et en CMF était négatif, est associée à une augmentation du risque de rejet humoral et à une diminution de la survie du greffon. Le pronostic de greffe est cependant moins péjoratif en cas de DSA détectés uniquement par immuno-essais en phase solide, comparé à ceux détectés également par les test cellulaires (risque plus élevé lorsque le cross-match en CMF est positif et risque maximal lorsque le cross-match en LCT est positif) ³⁴. Cependant la pertinence clinique des anticorps anti-HLA détectés n'est probablement pas la même pour tous les anticorps : anticorps apparus suite à une exposition à des tissus allogéniques, anticorps naturels, anticorps anti-HLA dénaturé.

Dans notre étude, on détecte des anticorps anti-HLA chez 28% des patients sans aucun antécédent d'exposition à des tissus allogéniques (transfusion, grossesse ou greffe) qui correspondent à des anticorps dits « naturels ». Il existe probablement des anticorps naturels chez les patients ayant des antécédents d'événement immunisants mais ils ne peuvent pas être distingués des anticorps apparus suite à une exposition allogénique. Les patients ayant des anticorps sans antécédent d'événement immunisant ont un cPRA moyen comparable aux patients ayant des antécédents d'événement immunisant.

Ces anticorps naturels ont été largement décrits depuis la publication en 2008 par Morales-Buenrostro *et al.* d'une étude dans laquelle ces anticorps « naturels » étaient retrouvés chez 63% des donneurs de sang de sexe masculin sans antécédent d'événement immunisant⁷¹.

Il n'existe pas d'étude permettant de comparer le pronostic de greffe en cas de DSA naturels préformés versus DSA avec antécédent d'événement immunisant, ni versus absence de DSA. Cependant Sicard *et al.* ont montré que sur 21 patients présentant des DSA naturels en pré-greffe détectés par la technique single antigen, 10 avaient un cross-match positif en cytométrie de flux, suggérant un effet pathogène⁷⁴. Toute la difficulté en présence de tels anticorps est de déterminer leur pathogénicité et le risque immunologique qu'ils font encourir. Nous n'avons pas réalisé de tests cellulaires pour tous les patients qui présentaient des anticorps anti-HLA « naturels ». Cependant, chez une patiente (patiente 1) sans antécédent d'événement immunisant qui présente une immunisation nette dirigée contre la séquence IALR de l'épitope Bw4, avec des MFI élevées, un cross-match en cytométrie de flux s'est révélé positif, en faveur d'un effet pathogène de certains de ces anticorps.

Une autre difficulté dans l'interprétation de ces anticorps anti-HLA est la présence probable d'anticorps anti-HLA dénaturé tant chez les patients ayant des antécédents d'événement immunisants que ceux n'en ayant pas. Nous n'avons cependant pas réalisé de test pour rechercher si les anticorps anti-HLA détectés étaient dirigés contre des molécules HLA dénaturées.

Ces anticorps reconnaissent des molécules HLA de classe I dénaturées (dont la chaîne α est dissociée de la β 2-microglobuline et du peptide présenté). Il a par la suite été montré que certains anticorps pouvaient reconnaître des molécules HLA de classe II dénaturées^{75,26}. Plusieurs études sont en faveur de l'absence de pertinence clinique de ces anticorps lorsqu'ils sont détectés en pré-greffe, raison pour laquelle il serait souhaitable de pouvoir les différencier des anticorps dirigés contre des molécules HLA natives^{27,28,29,30}.

Il est difficile de distinguer ces anticorps dirigés contre des molécules HLA dénaturées : il est possible d'utiliser des tests cellulaires mais ceux-ci ne seront positifs qu'en cas de MFI suffisamment élevée⁸⁴ (faisant courir le risque d'ignorer des anticorps anti-HLA pathogènes en cas de MFI faible), or la majorité des patients de notre cohorte possèdent des anticorps avec une MFI relativement faible. Des publications décrivent l'utilisation des iBeads²⁷ (dépourvues de molécules HLA dénaturées) mais celles-ci ne sont plus commercialisées. Il reste possible, pour les billes One lambda de classe I, de comparer la MFI obtenue avec des billes classiques et avec des billes ayant subi un traitement acide pour dénaturer les molécules HLA. Cependant si cette technique permet de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-HLA dénaturé, elle ne permet pas d'exclure la présence concomitante d'anticorps dirigés contre des molécules HLA natives. Elle présente également un coût élevé²². La Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique a établi en 2016 des recommandations concernant la conduite à tenir vis-à-vis des anticorps naturels et des anticorps anti-HLA dénaturé.

Nous allons maintenant nous attacher aux anticorps les plus fréquemment rencontrés dans notre population :

- En classe I, les antigènes interdits les plus fréquents sont A24, B49, B67 et B76. Si le A24 est répandu dans la population (17%), les autres antigènes (B49 : 3%, B67 <<1%, B76 << 1%) sont très peu répandus. Dans une étude sur les spécificités fréquemment retrouvées chez les patients qui ont des anticorps « naturels », les anticorps dirigés

contre les antigènes B76 (environ 22%) et A24 (9%) étaient également retrouvés de façon fréquente.⁷⁸

- En classe II, les antigènes interdits les plus fréquents sont DR4 et DR16. La quasi-totalité des patients immunisés en classe II ont des anticorps anti-DR4 (13 patients sur 14). Parmi eux, 5 patients sont eux-mêmes porteurs de l'antigène DR4. L'antigène DR4 est présent chez 30% de la population et DR16 chez 4% de la population. Ces résultats, qui sont d'après l'expérience du laboratoire similaires chez les adultes et dans d'autres centres sont fortement en faveur d'une erreur du test de détection, avec pour conséquence d'importantes difficultés pour l'allocation des greffons porteurs de ces spécificités.

Un des objectifs initiaux de cette étude est de rechercher des facteurs influençant la détection d'anticorps anti-HLA chez les enfants en attente de greffe.

Le premier facteur de risque étudié était la transfusion. Il s'agit d'un événement exposant à des molécules HLA allogéniques, qu'il s'agisse d'une transfusion de globules rouges, de plaquettes ou de plasma. Il a été démontré par de nombreuses études que la transfusion induisait le développement d'anticorps anti-HLA (détectés par plusieurs méthodes différentes). Le risque d'immunisation post transfusion est plus faible qu'après une transplantation ou des grossesses mais s'accroît en cas de polytransfusions^{55,57,59,60}.

Dans notre étude, si on notait une tendance à l'augmentation de la fréquence des anticorps anti-HLA chez les patients transfusés, avec un risque relatif à 1,71 (IC 95% [0,87 ; 3,37] ; $p=0,11$) il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes. L'absence de significativité peut être expliquée par le faible effectif de cette étude et donc le manque de puissance. D'autres études plus puissantes avec recherche d'anticorps anti-HLA par microbilles avec détection Luminex[®] ne montraient pas d'augmentation significative du risque chez les sujets transfusés, les auteurs discutaient l'influence d'un délai long depuis les transfusions^{46,56}. On peut se demander si l'effet n'est pas en partie masqué par le facteur de confusion que constituent les anticorps anti-HLA dénaturés détectés.

Notre étude retrouve une association statistiquement significative en analyse univariée entre un antécédent d'allergie et la détection d'anticorps anti-HLA préformés chez les enfants greffés ou en attente de greffe. Le risque relatif est de 2,24 ; IC95% [1,21 ; 4,13] ; $p=0,01$.

L'hypothèse d'un rôle de l'allergie dans le développement d'anticorps anti-HLA « naturels » a été formulée, il n'existe pas à notre connaissance d'étude confirmant cette hypothèse⁷¹.

En raison des biais liés à l'étude rétrospective, au changement probable de sensibilité de la technique de détection d'anticorps anti-HLA et à l'absence d'analyse multivariée, ce résultat demande à être confirmé sur un effectif de patients plus important.

Notre étude ne montre pas d'association significative entre les antécédents d'infection sévère et/ou documentée microbiologiquement et la détection d'anticorps anti-HLA. L'une des hypothèses évoquées par Morales-Buenrostro *et al.* pour expliquer la présence d'anticorps anti-HLA « naturels » est la réactivité croisée avec des peptides bactériens⁷¹. Ainsi plusieurs études réalisées dans le cadre de la recherche sur la spondylarthrite ankylosante et la maladie de Crohn montrent une réactivité croisée entre les molécules HLA B27 et des peptides bactériens exprimés par *Klebsiella pneumoniae*⁸⁵. Une étude par Terasaki et al. a démontré que l'activité d'anticorps anti-HLA en microlymphocytotoxicité pouvait être inhibée par la protéine M1 produite par le streptocoque β -hémolytique du groupe A⁸⁶. De la même façon, il a été montré que des lipopolysaccharides produits par *Escherichia coli* et *Salmonella sp.* pouvaient inhiber l'activité d'anticorps anti-HLA⁸⁷. Cependant, il n'existe pas à notre connaissance d'étude ayant démontré une corrélation entre épisode infectieux et développement d'anticorps anti-HLA *in vivo*. Encore une fois, un manque de puissance de notre étude ne peut être exclu.

Notre étude ne retrouve pas de lien entre le développement d'anticorps anti-HLA et la dialyse ou la chirurgie. Ces facteurs ont été étudiés en raison du contexte inflammatoire qu'ils peuvent générer, qui pourrait favoriser des réactions croisées. A noter que l'on observe une très forte proportion de patients ayant des antécédents de chirurgie (plus de 90%). En effet, toutes les interventions réalisées au bloc opératoire sous anesthésie générale ont été considérées comme des interventions chirurgicales, ce qui inclut toutes les poses de voies veineuses centrales.

L'auto-immunité n'est pas non plus corrélée au développement d'anticorps anti-HLA, cependant une faible proportion de la population avait un antécédent d'auto-immunité.

Concernant la vaccination, en comparant le taux de vaccinations en cours de bilan dans deux sous-groupes (1^{er} groupe de patients pour lesquels une immunisation apparaît en cours de

bilan et deuxième groupe pour lequel aucune immunisation n'apparaît), on ne retrouve pas de différence.

Les données de la littérature sont relativement pauvres à ce sujet, avec des études réalisées sur de faibles effectifs et sans réels groupes contrôles.

Dans une étude de 2011, Delaney *et al.* ont recherché des anticorps anti-HLA avec un test de dépistage en phase solide FlowPRA[®] Screening chez 86 volontaires sains 14 jours après vaccination antigrippale. En cas de positivité, les sérums de J0 et de J14 étaient testés avec identification des spécificités, il n'y avait pas de modification du PRA ou de modification du profil des anticorps⁸⁸.

Dans une étude réalisée en 2009 sur 63 patients transplantés, une recherche d'anticorps anti-HLA était réalisée par SAB à J0 et J30 d'une vaccination antigrippale. La MFI des DSA présents avant vaccination n'était pas modifiée à J30. Chez deux patients préalablement immunisés mais sans DSA, un DSA était détecté à J30, avec des MFI faibles <1000. Chez 4 patients qui n'étaient pas immunisés à J0, des anticorps anti-HLA non dirigés contre le donneur étaient détectés à J30⁸⁹.

Dans une étude de 2000 comparant la présence d'anticorps anti-HLA (technique ELISA) avant et après vaccination antigrippale chez 29 patients transplantés cardiaques, 2 patients développent des anticorps anti-HLA non dirigés contre le donneur, ce résultat n'est pas significatif⁹⁰.

Dans une étude chez des transplantés rénaux réalisée pendant l'épidémie de grippe A H1N1, les auteurs ont évalué la présence d'anticorps anti-HLA avant et 4 à 8 semaines après injection de 2 doses de vaccin anti-grippal avec adjuvant dans 4 cohortes : la première de 92 patients transplantés rénaux, la deuxième de 59 transplantés rénaux non immunisés anti-HLA, la troisième de 24 patients en attente de greffe non immunisés anti-HLA et la quatrième, cohorte historique de 131 patients transplantés rénaux. 20 sujets sains ont également été testés. La recherche d'anticorps anti-HLA s'effectuait avec un test de dépistage (microbilles avec détection Luminex[®]) puis identification en SAB. 16 patients dans la première cohorte, 7 dans la deuxième développent des anticorps anti-HLA et aucun dans la 3^{ème} cohorte ou parmi les sujets sains. L'analyse des sérums à 6 mois chez les patients qui avaient développé des anticorps montrait une disparition ou une diminution de la MFI pour la plupart des anticorps. Les auteurs concluent à une augmentation du taux d'immunisation HLA après vaccination contre la grippe A H1N1, en comparant avec les données de la littérature et avec le taux d'immunisation dans la cohorte historique, mais sans comparer avec un groupe contrôle⁹¹.

Dans une étude portant sur 20 volontaires sains à qui un rappel de vaccin contre l'hépatite B était administré (ainsi qu'un test tuberculinique pour certains), avec recherche d'anticorps anti-HLA par un test de dépistage en phase solide (LABScreen® PRA) à J0, J7, J29 et J50-56 et identification des spécificités en SAB, seule une femme présentait un test de dépistage positif à J0. 9 des 20 sujets ont développé des anticorps anti-HLA de novo, dont 8 à 1 mois et 1 à 2 mois. Ces anticorps n'étaient pas dirigés contre des antigènes du soi. Les sérums ont été testés à plusieurs reprises pour vérifier la reproductibilité des résultats, la détermination des isotypes révélait la présence d'IgG et d'IgM. Les auteurs décrivent la disparition des anticorps chez deux sujets 1 mois après la positivité⁹².

Aucune de ces études ne permet d'apporter de preuve formelle d'une apparition d'anticorps anti-HLA causée par la vaccination. Il faut rappeler que la mise à jour des vaccinations est recommandée lors de la préparation à la transplantation, en raison du risque majoré en cas d'immunosuppression de contracter des infections pouvant être prévenues par la vaccination⁵.

Nous n'avons pas pu étudier le lien avec l'ingestion de protéines animales, un autre facteur suspecté d'être à l'origine d'immunisation HLA par réactivité croisée. En effet, les molécules du CMH des animaux ont un certain degré d'homologie avec les molécules HLA. Des peptides de 10 à 51 acides-aminés pouvant être absorbés intacts par l'intestin, les protéines animales ingérées pourraient induire la production d'anticorps anti-HLA²⁹. La description d'anticorps anti-HLA naturels chez des sujets ayant un régime végétalien est en défaveur de cette hypothèse⁷².

Cette étude comporte plusieurs limites. La première est un biais d'information lié au caractère rétrospectif de l'étude avec des difficultés dans le recueil de données. De plus, une des limites de ce travail est le faible nombre de patients inclus qui est inévitable devant la rareté de l'insuffisance rénale stade V en pédiatrie. Enfin, des modifications des techniques de détection des anticorps anti-HLA entre le début et la fin de cette étude constitue un biais important.

Néanmoins, cette étude est la seule à notre connaissance à faire un état des lieux de la prévalence des anticorps anti-HLA dans une population d'enfants en attente de greffe rénale. Elle pose toutes les questions de la difficulté de l'analyse des anticorps anti-HLA retrouvés et surtout de leurs conséquences sur l'accès à la greffe et l'impact potentiel de ces anticorps sur le greffon.

VI. Conclusion

En conclusion, notre étude met en évidence une augmentation de la prévalence des anticorps anti-HLA chez les enfants en attente de greffe rénale au CHU de Bordeaux, avec un impact sur l'accès à la greffe. Près de la moitié de ces patients immunisés n'ont pas d'antécédent d'événement immunisant. Le seul facteur qui apparaissait associé à l'immunisation HLA dans cette étude était la présence d'un antécédent d'allergie. Ces résultats demandent à être confirmés en raison du faible effectif de l'étude, de sa nature rétrospective et d'une analyse univariée.

La question la plus importante ayant trait à l'immunisation HLA en pré-greffe est la pertinence clinique des anticorps détectés. La sur-détection d'anticorps pourrait réduire l'accès à la greffe de certains patients de façon injustifiée. Cette question est encore largement débattue et des progrès restent à faire pour distinguer les anticorps cliniquement significatifs. Il apparaît essentiel de différencier les anticorps naturels des anticorps apparus suite à une exposition à des tissus allogéniques, de pouvoir distinguer les anticorps dirigés contre des molécules HLA natives de ceux dirigés contre des molécules HLA dénaturées et d'évaluer le risque qu'ils constituent pour la greffe.

L'interprétation de la détection d'anticorps anti-HLA en pré-greffe est plus compliquée qu'un simple résultat positif ou négatif, et la compréhension de ses implications cliniques requiert la communication entre les néphrologues cliniciens et les immunologistes. Cette collaboration est primordiale à tous les stades de la prise en charge : au moment du bilan pré-greffe pour déterminer les antigènes interdits, lors de l'appel greffe pour discuter de l'acceptation ou non du greffon selon le nombre de compatibilités, du risque immunologique, des caractéristiques cliniques du patient, au moment des résultats du cross-match et enfin lors du suivi post-greffe pour le suivi de l'immunisation.

VII. Références bibliographiques

1. Gillen, D. L. *et al.* Survival advantage of pediatric recipients of a first kidney transplant among children awaiting kidney transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **8**, 2600–2606 (2008).
2. Le rapport annuel 2015 du Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie. Available at: https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/rapport_rein_2015.pdf. (Accessed: 30th July 2017)
3. Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2015. Available at: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2015/donnees/organes/09-pediatrie/synthese.htm>. (Accessed: 30th July 2017)
4. Haute Autorité de Santé - Transplantation rénale - Accès à la liste d'attente nationale. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1751188/fr/transplantation-renale-acces-a-la-liste-d-attente-nationale. (Accessed: 13th August 2017)
5. Vaccination des personnes immunodéprimées ou aspléniques. Recommandations actualisées 2014 du Haut Conseil de la santé publique. Available at: <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=504>. (Accessed: 13th August 2017)
6. Agence de la biomédecine - Procédures d'application des règles de répartition et d'attribution des greffons prélevés sur personne décédée. Mise à jour : octobre 2014. Available at: <https://www.agence-biomedecine.fr/Les-regles-de-repartition>. (Accessed: 13th August 2017)
7. Agence de la biomédecine - Recommandations 2010 concernant le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes ou greffés. Available at: <https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/recommandations-concernant-le-suivi-immunologique-des-patients-en-attente-de-greffe-d-organes-ou-greffes.pdf>. (Accessed: 10th August 2017)
8. Marfo, K., Lu, A., Ling, M. & Akalin, E. Desensitization protocols and their outcome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **6**, 922–936 (2011).
9. Candon, S. Transplantation rénale : aspects immunologiques. *EMC - Néphrologie* **1**, 1–15 (2006).
10. Rees, L. & Kim, J. J. HLA sensitisation: can it be prevented? *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **30**, 577–587 (2015).

11. Moalic, V. Comment est réalisé un typage HLA ? *Réanimation* **17**, 407–411 (2008).
12. Gebel, H. M., Bray, R. A. & Nickerson, P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **3**, 1488–1500 (2003).
13. Patel, R. & Terasaki, P. I. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **280**, 735–739 (1969).
14. Cai, J. & Terasaki, P. I. Human Leukocyte Antigen Antibodies for Monitoring Transplant Patients. *Surg. Today* **35**, 605–612 (2005).
15. Lefaucheur, C. *et al.* Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **21**, 1398–1406 (2010).
16. Reynolds, B. C. & Tinckam, K. J. Sensitization assessment before kidney transplantation. *Transplant. Rev. Orlando Fla* **31**, 18–28 (2017).
17. Taylor, C. J., Kosmoliaptsis, V., Summers, D. M. & Bradley, J. A. Back to the future: application of contemporary technology to long-standing questions about the clinical relevance of human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplantation. *Hum. Immunol.* **70**, 563–568 (2009).
18. Otten, H. G., Verhaar, M. C., Borst, H. P. E., Hené, R. J. & van Zuilen, A. D. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **12**, 1618–1623 (2012).
19. Issa, N. *et al.* Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* **86**, 681–685 (2008).
20. Wu, P. *et al.* Impact of alloantibody strength in crossmatch negative DSA positive kidney transplantation. *Clin. Biochem.* **46**, 1389–1393 (2013).
21. Salvadé, I. *et al.* Clinically-relevant threshold of preformed donor-specific anti-HLA antibodies in kidney transplantation. *Hum. Immunol.* **77**, 483–489 (2016).
22. Middleton, D., Jones, J. & Lowe, D. Nothing's perfect: The art of defining HLA-specific antibodies. *Transpl. Immunol.* **30**, 115–121 (2014).
23. Zachary, A. A., Lucas, D. P., Detrick, B. & Leffell, M. S. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum. Immunol.* **70**, 496–501 (2009).
24. Tait, B. D. *et al.* Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* **95**, 19–47 (2013).

25. Reed, E. F. *et al.* Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for the detection of antibodies to HLA. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **13**, 1859–1870 (2013).
26. Grenzi, P. C., de Marco, R., Silva, R. Z. R., Campos, E. F. & Gerbase-DeLima, M. Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay. *Hum. Immunol.* **74**, 1300–1303 (2013).
27. Visentin, J. *et al.* Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. *Transplantation* **98**, 738–744 (2014).
28. El-Awar, N. *et al.* Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum. Immunol.* **70**, 844–853 (2009).
29. Cai, J., Terasaki, P. I., Anderson, N., Lachmann, N. & Schönemann, C. Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* **88**, 226–230 (2009).
30. Otten, H. G. *et al.* The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* **173**, 536–543 (2013).
31. Weinstock, C. & Schnaidt, M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int. J. Immunogenet.* **40**, 171–177 (2013).
32. Zachary, A. A., Sholander, J. T., Houp, J. A. & Leffell, M. S. Using real data for a virtual crossmatch. *Hum. Immunol.* **70**, 574–579 (2009).
33. Zachary, A. A., Montgomery, R. A. & Leffell, M. S. Defining unacceptable HLA antigens. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **13**, 405–410 (2008).
34. Mohan, S. *et al.* Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **23**, 2061–2071 (2012).
35. Couzi, L. *et al.* Interpretation of Positive Flow Cytometric Crossmatch in the Era of the Single-Antigen Bead Assay: *Transplantation* **91**, 527–535 (2011).
36. Gupta, A. *et al.* Pretransplant Donor-Specific Antibodies in Cytotoxic Negative Crossmatch Kidney Transplants: Are They Relevant?: *Transplantation* **85**, 1200–1204 (2008).
37. Higgins, R. *et al.* Human Leukocyte Antigen Antibody-Incompatible Renal Transplantation: Excellent Medium-Term Outcomes With Negative Cytotoxic Crossmatch: *Transplantation* **92**, 900–906 (2011).

38. Patel, A. M., Pancoska, C., Mulgaonkar, S. & Weng, F. L. Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **7**, 2371–2377 (2007).
39. Verghese, P. S. *et al.* Impaired graft survival in pediatric renal transplant recipients with donor-specific antibodies detected by solid-phase assays. *Pediatr. Transplant.* **14**, 730–734 (2010).
40. Vlad, G. *et al.* Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. *Hum. Immunol.* **70**, 589–594 (2009).
41. Willicombe, M. *et al.* Outcome of patients with preformed donor-specific antibodies following alemtuzumab induction and tacrolimus monotherapy. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 470–477 (2011).
42. Caro-Oleas, J. L. *et al.* Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **27**, 1231–1238 (2012).
43. Gibney, E. M. *et al.* Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **21**, 2625–2629 (2006).
44. Dunn, T. B. *et al.* Revisiting Traditional Risk Factors for Rejection and Graft Loss After Kidney Transplantation: Immunologic Risk Factors in Kidney Transplantation. *Am. J. Transplant.* **11**, 2132–2143 (2011).
45. Densmore, T. L., Goodnough, L. T., Ali, S., Dynis, M. & Chaplin, H. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion (Paris)* **39**, 103–106 (1999).
46. Triulzi, D. J. *et al.* The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion (Paris)* **49**, 1825–1835 (2009).
47. Powers, A. *et al.* Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion (Paris)* **48**, 2549–2558 (2008).
48. Masson, E. *et al.* Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum. Immunol.* **74**, 946–951 (2013).
49. Everett, E. T., Kao, K. J. & Scornik, J. C. Class I HLA molecules on human erythrocytes. Quantitation and transfusion effects. *Transplantation* **44**, 123–129 (1987).

50. Pfaff, W. W., Fennell, R. S., Howard, R. J., Ireland, J. F. & Scornik, J. C. Planned random donor blood transfusion in preparation for transplantation. Sensitization and graft survival. *Transplantation* **38**, 701–703 (1984).
51. Salvatierra, O. *et al.* Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach. *Ann. Surg.* **192**, 543–552 (1980).
52. Aalten, J. *et al.* Pre-kidney-transplant blood transfusions do not improve transplantation outcome: a Dutch national study. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **24**, 2559–2566 (2009).
53. Opelz, G., Graver, B., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I. Lymphocytotoxic antibody responses to transfusions in potential kidney transplant recipients. *Transplantation* **32**, 177–183 (1981).
54. Karpinski, M. *et al.* Leukocyte reduction of red blood cell transfusions does not decrease allosensitization rates in potential kidney transplant candidates. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 818–824 (2004).
55. Scornik, J. C. *et al.* Increased antibody responsiveness to blood transfusions in pediatric patients. *Transplantation* **58**, 1361–1365 (1994).
56. Kakaiya, R. M. *et al.* Prevalence of HLA antibodies in remotely transfused or alloexposed volunteer blood donors. *Transfusion (Paris)* **50**, 1328–1334 (2010).
57. Kumpati, G. S. *et al.* HLA sensitization in ventricular assist device recipients: does type of device make a difference? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **127**, 1800–1807 (2004).
58. Massad, M. G. *et al.* Factors influencing HLA sensitization in implantable LVAD recipients. *Ann. Thorac. Surg.* **64**, 1120–1125 (1997).
59. Reisner, E. G., Kostyu, D. D., Phillips, G., Walker, C. & Dawson, D. V. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens* **30**, 161–166 (1987).
60. Rebibou, J.-M. *et al.* Flow cytometric evaluation of pregnancy-induced anti-HLA immunization and blood transfusion-induced reactivation. *Transplantation* **74**, 537–540 (2002).
61. Scornik, J. C. & Meier-Kriesche, H.-U. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 1785–1791 (2011).
62. Kao, K. J., Cook, D. J. & Scornik, J. C. Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood* **68**, 627–632 (1986).
63. Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet

transfusions. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1861–1869 (1997).

64. Bassani-Sternberg, M. *et al.* Soluble plasma HLA peptidome as a potential source for cancer biomarkers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18769–18776 (2010).

65. Pandey, S. & Vyas, G. N. Adverse effects of plasma transfusion: ADVERSE EFFECTS OF PLASMA TRANSFUSION. *Transfusion (Paris)* **52**, 65S–79S (2012).

66. Pellegrino, M. A., Indiveri, F., Fagiolo, U., Antonello, A. & Ferrone, S. Immunogenicity of serum HLA antigens in allogeneic combinations. *Transplantation* **33**, 530–533 (1982).

67. Recommandation HAS - Transfusion de plasma thérapeutique: produits, indications. Actualisation 2012. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-06/12irp07_reco_transfusion_de_plasma.pdf. (Accessed: 15th August 2017)

68. Hiruma, K. & Okuyama, Y. Effect of leucocyte reduction on the potential alloimmunogenicity of leucocytes in fresh-frozen plasma products. *Vox Sang.* **80**, 51–56 (2001).

69. Lachmann, N. *et al.* Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* **87**, 1505–1513 (2009).

70. Sigle, J.-P. *et al.* Anti-leucocyte antibodies in platelet apheresis donors with and without prior immunizing events: implications for TRALI prevention. *Vox Sang.* **105**, 244–252 (2013).

71. Morales-Buenrostro, L. E. *et al.* ‘Natural’ human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* **86**, 1111–1115 (2008).

72. Ravindranath, M. H., Kaneku, H., El-Awar, N., Morales-Buenrostro, L. E. & Terasaki, P. I. Antibodies to HLA-E in nonalloimmunized males: pattern of HLA-Ia reactivity of anti-HLA-E-positive sera. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 1935–1948 (2010).

73. Gao, B. *et al.* Evidence to Support a Contribution of Polyreactive Antibodies to HLA Serum Reactivity. *Transplantation* **100**, 217–226 (2016).

74. Sicard, A. *et al.* Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **14**, 193–201 (2014).

75. Cai, J. *et al.* Complement-fixing antibodies against denatured HLA and MICA antigens are associated with antibody mediated rejection. *Exp. Mol. Pathol.* **100**, 45–50 (2016).

76. Malheiro, J. *et al.* Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl. Immunol.* **32**, 66–71 (2015).
77. Israeli, M. *et al.* Concordance and discordance in anti-HLA antibody testing. *Transpl. Immunol.* **32**, 1–8 (2015).
78. Gombos, P. *et al.* Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **13**, 2075–2082 (2013).
79. Tait, B. D. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front. Immunol.* **7**, 570 (2016).
80. Gandhi, M. J. *et al.* Inter and intra laboratory concordance of HLA antibody results obtained by single antigen bead based assay. *Hum. Immunol.* **74**, 310–317 (2013).
81. Claas, F. H. J. & Doxiadis, Ii. I. N. Human leukocyte antigen antibody detection and kidney allocation within Eurotransplant. *Hum. Immunol.* **70**, 636–639 (2009).
82. Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2013. Available at: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2013/donnees/organes/06-rein/synthese.htm>. (Accessed: 3rd September 2017)
83. Montgomery, R. A. *et al.* Desensitization in HLA-Incompatible Kidney Recipients and Survival. *N. Engl. J. Med.* **365**, 318–326 (2011).
84. Visentin, J. *et al.* Reassessment of T Lymphocytes Crossmatches Results Prediction With Luminex Class I Single Antigen Flow Beads Assay: *Transplantation* **101**, 624–630 (2017).
85. Rashid, T., Wilson, C. & Ebringer, A. The Link between Ankylosing Spondylitis, Crohn's Disease, *Klebsiella* , and Starch Consumption. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 1–9 (2013).
86. Hirata, A. A. & Terasaki, P. I. Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. *Science* **168**, 1095–1096 (1970).
87. Hirata, A. A., McIntire, F. C., Terasaki, P. I. & Mittal, K. K. Cross reactions between human transplantation antigens and bacterial lipopolysaccharides. *Transplantation* **15**, 441–445 (1973).
88. Delaney, M. *et al.* Humoral immunomodulatory effect of influenza vaccine in potential blood donors: implications for transfusion safety. *Transfus. Med. Oxf. Engl.* **21**, 378–384 (2011).
89. Candon, S. *et al.* Humoral and cellular immune responses after influenza vaccination

in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **9**, 2346–2354 (2009).

90. Kimball, P., Verbeke, S., Flattery, M., Rhodes, C. & Tolman, D. Influenza vaccination does not promote cellular or humoral activation among heart transplant recipients. *Transplantation* **69**, 2449–2451 (2000).

91. Katerinis, I. *et al.* De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 1727–1733 (2011).

92. Alberú, J. *et al.* A non-allogeneic stimulus triggers the production of de novo HLA antibodies in healthy adults. *Transpl. Immunol.* **18**, 166–171 (2007).

Abstract

Background: Immunological assessment before kidney transplantation (including blood-typing, HLA typing and HLA antibody detection) is key to choose a suitable donor and thus to reduce the risk of rejection. Recent techniques of detection of HLA antibodies are more and more sensitive and enable accurate determination of HLA specificities. We sought to determine prevalence of HLA antibodies detected by bead-based assay in children awaiting a first kidney transplant at Bordeaux University Hospital and to study consequences on access to transplantation. We looked for factors that could promote development of HLA antibodies. Ultimately, we discuss clinical relevance of these antibodies.

Methods: In this retrospective observational study, we obtained information on HLA antibody testing results, history of known and suspected sensitizing events in children treated in Bordeaux University Hospital, before they received their first kidney transplant.

Results: 37% of the 59 children included in this study are sensitized against HLA antigens. Among them, 14% are highly sensitized. Prevalence of HLA antibodies detected by bead-based assay increases over time. Univariate analysis showed an association between HLA sensitization and history of allergy. There was no association with history of transfusion, infection, dialysis, surgery, autoimmunity or vaccines.

Discussion: There is an increase in HLA antibodies detection in children awaiting kidney transplantation, which reduces the number of potential donors. Half of the patients who had HLA antibodies had no history of sensitizing events. We found a correlation between allergy and HLA sensitization. Clinical relevance of HLA antibodies detected by bead-based assays is still a matter of debate, indeed over-detection of HLA antibodies could result in illegitimately denying patients access to transplantation. Progress must be made to differentiate between naturally occurring HLA antibodies and antibodies produced following exposure to alloantigen, to identify antibodies against denatured HLA molecules and to tell which ones can be detrimental to the graft.

Résumé

Introduction : Chez les patients en attente de greffe rénale, le bilan immunologique (typage HLA et recherche d'anticorps anti-HLA) permet de sélectionner le greffon pour réduire au maximum le risque de rejet. Les techniques de détection des anticorps anti-HLA ont beaucoup évolué récemment, permettant de détecter davantage d'anticorps et de mieux les caractériser. Notre travail s'intéresse à la prévalence des anticorps anti-HLA en pré greffe rénale chez les enfants suivis au CHU de Bordeaux, à leur impact sur l'accès à la greffe, aux facteurs influençant leur développement et à leur pertinence.

Matériel et méthodes : Il s'agit d'une étude rétrospective observationnelle monocentrique. Chez tous les patients pédiatriques greffés ou en attente d'une première greffe rénale suivis au CHU de Bordeaux, les résultats des recherches d'anticorps anti-HLA en pré-greffe, des événements immunisants avérés, des événements immunisants suspectés ont été recueillis.

Résultats : Nous avons inclus 59 enfants (47 patients greffés et 12 patients en attente de greffe). On observe une augmentation de la prévalence des anticorps anti-HLA recherchés en fonction de l'année du bilan pré-greffe. La prévalence d'une immunisation HLA en pré-greffe est de 37%, dont 14% étaient hyperimmunisés. Des anticorps sont détectés chez 28% des patients n'ayant pas d'antécédent d'événement immunisant. En analyse univariée, l'immunisation est associée aux antécédents d'allergie mais pas aux antécédents de transfusion, d'infection, de dialyse, de chirurgie, d'auto-immunité, ni aux vaccinations.

Discussion : On détecte de plus en plus d'anticorps anti-HLA chez les enfants en attente de greffe rénale, avec un impact sur l'accès à la greffe. La moitié des patients immunisés n'a pas d'antécédent d'événement immunisant. Le seul facteur corrélé à l'immunisation HLA dans cette étude est l'antécédent d'allergie. La pertinence clinique de ces anticorps reste débattue, la sur-détection d'anticorps pourrait réduire l'accès à la greffe de certains patients de façon injustifiée. Il apparaît essentiel de différencier d'une part les anticorps naturels des anticorps apparus suite à une exposition à des tissus allogéniques, d'autre part les anticorps dirigés contre des molécules HLA natives de ceux dirigés contre des molécules HLA dénaturées et d'évaluer le risque qu'ils constituent pour la greffe.

Titre en Français : Prévalence des anticorps anti-HLA chez les enfants en attente de greffe rénale au CHU de Bordeaux

Titre en Anglais : Prevalence of HLA antibodies in children awaiting kidney transplantation in Bordeaux University Hospital

Mots clés : Transplantation rénale, pédiatrie, anticorps anti-HLA.

Remerciements

Au Professeur Jérôme Harambat,
Qui a accepté de présider ce jury.
Merci de m'avoir conseillé pour la thèse. Merci aussi d'être à l'écoute des internes, je garderai un très bon souvenir du service de néphro-pédiatrie, où j'ai beaucoup appris.

Au Professeur Pierre Merville,
Qui a accepté de rapporter ce travail.

Au Docteur Gwendaline Guidicelli,
Qui a accepté de siéger à ce jury.
Merci pour toutes les données apportées à ce travail, merci d'avoir patiemment répondu à mes questions et de m'avoir beaucoup aidée dans l'analyse compliquée des résultats des identifications.

Au Docteur Jonathan Visentin,
Qui a accepté de siéger à ce jury.
Merci d'avoir, avec Gwendaline, répondu à mes questions sur les mystères de l'immunologie.

Au Professeur Lionel Couzi,
Qui a accepté de siéger à ce jury.

Au Docteur Astrid Godron-Dubrasquet,
Qui a dirigé cette thèse.
Merci pour ta disponibilité, pour tes conseils et tes encouragements. J'ai beaucoup de chance d'avoir fait ce travail avec toi !

Aux patients,

Aux médecins, soignants et personnels hospitaliers qui m'ont donné envie de poursuivre ces études pas toujours faciles....

A mon Papi,

Tu es pour beaucoup dans le choix de ce métier, et j'espère avoir hérité un peu de ton caractère laborieux, de ta curiosité et de ton dévouement à tes patients. Merci aussi de me faire rire, et de rester méga beau gosse en dépit des années.

A mon Papa,

Je ne te remercierai jamais assez. Plus le temps passe et plus je mesure le courage qu'il t'a fallu pour si bien nous élever, nous protéger et nous aimer.

A Jules,

Mon frère chéri, heureusement que tu as toujours été à mes côtés, pour construire des châteaux de sable, gagner des quêtes à Baldur's Gate ou me soutenir dans les études !

A mes oncles et tantes : Béné et Dom, Frédé et Didier, Loulou et Melche, Séba et Marie,
Vous êtes des modèles d'hospitalité, d'honnêteté et de courage (et vous êtes drôles).

A mes cousins et cousines qui illuminent les vacances et fêtes passées ensemble : Cécile, Sophie, Isabelle, Marie, Lucie, Marianne, Hortense, Céleste, Hugo, Aurore, Magdalena, Félix, Gaspard, Clément, Benjamin et Antoine.

A tante Janine, pour ta gentillesse et ton amour.

A Mamie Granny, j'ai la chance de connaître tes qualités à travers tes enfants.

A Caro et Marion, mes grandes amies de collège.

Aux vieux gens, partis conquérir le monde, j'espère pouvoir tous vous rendre visite bientôt.

A ma Chloé chérie, la meilleure chose qui me soit arrivée au WEI.

A mon Chameau, « A vous et à tous m'en rapporte : on doit dire du bien le bien ».

Aux Buffaloz, pour votre raffinement.

A Marine, pour tes anecdotes.

Je remercie mille fois une personne, Emilie, pour les BONS moments passés au tennis, les dîners avant le tennis (merci à Maxence), en soirée, en week-end...

A Juliette Rey de Rothschild, tu me fais rire en toutes circonstances, et merci pour ton soutien quand je n'avais pas trop le moral.

A Manos, j'espère qu'il restera une place pour nos petits week-ends « capitales d'Europe » dans ta nouvelle vie ! Et merci Simon pour tes remerciements !

Merci aux internes de pédiatrie de ma promo, à tous mes co-internes pendant ces quatre ans, et en particulier ceux de réa ce semestre : Damien, Iona, Lucie, Marie, Pauline et Romain, vous avez été adorables !

A ceux que je n'ai pas cités ...