



HAL
open science

Étude de l'évolution du profil d'immunisation des patients hyper immunisés en attente de transplantation rénale

Élodie Wojciechowski

► **To cite this version:**

Élodie Wojciechowski. Étude de l'évolution du profil d'immunisation des patients hyper immunisés en attente de transplantation rénale. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02973829

HAL Id: dumas-02973829

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02973829v1>

Submitted on 21 Oct 2020

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.

MEMOIRE du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

**Etude de l'évolution du profil d'immunisation des patients hyperimmunisés
en attente de transplantation rénale.**

Par Elodie WOJCIECHOWSKI

Née le 08/04/1989 à Nancy

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de
THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Sous la direction du Dr Jonathan VISENTIN

Rapporteur : Dr Matthieu FILLOUX

Soutenue le 23 Janvier 2020

Membres du jury :

Mr le Pr Pierre Merville, PU-PH, Université de Bordeaux.....Président

Mr le Dr Matthieu Filloux, PH, CHU de Limoges.....Rapporteur

Mme la Dr Corinne Antoine, PH, AP-HP.....Examineur

Mr le Pr Jean-Luc Taupin, PU-PH, AP-HP.....Examineur

Mr le Pr Lionel Couzi, PU-PH, Université de BordeauxExamineur

Mr le Dr Jonathan Visentin, MCU-PH, Université de Bordeaux.....Directeur

REMERCIEMENTS

Au Professeur Pierre Merville, pour avoir accepté d'être le Président du jury de cette thèse.

Au Docteur Matthieu Filloux, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Au Docteur Corinne Antoine, aux professeurs Jean-Luc Taupin et Lionel Couzi, pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je suis très honorée que vous jugiez ce travail et vous prie de recevoir mon entière gratitude.

Au Docteur Jonathan Visentin, pour ton aide précieuse, ta disponibilité et ta patience. Merci de m'avoir donné l'occasion de travailler sur ce sujet et de m'avoir fait partager ta passion pour le HLA.

A tous les membres du laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, pour votre accueil, votre investissement dans ma formation et votre confiance. Merci aussi pour votre bonne humeur et votre soutien.

A tous les néphrologues de la région, pour m'avoir ouvert vos portes et aidé dans la réalisation de ce travail ainsi que pour avoir porté un sincère intérêt à celui-ci.

A Frédéric, pour ton aide dans la réalisation des premières manipulations.

A ma famille, pour vos continuels encouragements et votre sincère volonté de comprendre le sujet.

A l'ensemble des mes amis et co-internes pour vos oreilles attentives, vos conseils et votre soutien, avec une pensée particulière pour Ana et les autres membres de l'équipe BMW.

A Rémi, pour ta présence et ta compréhension.

Table des matières

| | |
|---|----|
| REMERCIEMENTS | 3 |
| INTRODUCTION | 9 |
| 1. Système HLA/CMH | 9 |
| 1.1 Origine et découverte..... | 9 |
| 1.2 Cartographie génétique du système HLA..... | 9 |
| 1.3 Structure et expression des molécules HLA | 10 |
| 1.4 Polymorphisme des gènes HLA | 11 |
| 1.5 Transmission haplotypique des gènes HLA et expression codominante | 12 |
| 1.7 Fonction des molécules HLA..... | 13 |
| 2. Molécules HLA en transplantation d'organe – Allo-réactivité | 14 |
| 2.1 Allo-réactivité directe | 15 |
| 2.2 Allo-réactivité indirecte | 15 |
| 3. Anticorps anti -HLA..... | 15 |
| 3.1 Généralités sur les immunoglobulines | 15 |
| 3.2 Epitopes des anticorps anti-HLA..... | 21 |
| 3.3 Origine des anticorps anti-HLA..... | 22 |
| 3.4 Méthodes de détection des anticorps anti-HLA..... | 26 |
| 3.5 Pathogénicité des anticorps anti-HLA | 31 |
| 3.6 Anticorps anti-HLA préformés en transplantation rénale..... | 33 |
| 3.7 Evolution des anticorps anti-HLA après allo-immunisation | 36 |
| 4. Accès à la transplantation rénale | 38 |
| 4.1 Règles d'attribution des greffons rénaux en France | 40 |
| 4.3 Spécificité des patients hyperimmunisés..... | 40 |
| PROBLEMATIQUE et OBJECTIFS GENERAUX..... | 43 |
| MATERIELS ET METHODES | 44 |
| 1. Population étudiée | 44 |
| 2. Dosage des anticorps anti-HLA..... | 44 |
| 3. Données cliniques..... | 44 |
| 4. Analyses statistiques | 45 |
| PARTIE I..... | 46 |
| RESULTATS..... | 47 |
| 1. Diagramme des flux..... | 47 |
| 2. Caractéristiques générales de la population des patients hyperimmunisés d'Aquitaine..... | 47 |

| | |
|--|----|
| PARTIE II..... | 49 |
| ARTICLE..... | 50 |
| Introduction..... | 51 |
| Materials and methods | 53 |
| 1 Patients and sera | 53 |
| 2 Anti-HLA antibodies detection | 53 |
| Results | 55 |
| 1 Population characteristics | 55 |
| 2 Sensitization profile of HS patients barely change over time | 56 |
| 3 Changes in patient sensitization profiles have a limited impact on transplant access | 60 |
| 4 Alternative method to single antigen assay | 62 |
| 5 Clinico-biological correlation | 64 |
| Discussion | 70 |
| References | 73 |
| DISCUSSION et CONCLUSION | 76 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 78 |

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 - Carte génétique du système HLA..... | 10 |
| Figure 2 - Structures des molécules HLA de classe I et II | 10 |
| Figure 3 - Transmission familiale des haplotypes HLA | 13 |
| Figure 4 - Expression des molécules HLA de classe I et II..... | 14 |
| Figure 5 - Structures des Immunoglobulines selon leur classe | 16 |
| Figure 6 - Représentation des CDRs | 17 |
| Figure 7 - Caractéristiques des différentes classes et sous classes d'immunoglobuline | 19 |
| Figure 8 - Conséquences de l'activation du complément | 20 |
| Figure 9 - Représentation d'un triplet et d'un eplet | 22 |
| Figure 10 - Production des anticorps anti-HLA..... | 23 |
| Figure 11 - Apparition de DSA <i>de novo</i> après transplantation rénale..... | 25 |
| Figure 12 - Rôle des DSA dans la survie du greffon..... | 33 |
| Figure 13 - Mécanisme du rejet humoral et cibles thérapeutiques..... | 35 |
| Figure 14 - Modèle d'activation aspécifique | 37 |
| Figure 15 - Maintien de la production d'anticorps anti-HLA..... | 38 |
| Figure 16 - Diagramme de la population de patient étudiée | 47 |
| Figure 17 - Evolution de la proportion de patients hyperimmunisés entre 2013 et 2017 au sein de la population en attente de transplantation rénale. | 48 |
| Figure 18 - Comparaison des patients hyperimmunisés en attente de greffe ou greffés. | 48 |

Table des Abréviations

AD-BCR : *Antigen density adjusted B-cell receptor*

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

AID : *activation-induced cytidine deaminase*

Anti-dHLA : anticorps anti-HLA dénaturé

Anti-nHLA : anticorps anti-HLA natif

BCR : *B-cell receptor*

CDR : *complementarity determining region*

CMF : cytométrie en flux

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CREG : *cross-reactive group*

DSA : *donor specific antibody(ies)*

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

Fab : fragment *antigen binding*

Fc : fragment *crystallizable*

FcγR : récepteur des fragments Fc des IgG

FcR : récepteur des fragments Fc

HLA : *human leukocyte antigen*

Ig : immunoglobuline

Ig-IV : immunoglobuline intra-veineuse

LCT : microlymphocytotoxicité dépendante du complément

NK : lymphocyte *natural killer*

SAG : *single antigen* en format Luminex[®]

TAP *Transporteur associated with antigen processing*

TCR : *T-cell receptor*

Tfh : lymphocytes T folliculaires

TLR : *Toll like receptor*

TGI : taux de greffons incompatibles

XM : crossmatch

INTRODUCTION

1. Système HLA/CMH

1.1 Origine et découverte

C'est en 1952 que le professeur Jean Dausset, chercheur au Centre national de transfusion sanguine, met en évidence pour la première fois la possibilité d'une allo-immunisation leucocytaire chez l'homme. Il remarqua que le sérum de sujets immunisés à l'occasion de multiples transfusions sanguines était capable de produire une agglutination des leucocytes d'un autre individu sans agglutiner les leucocytes du sujet, témoignant de la présence d'allo-anticorps. Il constata par la suite que parmi le panel de donneurs bénévoles testés, les leucocytes de trois d'entre eux réagissaient moins fréquemment aux sérums de patients polytransfusés par rapport aux autres donneurs. Cette constatation l'amena à penser que ces trois volontaires étaient déficients vis-à-vis d'un antigène fréquemment rencontré dans la population et décrivit ainsi le premier antigène leucocytaire désigné « MAC » (HLA-A2)(1).

Des recherches menées en parallèle par d'autres équipes à partir de sérums de femmes multipares (2) et le développement de nouvelles techniques sérologiques (lymphocytotoxicité dépendante du complément)(3), et non sérologiques (réaction lymphocytaire mixte)(4) ont permis par la suite la découverte de nombreux autres antigènes du système HLA (*Human Leukocyte Antigens*).

Des expériences de greffes de peau (5) et de transplantations rénales (6) réalisées au début des années 1960 ont rapidement montré que les antigènes du système HLA chez l'homme n'étaient autres que les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), commun à de nombreux vertébrés.

Le CMH, initialement décrit chez la souris dans les années 1930 (7), correspond à un groupe d'antigènes impliqués dans les processus de rejet de greffe et pour lesquels la compatibilité entre donneur et receveur permettait de prolonger la survie du greffon. Un important travail collaboratif international mené au sein des Workshops HLA et qui a débuté dès 1964, a rendu possible la compréhension de la génétique de ce système complexe (8).

1.2 Cartographie génétique du système HLA

Le système HLA est localisé sur le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3) et s'étend sur environ 7,6Mb. Cette zone est caractérisée par une densité génique élevée, avec un total de 421 loci identifiés dont 60 % correspondent à des gènes exprimés (9). Elle est subdivisée en trois régions :

- La région CMH de classe I, proche du télomère, qui comprend 3 gènes HLA de classe I classiques (HLA-A, HLA-B et HLA-C)
- La région CMH de classe II, proche du centromère, qui comprend 9 gènes HLA de classe II classiques (HLA-DP (gènes DPA1 et DPB1), HLA-DQ (DQA1 et DQB1) et HLA-DR (DRA et DRB1, DRB3, DRB4 et DRB5))
- La région CMH de classe III située entre les régions I et II, riche en gènes impliqués dans les réponses immunitaires. On y retrouve notamment des gènes codant pour des protéines du système du complément (C2, C4, facteur B) et pour le *Tumor necrosis factor alpha* (TNF α).

Les régions de classe I et II du CMH comportent également des gènes HLA dit « non classique » (HLA-E, -F, -G...), des gènes HLA non codants, ou pseudogènes mais aussi des gènes qui ne codent pas

pour des molécules HLA (comme TAP1 et 2 qui codent pour des molécules ayant un rôle de transporteur de peptides).

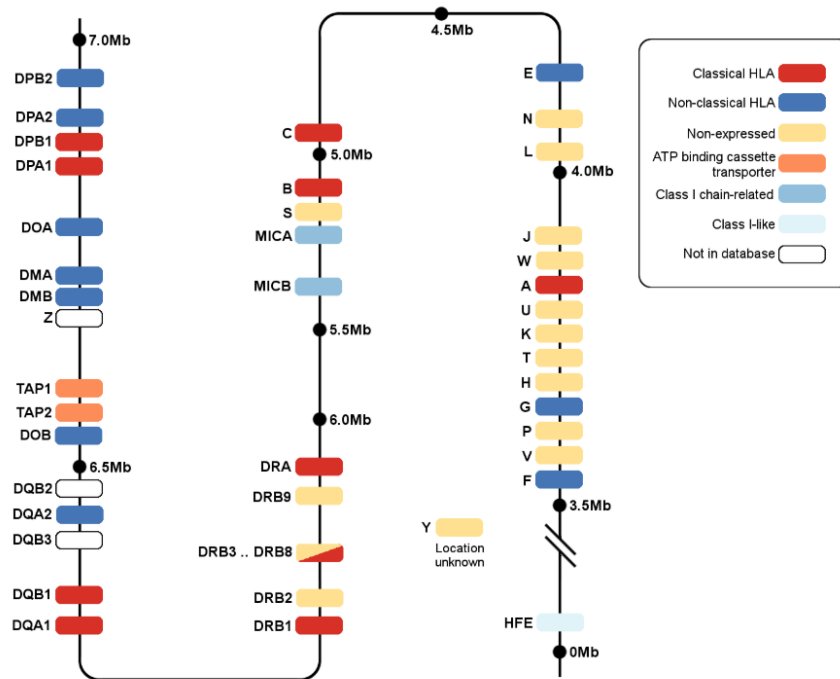


Figure 1 - Carte génétique du système HLA

D'après <http://hla.alleles.org>

1.3 Structure et expression des molécules HLA

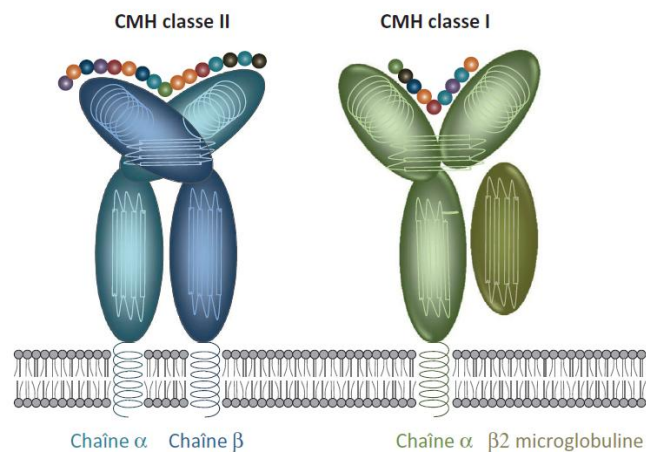


Figure 2 - Structures des molécules HLA de classe I et II

D'après Immunologie fondamentale et immunopathologie 2^e édition

1.3.1 Molécules HLA de classe I classiques

Les gènes HLA-A, -B, et -C codent une chaîne lourde α de 44 kDa organisée en 3 domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$) et reliée à la membrane plasmique par un domaine transmembranaire hydrophobe suivi d'un court domaine intracellulaire. Son domaine proximal $\alpha 3$ s'apparie de manière non covalente à la $\beta 2$ -microglobuline (protéine de 12 kDa monomorphe, codée par un gène du chromosome 15). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment un sillon bordé par 2 hélices α et dont le plancher est constitué de feuilletts β . Ce sillon, appelé « poche », a la capacité d'accueillir des peptides de 9 acides aminés en moyenne, complémentaires du point de vue forme et caractéristiques physico-chimiques, et maintenus en position grâce à certains résidus d'acides aminés jouant le rôle d'ancres. Les molécules HLA de classe I sont exprimées sur la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme mais leur expression varie selon le type cellulaire, l'allèle présenté par l'individu et l'environnement cytokinique (10).

1.3.2 Molécule HLA de classe II classiques

Les molécules HLA de classe II sont des hétérodimères composés de deux chaînes lourdes : une chaîne α de 29 kDa et une chaîne β de 34 kDa. Elles sont respectivement codées par un gène A (DRA1, DQA1 et DPA1) et un gène B (DRB1/3/4/5, DQB1 et DPB1). Chaque chaîne est composée de 2 domaines extracellulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\beta 1$, $\beta 2$), d'un domaine hydrophobe transmembranaire et d'une partie intracellulaire. L'appariement des domaines distaux $\alpha 1$ et $\beta 1$ délimite, de la même manière que pour les molécules de classe I, un sillon d'ancrage pouvant recevoir des peptides plus long (12 à 25 acides aminés). A noter que les gènes DRB3, DRB4 et DRB5 codent pour d'autres chaînes β ($\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$) qui, en s'associant à la chaîne α du gène DRA1, forment respectivement des antigènes HLA-DR52, DR53 et DR51. Ces gènes ne sont pas présents chez tous les individus et ne sont exprimés qu'en association à des allèles DRB1 particuliers. L'expression des molécules HLA de classe II est principalement limitée, à l'état basal, aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles : cellules dendritiques, monocytes/macrophages et lymphocytes B. L'activation de ces cellules augmente la densité d'expression des molécules HLA de classe II à leur surface. Par ailleurs certaines cellules comme les lymphocytes T, les cellules épithéliales et endothéliales qui n'expriment pas ou peu ces molécules à l'état quiescent peuvent les exprimer en contexte inflammatoire.

1.4 Polymorphisme des gènes HLA

Les gènes codant pour les molécules HLA de classe I et II classiques sont les plus polymorphes du génome humain. Le polymorphisme est défini au sein d'une population par le nombre et la fréquence des allèles à un locus donné. Initialement étudié par technique RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), les avancées des techniques de biologie moléculaire ont permis l'identification d'un nombre croissant d'allèles estimé à 18691 pour la classe I et 7065 pour la classe II en septembre 2019. Cette diversité allélique est due à des mutations ponctuelles, des *crossing-over* entre loci ou encore des conversions géniques qui s'effectuent au cours de la méiose.

Le polymorphisme génétique se situe principalement sur les exons qui codent la poche à peptide, c'est à dire les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des molécules HLA de classe I et les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ des molécules de classe II. Les variations de séquences nucléotidiques au sein de la poche, lorsqu'elles induisent un changement d'acides aminés, permettent de moduler l'affinité d'une molécule HLA donnée vis-à-vis de différents peptides, c'est-à-dire définissent le répertoire peptidique présenté. Il existe des polymorphismes en dehors de la poche à peptide. Moins nombreux, ils n'ont pas de rôle dans la présentation antigénique mais auront une importance en compatibilité tissulaire, en particulier en transplantation d'organe solide.

Concernant la classe II, les gènes codant pour les chaînes β sont beaucoup plus polymorphes que ceux codant pour les chaînes α . La chaîne α des molécules HLA-DR est d'ailleurs considérée comme monomorphe (2 protéines dans la population). Il existe cependant, en plus du polymorphisme génétique, un polymorphisme protéique combinatoire puisque les chaînes α et β des molécules HLA-DR,-DQ et -DP peuvent s'associer indépendamment de leur origine chromosomique (association en trans).

Le polymorphisme du HLA serait antérieur au processus de spéciation qui a conduit à l'émergence de l'espèce humaine. Il a été conservé grâce à plusieurs facteurs dont le plus important est certainement la pression de sélection positive subie par cette région du génome. En effet, l'hétérozygotie pour les gènes HLA confère un avantage sur le plan immunologique car elle permet la présentation d'un répertoire de peptides plus large, notamment des peptides en provenance de pathogènes, ce qui participe au maintien des allèles rares. A contrario, certains allèles HLA sont surreprésentés dans certaines régions car sont plus favorables à la survie en cas d'exposition infectieuse particulière (11,12). Outre la pression exercée par les pathogènes, la mixité allélique serait également favorisée sur le plan de la reproduction par une attirance plus marquée entre individus ne partageant pas les mêmes gènes HLA (13). Enfin, le fait que l'espèce humaine ait su garder au cours de son développement une taille de population suffisante a permis la conservation du polymorphisme du système HLA. Ceci est particulièrement vrai pour les populations africaines, plus diversifiées du point de vue du HLA que les populations non africaines (14), qui descendent d'un groupe d'individu de taille moindre et donc ne présentent pas la totalité des variants de la population de départ (effet fondateur). Ainsi, tous les allèles HLA ne sont pas retrouvés à la même fréquence dans les différentes populations.

1.5 Transmission haplotypique des gènes HLA et expression codominante

Les gènes HLA sont situés dans une région chromosomique de faible taille qui est transmise « en bloc » à la descendance et définit un haplotype. Cette transmission est mendélienne et l'expression des gènes HLA est co-dominante. Ainsi chaque individu se caractérise par deux haplotypes HLA, provenant l'un de son père et l'autre de sa mère et peut exprimer à la surface de ses cellules entre 6 à 18 molécules HLA classiques différentes selon son type (expression des gènes de classe I ou I+II) et son degré d'hétérozygotie. Au sein d'une famille, la probabilité de partager les deux mêmes haplotypes HLA entre frères ou sœurs est donc d'une chance sur quatre. Dans de rares cas (moins de 1%) peut survenir l'apparition d'un haplotype dit recombinant, produit par un échange réciproque ou *crossing over* de matériel génétique entre les deux haplotypes d'un même parent au cours de la méiose.

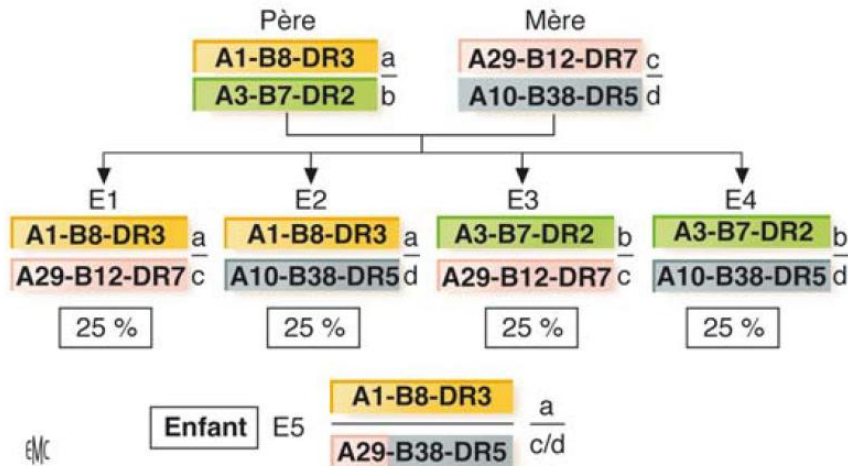


Figure 3 - Transmission familiale des haplotypes HLA

D'après Cesbron-Gautier A. *et al.* Encyclopédie médico-chirurgicale 2008

Cette transmission haplotypique des gènes HLA est à l'origine d'une surreprésentation de certaines combinaisons d'allèles par rapport à d'autres. Par exemple, l'haplotype comprenant les allèles HLA-A*01:01 et B*08:01 est retrouvé à une fréquence de 0,0955 dans la population européenne alors que la fréquence combinée de ces deux allèles pris indépendamment l'un de l'autre devrait être de 0,0215 ($0,1252 \times 0,1718$). Cette différence est appelée déséquilibre de liaison et est d'autant plus marquée que les gènes sont proches dans le génome (même chromosome et faible nombre de paires de base séparant les loci).

1.7 Fonction des molécules HLA

La principale fonction des molécules HLA est de présenter les antigènes protéiques sous forme de peptides aux lymphocytes T. Ces derniers, après reconnaissance des peptides de manière relativement spécifique via leur TCR (*T-cell receptor*), engendrent une réponse immunitaire spécifique de l'antigène, qu'elle soit effectrice ou régulatrice.

1.7.1 Apprêtement des molécules de classe I

Les peptides présentés par les molécules HLA de classe I sont des peptides endogènes dérivant des protéines issues du catabolisme normal de la cellule mais aussi de protéines virales ou tumorales. Après ubiquitinylation dans le cytosol, ces protéines sont dégradées par le protéasome. Une faible quantité des fragments protéiques atteint le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP (*Transporteur associated with antigen processing*). Une fois dans le réticulum endoplasmique le peptide peut s'enchaîner dans une molécule HLA en cours de formation et le tout est exporté à la surface de la cellule. Le complexe HLA de classe I-peptide peut interagir avec les lymphocytes T CD8, qui une fois activés, mettront en jeu des processus cytotoxiques afin de détruire les cellules infectées ou transformées.

1.7.2 Apprêtement des molécules de classe II

Les molécules HLA de classe II présentent des peptides exogènes, c'est-à-dire dérivant des protéines internalisées par les cellules présentatrices d'antigènes. Au moment de sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, la molécule HLA de classe II s'associe à une protéine invariante appelée Ii, qui

empêche la fixation d'un peptide dans la poche d'ancrage et oriente la molécule vers l'endosome. Ce dernier est formé par endocytose et comprend des protéines issues du milieu extracellulaire et des protéines transmembranaires du « soi ». Après fusion de l'endosome avec le lysosome, les protéases lysosomiales dégradent la chaîne Ii et un peptide issu du microenvironnement de la cellule peut s'enchâsser dans la molécule HLA de classe II avant de gagner la membrane plasmique. Le complexe HLA de classe II-peptide est ensuite analysé par les lymphocytes T CD4 qui jouent un rôle central via la production de cytokine dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

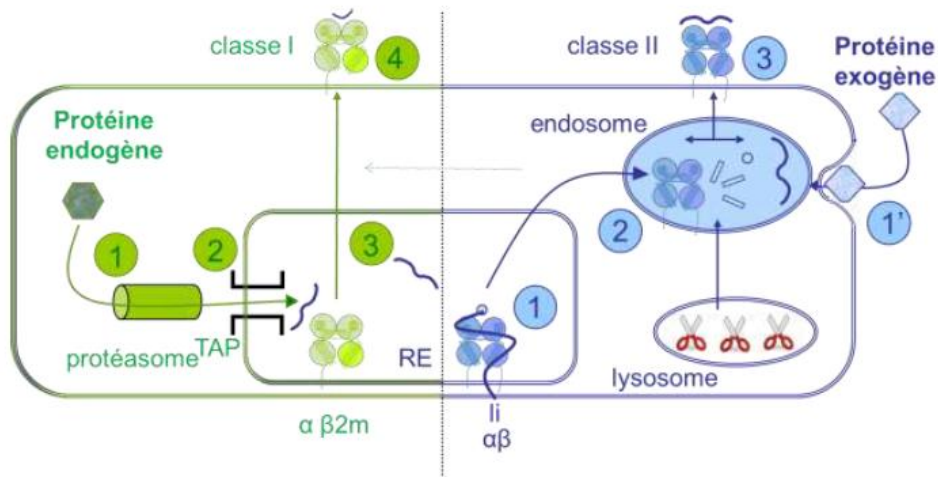


Figure 4 - Expression des molécules HLA de classe I et II

D'après Immunologie fondamentale et immunopathologie 2^e édition

A noter que les cellules dendritiques ont la particularité de pouvoir présenter, une fois activées, des peptides dérivés de protéines exogènes via les molécules HLA de classe I. Ce phénomène est appelé présentation croisée.

2. Molécules HLA en transplantation d'organe – Allo-réactivité

Les molécules HLA jouent un rôle primordial dans l'activation du système immunitaire. Pour jouer ce rôle efficacement, les lymphocytes T de l'individu doivent pouvoir interagir avec elles. Au cours de l'ontogénie T qui se déroule dans le thymus, les précurseurs des lymphocytes T appelés thymocytes subissent une première sélection positive au cours de laquelle les cellules épithéliales corticales leur présentent des peptides du soi peu affins. L'interaction entre ces deux cellules est donc fortement dépendante du TCR et des bords de la poche à peptide des molécules HLA exprimées, avec un impact minime des peptides présentés. Les thymocytes dont le TCR ne reconnaît pas le complexe HLA-peptide ne reçoivent pas de signal de survie et sont éliminés. Secondairement ce sont les cellules dendritiques à la jonction cortico-médullaire qui présentent aux thymocytes un répertoire peptidique varié, quasi-similaire à celui présenté dans l'ensemble de l'organisme. Ceux recevant un signal trop intense via leur TCR sont éliminés par étape de sélection négative. Ce processus de sélection global est donc conditionné à la fois par les molécules HLA de l'individu elle-même (bord de la poche à peptide) et par le répertoire peptidique présentable par ces molécules HLA (fond de la poche à peptide). Nous nous rappellerons que le polymorphisme des molécules HLA est concentré au fond de la poche à peptide. La conséquence est que des molécules HLA étrangères ont toutes les chances de pouvoir se lier aux TCR produits par un individu, sans pour autant présenter les mêmes peptides. De ce fait, un grand nombre de lymphocytes T circulants est capable de reconnaître des allo-antigènes chez un individu qui n'a jamais bénéficié d'une transplantation.

L'appariement des molécules HLA entre donneur et receveur a depuis longtemps montré un bénéfice sur la survie de l'organe transplanté, mais l'extrême polymorphisme du système HLA fait que les transplantations, en situation HLA identique, restent rares. En cas de transplantation la reconnaissance des allo-antigènes peut se faire de 2 manières : directe et indirecte.

2.1 Allo-réactivité directe

Les lésions d'ischémie/reperfusion au moment de la transplantation sont à l'origine de l'émission de signaux de danger intégrés par les cellules dendritiques immatures du donneur contenues dans l'organe transplanté. Ces cellules deviennent matures et migrent vers les ganglions lymphatiques du receveur où elles activent les lymphocytes T du receveur.

En cas de mismatch allélique, plusieurs situations peuvent se présenter :

- Les différences entre molécules HLA du donneur et du receveur se situent dans la poche à peptide : c'est le répertoire de peptides présenté qui diffère entre les 2 types de molécules HLA et est à l'origine de l'allo-réactivité
- La variabilité se situe au niveau des domaines constituant le bord de la poche à peptide : bien que le répertoire de peptide présenté puisse être en partie identique, c'est le changement de conformation du ligand composite HLA-peptide qui peut engendrer l'allo-réactivité.

Les lymphocytes T allo-réactifs directs constituent entre 1 et 10% des lymphocytes circulants. La reconnaissance directe a principalement été mise en lien avec le rejet aigu cellulaire de l'organe transplanté et est maintenant bien maîtrisée par l'utilisation des molécules immunosuppressives ciblant l'activation et la prolifération des lymphocytes T allo-réactifs.

2.2 Allo-réactivité indirecte

Les lymphocytes T CD4 et T CD8 reconnaissent les allo-antigènes après internalisation des protéines HLA étrangères du donneur et apprêtement par les cellules présentatrices d'antigène du receveur via respectivement les molécules HLA de classe II et I. La fréquence des lymphocytes T activés via l'allo-réactivité indirecte est faible, de l'ordre de 1 pour 100 000.

La reconnaissance indirecte est à l'origine de la production d'anticorps anti-HLA. En effet, une étude menée à partir d'un modèle murin déficient en lymphocyte T a montré que seules les souris ayant bénéficié d'un transfert adoptif de lymphocytes T transgéniques dont le TCR reconnaissait l'allo-antigène sous forme de ligand composite allo-peptide/CMH du soi et non sous forme native étaient capables de développer des allo-anticorps de type IgG après transplantation cardiaque. Les lymphocytes T CD4 transférés ont été retrouvés au niveau des centres germinatifs et avaient acquis un phénotype *T follicular helper* (Tfh), capable de soutenir l'activation des lymphocytes B et ainsi générer une réponse humorale efficace et durable (15).

3. Anticorps anti -HLA

3.1 Généralités sur les immunoglobulines

3.1.1 Structure

Les immunoglobulines, encore appelées anticorps, sont le support de l'immunité humorale et sont sécrétées par les cellules de la lignée lymphocytaire B. Ce sont des protéines symétriques formées de

4 chaînes polypeptidiques homologues 2 à 2 et reliées par des ponts disulfures : 2 chaînes lourdes H pour *heavy* (constituée chacune de 440 à 550 acides aminés) et 2 chaînes légères L pour *light* (constituée chacune de 220 acides aminés).

Il existe 5 types de chaînes lourdes définissant 5 classes d'immunoglobulines : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Certaines classes sont divisées en sous classe comme les IgG (IgG1 à IgG4) et les IgA (IgA1 et IgA2). Les chaînes lourdes sont constituées d'un domaine variable appelé VH et de 3 ou 4 domaines constants (CH1, CH2, CH3, CH4) selon la classe, avec une région charnière située entre le premier et le deuxième des domaines constants.

Les chaînes légères sont de 2 types, appelées κ et λ , et peuvent s'associer avec n'importe quel type de chaîne lourde. Elles comprennent elles aussi une portion variable appelée VL et une portion constante appelée CL. Le rapport entre les anticorps porteurs de chaînes légères κ et λ est de 2/1 chez l'homme.

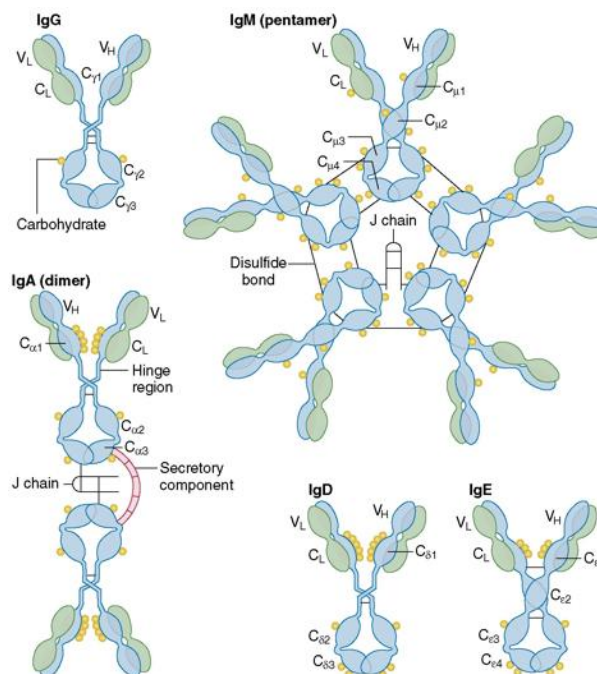


Figure 5 - Structures des Immunoglobulines selon leur classe

D'après Elsevier's Integrated Immunology and Microbiology, J. Actor et Immunologie, J. Kindt, Editions Dunod

Les immunoglobulines possèdent deux régions distinctes :

- une région Fab (*Fragment antigen binding*) composée de l'association des domaines variables VH et VL des chaînes lourdes et légères et des domaines CH1 et CL. Elle constitue le site de fixation de l'anticorps à l'antigène.
- une région Fc (*Fragment crystallizable*) composée de la partie constante des deux chaînes lourdes, qui confère à l'anticorps sa fonction effectrice.

3.1.2 Région Fab et liaison antigène -anticorps

Les régions variables des chaînes lourdes et légères contiennent des régions dites hypervariables appelées CDR (*complementary determining region*) et des régions charpentes dites FR (*framework regions*). C'est au niveau des CDR que se concentrent les différences de séquence d'acides aminés d'une immunoglobuline à une autre.

La diversité du répertoire des immunoglobulines s'effectue au cours de l'ontogénie B dans la moelle osseuse. Au cours de ce processus, les gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes et légères subissent un réarrangement, et les différences de combinaison et de jonction des segments formés sont à l'origine de cette diversité. Cependant, seuls les lymphocytes B produisant une immunoglobuline fonctionnelle (sélection positive) et ne reconnaissant pas les antigènes du soi de manière trop importante (sélection négative) sont autorisés à quitter la moelle osseuse pour devenir des lymphocytes B « naïfs ».

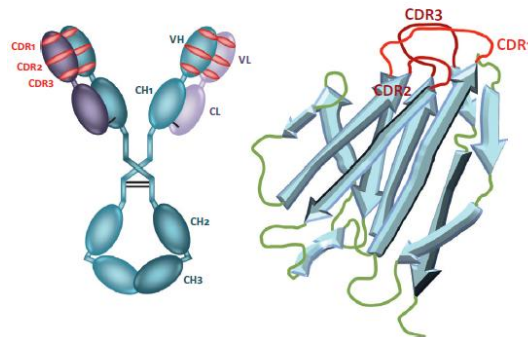


Figure 6 - Représentation des CDRs

D'après Immunologie fondamentale et immun pathologie 2^e édition

Le repliement des chaînes peptidiques des régions VH et VL permet de rapprocher dans l'espace les 3 CDRs appartenant à la chaîne lourde et les 3 CDRs appartenant à la chaîne légère, chacun formant une boucle. L'ensemble des 6 CDRs correspond au site de fixation de l'antigène appelé paratope. La structure moléculaire reconnue par les 6 CDRs définit un épitope structural. La surface de contact entre le paratope et l'épitope est très faible et s'étend sur environ 15 à 25 acides aminés. Sur l'épitope, seul un certain nombre de ces acides aminés sont primordiaux à la liaison avec l'anticorps, leur substitution par un autre résidu aboutissant à une diminution significative de cette liaison. Ces résidus situés dans des zones dites « *hot spot* » définissent ainsi l'épitope fonctionnel. Sur l'anticorps, c'est la troisième région CDR de la chaîne lourde, se situant en général au centre du site de fixation antigénique qui joue un rôle majeur dans la reconnaissance de l'épitope, les autres CDRs jouant plutôt un rôle de stabilisation.

Un grand nombre de liaisons non covalentes (liaisons hydrophobes, hydrogènes, forces de Van der Waals et électrostatiques) participent à l'interaction entre l'épitope et le paratope et la somme de ces forces leur confère une énergie de liaison élevée. L'intensité de la liaison anticorps-antigène définit l'affinité de l'anticorps. L'affinité d'un anticorps peut être modulée après stimulation antigénique. En effet le lymphocyte B activé opère au niveau de la zone sombre des centres germinatifs des hyper mutations somatiques sur la région variable des gènes des immunoglobulines grâce à une enzyme appelée AID (*activation-induced cytidine deaminase*). A l'issue de ce phénomène, seuls les lymphocytes B exprimant à leur surface des immunoglobulines de forte affinité pour

l'antigène sont conservés. Par ailleurs un anticorps peut également être défini par son avidité. L'avidité désigne la force avec laquelle un anticorps multivalent se fixe à un antigène plurivalent.

3.1.3 Région Fc et fonctions effectrices

3.1.3.1 Région Fc des différentes classes d'immunoglobulines

La fraction Fc des immunoglobulines diffère selon la classe de l'immunoglobuline. Comme vu précédemment il existe 5 classes d'immunoglobulines.

Les IgM sont exprimées sous forme monomérique à la surface des lymphocytes B naïfs où elles constituent le BCR (*B-cell receptor*), et principalement sous forme pentamérique lorsqu'elles sont sécrétées. Elles sont essentiellement confinées au compartiment intra vasculaire et sont sécrétées lors d'une réponse immunitaire primaire. Leur chaîne lourde est constituée de 4 domaines constants et sont associées entre elle par la pièce J (pour joining), le poids moléculaire d'un pentamère étant de 970 kDa. Les IgM sont le principal support des anticorps dits « naturels », c'est-à-dire présents avant tout contact avec l'antigène. Ces anticorps naturels sont habituellement polyspécifiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent reconnaître un grand nombre d'épitopes, mais avec une faible affinité. La faible affinité des IgM est compensée par le caractère pentamérique de la forme sécrétée qui augmente leur avidité. Les IgM pentamériques changent de conformation après fixation sur leurs cibles, ce qui leur permet d'activer la voie classique du complément de manière très efficace.

Les IgG sont les immunoglobulines retrouvées en quantité la plus importante au niveau sérique, mais leur répartition est uniforme dans les compartiments intra- et extravasculaires. Elle est présente sous forme monomérique et sa chaîne lourde est constituée de 3 domaines constants. Il existe 4 sous-classes d'IgG réparties comme suit : IgG1 (65%), IgG2 (25%), IgG3 (environ 7%) et IgG4 (environ 3%). D'un point de vue structural les IgG3 possèdent une région charnière plus longue et de ce fait ont un poids moléculaire plus important, 165 kDa, que les autres IgG qui ont un poids moléculaire de 146 kDa. Elles possèdent une demi-vie d'environ 21 jours (sauf les IgG3 limitées à 7-8 jours) et sont capables de passer la barrière placentaire. Les fonctions effectrices varient en fonction des sous-classes d'IgG : les IgG1 et IgG3 sont connues pour activer la voie classique du complément de manière efficace et sont également très bien reconnues par les FcR, donc favorisent l'opsonisation et déclenchent l'ADCC, à la différence des IgG2 et à fortiori des IgG4. Ces dernières ont en revanche une affinité plus importante pour l'antigène. Les IgG constituent la classe majoritaire lors de la réponse secondaire.

Les IgA sont majoritairement présentes dans les sécrétions muqueuses ou elles sont excrétées sous forme dimérique, maintenue par la pièce J et la pièce sécrétoire. Leur chaîne lourde est constituée de 3 domaines constants. Le poids moléculaire d'un monomère d'IgA est de 160 kDa. La sous classe IgA1 est majoritairement dans le sérum et la sous classe IgA2 dans les sécrétions. Les IgA sécrétoires constituent une défense importante contre les organismes étrangers qui pénètrent au niveau des muqueuses.

Les IgE sont monomériques et sont retrouvées à l'état de trace dans le sérum. Leur chaîne lourde est constituée de 4 domaines constants et leur poids moléculaire est de 188 kDa. Elles sont impliquées dans la réponse anti-parasitaire, notamment contre les helminthes via l'activation des polynucléaires éosinophiles ainsi que dans l'hypersensibilité immédiate via la granulation des mastocytes après pontage des IgE sur les récepteurs FcεRI.

Enfin, les IgD, monomériques, sont principalement retrouvées à la surface des lymphocytes B naïfs et leur fonction biologiquement est mal connue. Leur chaîne lourde est constituée de 3 domaines constants et leur poids moléculaire est de 184 kDa.

| | Immunoglobulin | | | | | | | | |
|---|----------------|------------|------------|------------|-------|------------|------------|----------|--------------------|
| | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgM | IgA1 | IgA2 | IgD | IgE |
| Heavy chain | γ_1 | γ_2 | γ_3 | γ_4 | μ | α_1 | α_2 | δ | ϵ |
| Molecular weight (kDa) | 146 | 146 | 165 | 146 | 970 | 160 | 160 | 184 | 188 |
| Serum level (mean adult mg/ml) | 9 | 3 | 1 | 0.5 | 1.5 | 3.0 | 0.5 | 0.03 | 5×10^{-5} |
| Half-life in serum (days) | 21 | 20 | 7 | 21 | 10 | 6 | 6 | 3 | 2 |
| Classical pathway of complement activation | ++ | + | +++ | - | ++++ | - | - | - | - |
| Alternative pathway of complement activation | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Placental transfer | +++ | + | ++ | - + | - | - | - | - | - |
| Binding to macrophage and phagocyte Fc receptors | + | - | + | - + | - | + | + | - | + |
| High-affinity binding to mast cells and basophils | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ |
| Reactivity with staphylococcal Protein A | + | + | - + | + | - | - | - | - | - |

Figure 7 - Caractéristiques des différentes classes et sous classes d'immunoglobuline

D'après Janeway's Immunology 9^e édition

3.1.3.2 Fonction effectrice

La fraction Fc des anticorps comporte 3 fonctions effectrices principales que sont l'activation de la voie classique du complément, l'opsonisation et l'activation de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

3.1.3.2.1 Activation de la voie classique du complément

L'activation de la voie classique du complément est initiée par la fixation de la protéine C1q à au moins deux domaines CH2 du fragment Fc des immunoglobulines IgG1, IgG2, et IgG3, ou un domaine CH4 des IgM. La molécule C1q est associée à deux sérines estérases C1r et C1s. Cette fixation entraîne l'auto-activation de C1r qui clive et active ainsi C1s. Le composant C1s activé clive alors le composant C4 présent dans le plasma en un petit fragment C4a, libéré en phase fluide, et un fragment majeur C4b, qui se fixe alors de façon covalente à la surface-cible de l'activation. Le composant C2, circulant dans le plasma, peut alors s'associer au C4b et être clivé à son tour par C1s en un fragment C2a, qui reste associé à C4b, et un fragment C2b libéré en phase fluide. Ainsi se trouve formé sur la surface activatrice le complexe C4b2a, appelé C3 convertase classique car il a la capacité de cliver C3 en C3a et C3b. La molécule C3b nouvellement formée peut s'associer au facteur B et former le complexe C3Bb ou C3 convertase alterne, qui peut à nouveau cliver une molécule de C3 et réaliser une boucle amplificatrice. Par ailleurs l'association des C3 convertases classique et alterne avec des molécules supplémentaires de C3b peut changer l'affinité pour leur substrat et leur conférer une activité C5 convertase. Le composant C5 est alors protéolysé en C5a et C5b. Le C5b peut s'associer aux composants C6, C7, C8 et C9 pour former le complexe d'attaque membranaire

responsable de la lyse osmotique de la cellule cible. Le complément agit également via les molécules C3a et C5a qui sont des anaphylatoxines possédant des capacités chimiotactiques sur les cellules du système immunitaire et peuvent activer les cellules endothéliales et les plaquettes.

Ce système est par ailleurs hautement régulé afin d'éviter la propagation de l'activation aux cellules environnantes. Ainsi le facteur I et ses cofacteurs (facteurs H, MCP et CR1) inactivent le C3b en C3bi puis le protéolysent en C3dg et participent avec la *C4 binding protein* (C4bp) à la dégradation du facteur C4b en C4d. Par ailleurs des protéines membranaires DAF (decay accelerating factor ou CD55) accélèrent la dissociation des C3 et C5 convertases. Les fragments de clivage de C3 (C3b, C3bi, C3dg) qui opsonisent la cible antigénique permettent sa phagocytose via leurs interactions avec les récepteurs CR1, CR3 et CR4 des cellules phagocytaires. Les fragments C3b sont reconnus par le CR2 qui est exprimé par les lymphocytes B, ce qui abaisserait leur seuil d'activation en présence de l'antigène et permettrait de moduler la réponse immunitaire vers une réponse humorale. Enfin, ceux liés aux complexes immuns permettent leur élimination grâce à leur fixation sur CR1, présent sur les hématies, qui les transportent jusqu'au foie où ils sont phagocytés par les cellules de Kupffer.

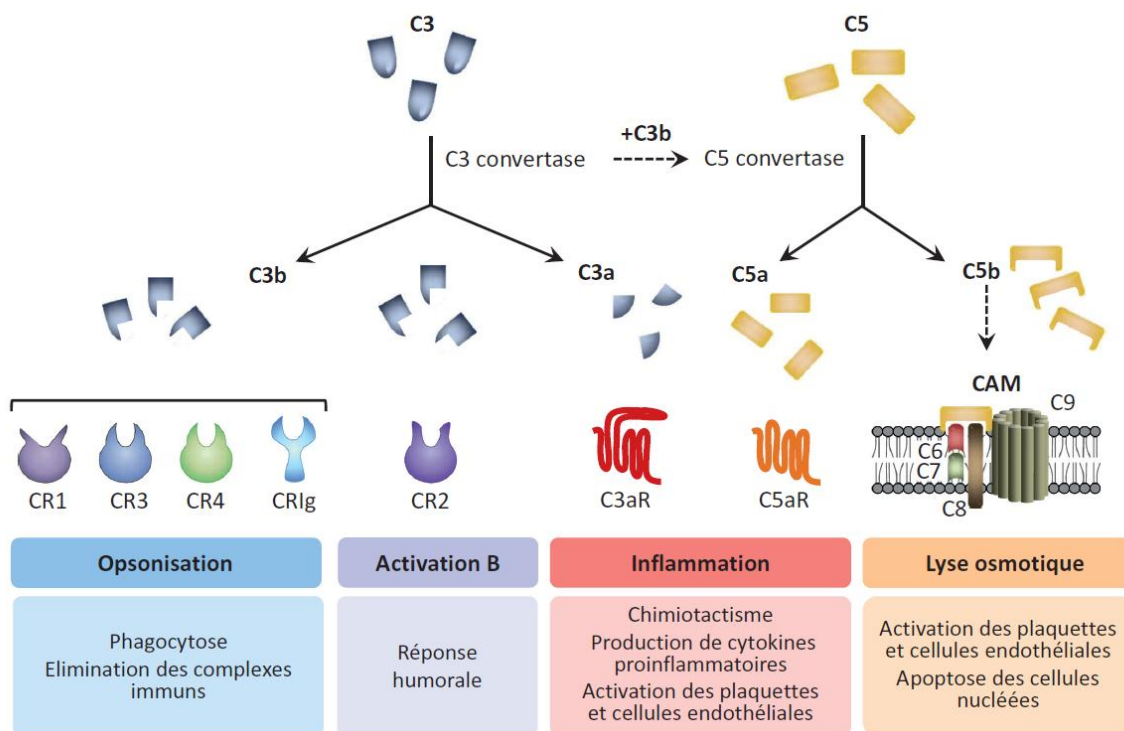


Figure 8 - Conséquences de l'activation du complément

D'après Immunologie fondamentale et immunopathologie 2^e édition

3.1.3.2.2 Opsonisation et cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)

L'opsonisation représente le recouvrement d'une cible antigénique par des anticorps spécifiques de cet antigène. La fraction Fc des anticorps fixés peut interagir avec des récepteurs spécifiques, les récepteurs FcRs (notamment les FcγRs se liant aux IgG) situés à la surface des cellules phagocytaires et faciliter ainsi la phagocytose de l'antigène.

De la même manière, la fraction Fc des anticorps fixée sur une cellule présentant à sa surface un antigène peut interagir avec les FcRs présents sur les cellules NK (tel que FcγRIII/CD16) et entraîner une lyse de la cellule cible par implication du système perforine/granzyme. D'autres cellules peuvent être impliquées dans le processus d'ADCC tels que les neutrophiles et les monocytes.

3.2 Epitopes des anticorps anti-HLA

Pour qu'une molécule HLA puisse être la cible d'un anticorps, plusieurs critères doivent être remplis. Il est tout d'abord nécessaire qu'il existe une différence significative dans la séquence polypeptidique exposée à la surface de la molécule HLA entre donneur et receveur, l'immunogénicité relative d'une molécule HLA n'étant pas une propriété intrinsèque à celle-ci. Cette différence doit par ailleurs être accessible aux régions CDRs des anticorps, un anticorps étant trois fois plus volumineux qu'une molécule HLA.

De nombreux travaux ont tenté d'identifier quelles étaient les cibles des anticorps anti-HLA. Il a été découvert à travers les techniques de microlymphocytotoxicité (LCT) que certains épitopes étaient restreints à un seul antigène HLA, appelés épitopes privés, alors que d'autres étaient partagés par un ensemble d'antigènes et étaient alors dit épitopes publics. Les familles d'antigènes qui partagent au moins un épitope définissent les groupes de réactivité croisée ou CREG (*cross-reactive groups*)(16,17). Afin d'améliorer les résultats de la transplantation rénale, une allocation des greffons basée sur les CREG a même été réalisée en Amérique du nord dans les années 1990 mais une telle initiative n'avait pas été retenue en Europe en raison d'un bénéfice jugé moindre par rapport à l'allocation HLA-A, B, DR conventionnelle (18).

Plus tard, l'équipe de Terasaki a testé la réactivité de chacun des anticorps anti-HLA purifiés à partir de sérums de sujets immunisés ou d'anticorps anti-HLA monoclonaux de souris avec la technique Single Antigen de Luminex®. Chaque anticorps réagissait avec un groupe d'antigène donné et une analyse comparative des séquences en acides aminés de ces différents antigènes permettait de déduire les résidus mis en jeu dans la reconnaissance de l'anticorps. Ainsi, 138 épitopes privés ont pu être identifiés en classe I et 83 en classe II. Les épitopes définis par cette méthode ont été nommés épitopes Terasaki (TerEp). En raison du nombre limité d'allo-anticorps étudié cette liste n'est probablement pas exhaustive (19).

Au début des années 2000, grâce à la connaissance des séquences complètes des molécules HLA de la population générale ainsi que leur modélisation 3D, l'équipe de Duquesnoy a mis au point un algorithme, nommé HLAMatchmaker®, permettant d'analyser le degré de compatibilité théorique entre donneur et receveur en comparant les séquences d'acides aminés de leurs molécules HLA respectives (20). La version initiale, utilisait des triplets, séquences linéaires de 3 résidus d'acides aminés. Une étude rétrospective menée à partir d'une large cohorte de patients a démontré que la survie du greffon était similaire entre les patients ayant bénéficié d'une transplantation HLA compatible pour les antigènes A et B et ceux présentant un *mismatch* A, B mais appariés sur le plan des triplets (21). Cette approche en triplets s'est cependant avérée trop restrictive et a rapidement évolué pour inclure des séquences d'acides aminés discontinues. Le terme de triplet a alors été remplacé par celui d'eplet. Ces eplets pourraient être assimilés aux épitopes fonctionnels. Au total 199 eplets ont été définis pour les molécules HLA de classe I, dont plus de la moitié se situe au niveau des hélices alpha, soit sur les bords de la poche à peptide. Pour les molécules HLA de classe II, 342 eplets ont été définis. Dans sa version finale, HLAMatchmaker permet une analyse des eplets selon le profil d'immunisation du receveur et peut déterminer quels sont les eplets autorisés et interdits. Utilisé par le réseau Eurotransplant pour l'attribution des greffons aux patients hyperimmunisés, il a permis d'étendre la liste des antigènes permis et ainsi réduire le délai d'attente avec de bons résultats quant à la survie du greffon (21,22).

Une étude comparative a par la suite montré un important chevauchement entre les eplets et TerEps. Un certain nombre d'eplets n'avait cependant pas d'équivalent en TerEps et inversement, suggérant que l'immunogénicité théorique des eplets et immunogénicité réelle ne sont pas systématiquement associées (23).

En pratique, les patients pourront donc développer des anticorps contre des molécules HLA différentes de celle du « soi » définies sur le plan sérologique mais aussi sur le plan allélique, si le résidu variable se situe à une position clé. Pour les molécules de classe II, telle que HLA-DQ, la majorité des anticorps reconnaissent la chaîne DQ β , tandis que certains se lient à la chaîne DQ α , mais il est également possible pour un individu de fabriquer des anticorps contre un épitope formé par l'appariement spécifique de chaînes DQ α et DQ β .

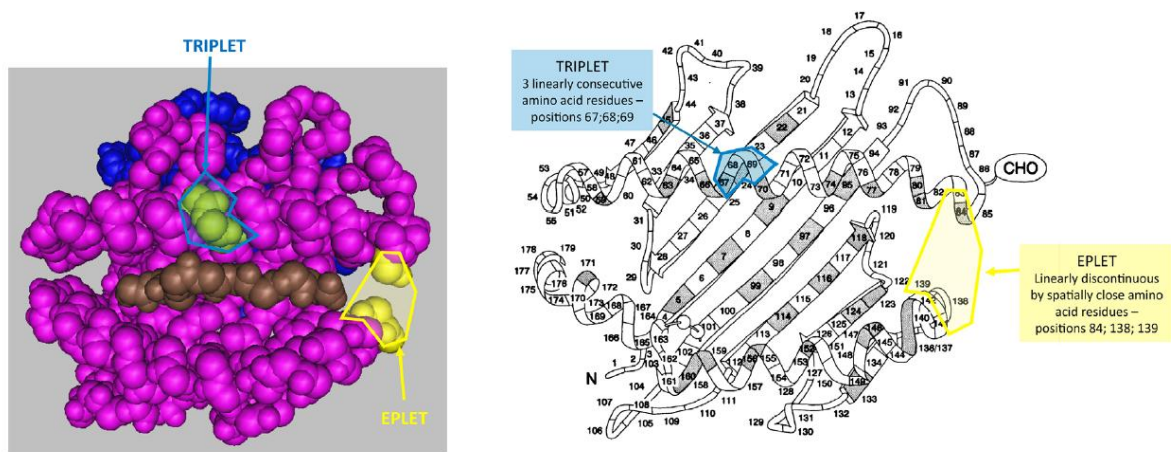


Figure 9 - Représentation d'un triplet et d'un eplet

D'après Tambur et al.(24)

3.3 Origine des anticorps anti-HLA

3.3.1 Génération des anticorps

Trois événements principaux sont connus pour engendrer la production d'allo-anticorps : la grossesse (par exposition à des antigènes paternels chez le fœtus), les transfusions sanguines et les transplantations/greffes.

Les allo-antigènes HLA présents dans un organisme activent les lymphocytes B naïfs au niveau des pores des sinus sous capillaire des organes lymphoïdes secondaires soit de manière directe ou après présentation par les cellules dendritiques folliculaires. Après activation, ces lymphocytes B expriment à leur surface le CCR7, ligand des chimiokines CCL21 et CCL19 produites par les cellules réticulaires fibroblastiques au niveau de la zone T. Ils conservent par ailleurs l'expression de CXCR5 qui, grâce à l'interaction avec son ligand CXCL13 principalement sécrété par les cellules dendritiques folliculaires, participe au regroupement des lymphocytes B au niveau du follicule. Cette double expression entraîne une migration des lymphocytes B activés au niveau de la frontière entre la zone T et B où elles présentent l'antigène par l'intermédiaire des molécules HLA de classe II aux lymphocytes T CD4. Une fois activé, ces derniers se polarisent vers un phénotype Tfh, qui sont alors capable de soutenir la différenciation et la maturation des lymphocytes B par des interactions directes via des molécules co-stimulatrices telles que CD40 / CD40-L et par la sécrétion de cytokines (25).

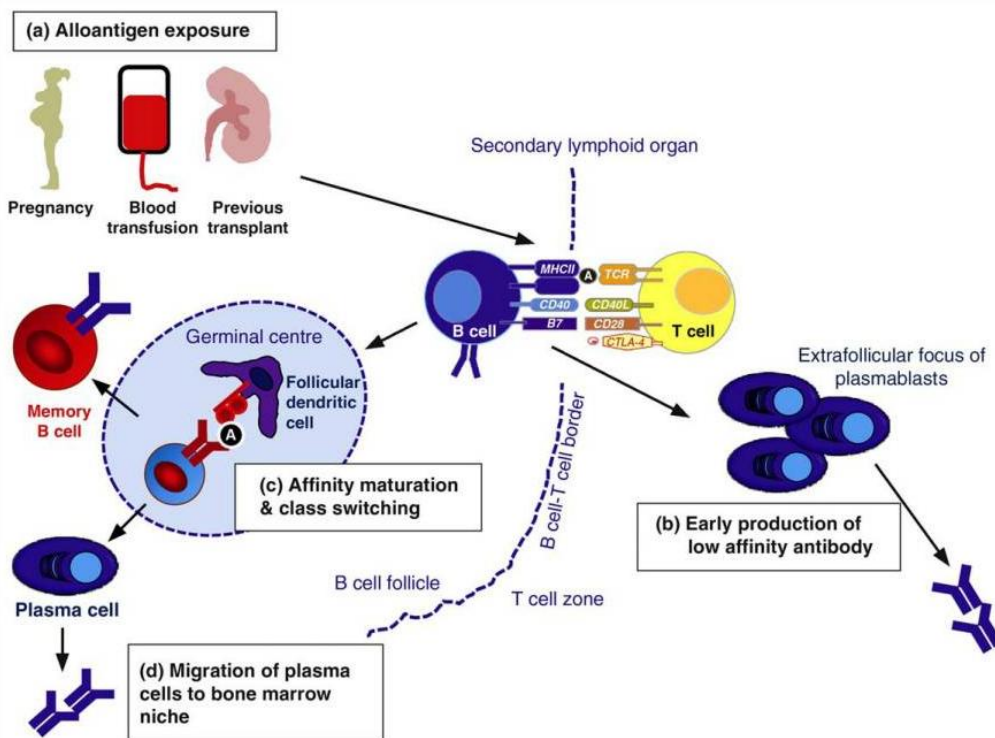


Figure 10 - Production des anticorps anti-HLA

D'après Clatworthy *et al.*(25)

Après activation T-dépendante, les lymphocytes B peuvent évoluer de deux manières. Ils peuvent se différencier en plasmocytes de courte durée de vie et sécréter des anticorps de faible affinité de type IgM, ce qui constitue la réponse immune primaire, ou migrer dans les centres germinatifs et subir des hypermutations somatiques et la commutation de classe. En résulte des clones lymphocytaires B mutés produisant principalement des anticorps anti-HLA de type IgG avec une forte affinité pour l'antigène. Ces lymphocytes se différencient alors soit en lymphocytes B mémoires, soit en plasmocytes. Une partie des plasmocytes se dirige dans la moelle osseuse pour devenir des plasmocytes à longue durée de vie responsables du maintien des anticorps anti-HLA dans le sérum. Dans le cas des transplantations, l'activation des lymphocytes B pourrait se produire directement dans le greffon comme le suggère les observations faites selon lesquelles des organes lymphoïdes tertiaires seraient capable de se former dans des allogreffes rénales et cardiaques humaines (26,27).

3.3.2 La grossesse

La grossesse est l'une des principales causes d'immunisation anti-HLA. Elle est due à l'exposition à des antigènes fœtaux d'origine paternelle au niveau de la barrière fœto-placentaire et/ou lors de la délivrance. De nombreux mécanismes physiologiques interviennent pour induire une tolérance immunitaire materno-fœtale. Parmi eux on retrouve une expression différentielle des molécules HLA au sein du tissu fœtal (28). Les cellules du syncytiotrophoblaste, en contact étroit avec le système immunitaire maternel, n'expriment pas de molécules HLA classiques, ce qui les protège des lymphocytes T maternels. Les cellules du cytotrophoblaste, en contact plus limité avec le système immunitaire maternel, expriment des molécules HLA classiques C et non classiques HLA-G et -E. L'interaction entre les récepteurs inhibiteurs des cellules NK, et ces molécules permettrait de bloquer leur action lytique vis-à-vis des cellules trophoblastiques. D'autres mécanismes impliquant les lymphocytes T régulateurs sont mis en jeu (29). Malgré cela, le système immunitaire maternel est

néanmoins capable de produire des anticorps dirigés contre les antigènes HLA d'origine paternelle exprimés par le fœtus. Des études suggèrent que 30 à 50% des femmes multipares développent des anticorps anti-HLA fœto-paternel pendant la grossesse contre 10 à 20% des femmes primipares (30,31). Les anticorps apparaissent généralement au cours du troisième trimestre et au moment de l'accouchement en raison du passage de cellules fœtales dans la circulation sanguine maternelle. Ces anticorps pourraient jouer un rôle dans certaines complications obstétricales comme les accouchements prématurés ainsi que dans les pré-éclampsies (32,33).

3.3.3 Transfusions

Les transfusions de produits sanguins labiles demeurent une source d'allo-immunisation HLA chez les patients en attente de transplantation rénale, qu'ils soient déplétés ou non en leucocytes, comme le confirment plusieurs études utilisant des méthodes de détection sensibles des anticorps anti-HLA en phase solide. (34,35) En effet les plaquettes expriment à leur surface les molécules HLA de classe I en grande quantité (80 000/plaquettes)(36) et contrairement aux idées reçues les hématies en expriment également, en moindre quantité (100-2000/hématie)(37). L'âge semble être un facteur de risque d'allo-immunisation après transfusion de culots globulaires. Les patients de moins de 20 ans seraient en effet 4 à 5 fois plus susceptibles de produire des anticorps anti-HLA que les patients de plus de 20 ans (38). Un autre facteur de risque est le recours à des transfusions itératives : il existe alors une relation nette entre le nombre de transfusions et la production d'anticorps anti-HLA allant de 5 à 50% lors de transfusions de 50 à 100 culots, à environ 70% lors de transfusions de plus de 200 culots (39). Par ailleurs, en cas de transfusions plaquettaires multiples, la survenue d'un état réfractaire est une complication fréquente (40), pouvant témoigner de l'allo-immunisation anti-HLA. Un appariement HLA des plaquettes est alors nécessaire.

3.3.4. Transplantation

La transplantation de tout organe solide représente un risque majeur d'allo-immunisation en raison de la charge antigénique importante. La sensibilité et la résolution des techniques de détection en phase solide utilisées aujourd'hui permettent de mieux apprécier l'incidence de la production des anticorps anti-HLA *de novo* chez les patients transplantés, notamment ceux dirigés contre le donneur appelé DSA (*donor specific antibodies*). Cette incidence est estimée à 2% à 1 an et 10 % à 5 ans et augmente avec le temps écoulé depuis la transplantation (41). En situation de greffon fonctionnel, plusieurs événements peuvent être impliqués dans la survenue de DSA *de novo* comme un âge jeune (42), une mauvaise adhérence au traitement immunosuppresseur ou une immunosuppression inadéquate (43), un mismatch en classe II (HLA DR et/ou DQ)(44,45) ou des infections prolongées par le BK virus (46).

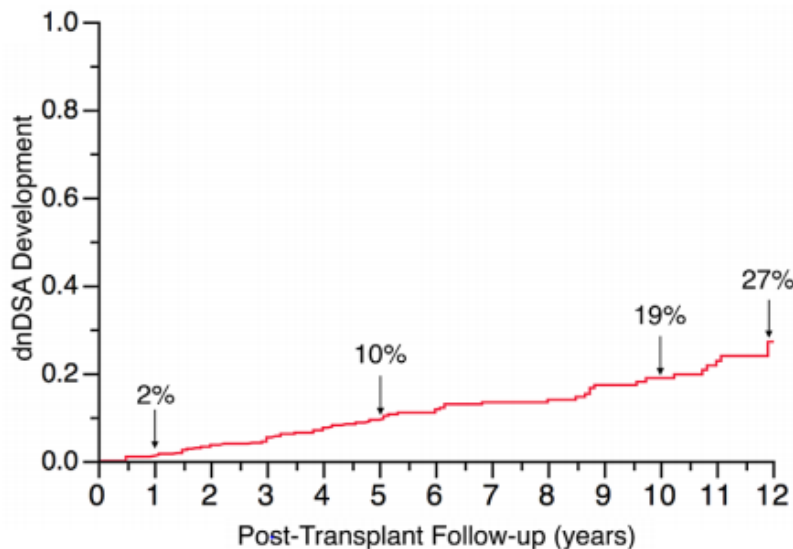


Figure 11 - Apparition de DSA *de novo* après transplantation rénale

D'après Wiebe et al.(41)

Cependant, ce sont la perte du greffon puis la levée de l'immunosuppression et la transplantectomie qui représentent les facteurs les plus à risque de développer des anticorps anti-HLA, y compris lorsque la perte du greffon est très précoce (complications vasculaires) et que le temps d'exposition aux allo-antigènes est court (47–49). Au total, environ 70% des patients présentent une allo-immunisation HLA après échec de transplantation, mais la plupart d'entre eux ne sont pas immunisés au moment de la perte du greffon (50). De façon intéressante, une étude américaine rétrospective a montré, sur une cohorte de 15980 patients, qu'une incompatibilité des molécules HLA-A,-B lors d'une première transplantation augmentait le risque d'allo-immunisation après perte du greffon de 10% (si 0 mismatch) à 37% (si ≥ 1 mismatch)(51). En cas de mismatches en classe I, Fuller et al. indiquent que le génotype HLA-DR d'un individu conditionne la survenue de la réponse allo-immune contre des épitopes publiques en classe I (52). Une autre étude portant cette fois sur des sujets pédiatriques a par la suite mis l'accent sur le fait que le degré d'allo-immunisation après échec de transplantation et la durée d'attente pour une re-transplantation augmentaient avec le nombre de mismatch HLA-DR lors de la première transplantation (53).

3.3.5 Anticorps naturels

L'immunisation « naturelle » est dite d'une immunisation détectée chez des sujets n'ayant jamais connu d'évènement allo-immunisant. Les premiers anticorps décrits étaient de type IgM et ont été détectés en LCT. L'apparition des techniques sensibles utilisant la technologie Luminex® type SAG a ensuite permis la mise en évidence d'anticorps anti-HLA d'isotype IgG chez ce même type de sujet. La fréquence de ces anticorps est variable dans la population et varie entre 1 et 63% selon les études (31,54).

Une des explications possible à l'apparition de ces anticorps est l'existence d'une réactivité croisée entre des épitopes HLA et ceux de certains micro-organismes, de protéines alimentaires ou d'allergènes. Parmi les micro-organismes, certains virus ont été pointés du doigt. Il a par exemple été montré que des anticorps anti-HLA de classe I et II étaient retrouvés chez des patients non transfusés atteints d'hépatite virale C et que la présence de ces anticorps était corrélée à l'activité de la maladie (55). Les travaux rapportant le développement d'anticorps anti-HLA après infections virales restent cependant anecdotiques, de grandes études contrôlées et prospectives sur le sujet

faisant défaut. Par ailleurs, une étude récente, utilisant 51 anticorps monoclonaux humains spécifiques des virus du VIH, de la varicelle (VZV), du cytomégalovirus (CMV) et du parvovirus testés en Single Antigen et 41 anticorps anti-HLA testés contre des antigènes viraux courants du CMV, du VZV, du VIH, de l'Epstein-Barr et du BK n'ont pas réussi à montrer l'existence de réactivité croisée (56) En ce qui concerne les bactéries, une analogie a été mise en évidence entre certains composants bactériens et certaines molécules HLA, expliquant pourquoi ceux-ci pouvaient inhiber des réactions de LCT. C'est le cas de la protéine M1 du streptocoque(57), et de certains lipopolysaccharides notamment d'*E. coli* et de *Salmonella sp* (58).

D'autres travaux ont rapporté l'hypothèse que certains anticorps naturels pouvaient correspondre à des auto-anticorps anti-HLA-E, molécule HLA non classique peu polymorphe exprimée principalement en cas de stress (59).

Enfin il est important de noter que ces anticorps anti-HLA n'ont une significativité clinique que lorsqu'ils reconnaissent l'antigène directement à la surface cellulaire. Il a en effet été montré que la plupart d'entre eux reconnaissent des épitopes cryptiques (54), c'est-à-dire accessible seulement après dénaturation des molécules HLA, et n'entraînent alors que rarement une positivité en crossmatch (XM) et n'ont pas d'impact sur la survenue de rejet ou la survie du greffon (60).

3.4 Méthodes de détection des anticorps anti-HLA

3.4.1 Microlymphocytotoxicité (LCT)

3.4.1.1 Principe

Le test de lyse des lymphocytes a été miniaturisé dans les années 1960 par Paul Terasaki, le rendant accessible à tous les laboratoires, et correspond à la technique historique de référence de détection et d'identification des anticorps anti-HLA. Il consiste à mettre en contact le sérum du receveur avec un panel de lymphocytes B et T de typage HLA connu. Après incubation, du complément de lapin est ajouté au mélange et celui-ci s'active au contact des cellules ayant fixé les anticorps. La mortalité cellulaire, causée par la présence des anticorps anti-HLA, est déterminée par comptage au microscope grâce à des colorants vitaux, comme le bromure d'éthidium et l'acridine orange, et l'intensité de la réaction est appréciée à l'aide d'un score international établi par l'*American Society of Histocompatibility and Immunogenetics* (ASHI) allant de 1 (0 à 10% des cellules du puits sont mortes) à 8 (80% à 100% des cellules sont mortes). Une réaction positive est définie par une lyse cellulaire supérieure à 20%. Une partie du sérum est traitée au dithiothreitol (DTT) qui est agent réducteur responsable de la rupture des ponts disulfures des IgM polymériques, les rendant inapte à activer le complément. La comparaison des résultats obtenus entre sérum traité et sérum non traité au DTT permet de distinguer l'isotype de l'anticorps cytotoxique. Le choix du panel de lymphocyte utilisé est primordial et est supposé représenter le plus fidèlement possible la répartition des typages HLA au sein de la population locale pour ainsi pouvoir calculer le pourcentage de lymphocytes lysés par rapport au nombre total de lymphocytes utilisés, ou *panel reactive antibodies* (PRA). Le PRA reflète la difficulté d'accès à la greffe pour un patient.

En pratique actuelle, la LCT est surtout utilisée pour la réalisation des XM. Le test est alors utilisé de la même manière mais les lymphocytes du panel sont remplacés par les lymphocytes du donneur. Ces lymphocytes peuvent provenir des ganglions, de la rate ou du sang périphérique du donneur. Un XM positif en IgG sur les lymphocytes T ou totaux du donneur avec le sérum du jour est une contre-indication absolue à la greffe, en raison du risque de rejet hyper aigu. Lorsque celui-ci est positif uniquement avec les lymphocytes B du donneur, les attitudes varient selon les équipes de transplantation. La présence d'anticorps cytotoxique d'isotype IgM uniquement ne contre indique

pas la transplantation, ces anticorps étant le plus souvent non spécifiques. Attention cependant à ne pas méconnaître une immunisation anti-HLA non encore commutée en IgG faisant suite à un événement allo-immunisant récent non signalé et pouvant être à l'origine d'une positivité unique en IgM sur le dernier sérum testé.

3.4.1.2 Limites

Bien que ce test ait l'avantage d'être fonctionnel il comprend de nombreuses limites, la principale étant son manque de sensibilité. Il ne détecte en effet que les anticorps capables d'activer le complément et présents en grande quantité dans le sérum. Sa sensibilité peut être améliorée en ajoutant une immunoglobuline anti-IgG humaine, permettant de former des ponts entre les anticorps présents en trop faible quantité pour activer le complément, ou bien de sous-classes d'IgG n'activant pas le complément. Cette technique est cependant difficilement utilisable avec les lymphocytes B du fait de la présence à leur surface d'immunoglobulines et de récepteurs aux fragments Fc γ R. Une autre limite réside en son manque de standardisation. Par ailleurs, la présence d'auto-anticorps ou de certains traitements comme les anticorps monoclonaux anti-lymphocytaire peuvent engendrer des faux positifs.

3.4.2 *Cross match par cytométrie en flux (CMF)*

3.4.2.1 Principe

La technique consiste à mettre en contact le sérum du receveur avec les cellules mononucléées du donneur. Les cellules sont ensuite lavées puis incubées en présence d'anticorps anti-IgG et anti-IgM humaine ainsi que d'anticorps anti-CD45, anti-CD3 et anti-CD19, tous conjugués à des fluorochromes différents. Les anticorps anti-CD3 et CD19 permettront de séparer les populations de lymphocytes T et B respectivement. Cette analyse détecte donc la présence d'anticorps capable de se fixer sur des molécules exprimées à la surface des lymphocytes T et B. Un sérum témoin négatif (pool de sérum de groupe AB sans anticorps anti-HLA) est systématiquement testé en parallèle ainsi que la réalisation d'un cross-match autologue, consistant en la mise en contact du sérum du patient avec ses propres cellules. Les résultats s'interprètent selon le sérum témoin négatif qui permettra de définir le seuil de positivité pour le fluorochrome d'intérêt (couplé à l'anticorps anti-IgG). Cette technique bénéficie d'une meilleure sensibilité que le XM LCT.

3.4.2.2 Limites

La réalisation de cette analyse nécessite des moyens et une technicité plus importante que le XM LCT et son interprétation n'est pas codifiée. En outre, la réalisation d'un contrôle autologue est primordiale car des faux positifs sont fréquents sur les lymphocytes B.

3.4.3 *Techniques en phase solide actuelles utilisant la technologie Luminex®*

La technologie Luminex® est un test de CMF « multiplex » car plusieurs réactions s'opèrent dans un même puits. Elle est de ce fait beaucoup plus rapide que les méthodes ELISA historique (non abordée dans ce manuscrit). Elle utilise des microbilles synthétiques en polystyrène, sur lesquelles sont fixés des antigènes HLA purifiés. Les microbilles comprennent chacune un assemblage de 2 fluorochromes en proportion variable selon le type de bille, excitables à 635 nm. Le sérum est incubé en présence des billes et la fixation d'anticorps anti-HLA est détectée après lavage, par incubation avec un conjugué anti-IgG humaine couplé à la phycoérythrine. Les billes sont ensuite lavées et passées en cytométrie. Le laser d'une longueur d'onde de 635 nm permet d'individualiser les différentes populations de billes en nuages selon leur signature d'émission lumineuse. Un second laser à 532 nm

stimule la phycoérythrine et est informatif sur la présence ou non d'anticorps anti-HLA fixés à la surface des billes. L'intensité de fluorescence détectée est proportionnelle à la densité des anticorps présents à la surface des billes. La fluorescence brute est ensuite normalisée à l'aide d'un logiciel d'analyse par soustraction du bruit de fond non spécifique obtenu à partir d'une bille sur laquelle aucune molécule HLA n'est fixée et à partir des résultats d'un sérum témoin négatif. La valeur obtenue appelée MFI (*Mean fluorescence intensity*) estime la « force » de l'immunisation pour chaque molécule HLA, qui est en fait un critère composite regroupant la concentration de l'anticorps ainsi que son avidité et son affinité dans un milieu compétitif.

Il existe des tests dits de dépistage/*screening* (les billes sont recouvertes d'un pool d'antigènes classe I ou II, issu de plusieurs lignées cellulaires) conduisant à un résultat qualitatif négatif/positif et des tests d'identification appelé *Single Antigen* (chaque bille est recouverte d'une molécule HLA recombinante obtenue après transfection d'un plasmide contenant un allèle HLA de classe I ou II dans des lignées dépourvues de HLA). Le test *Single Antigen* permet de déterminer le PRA calculé (cPRA) ou TGI (Taux de greffons incompatibles) et il est particulièrement utile en cas de forte immunisation afin d'identifier avec précision les antigènes acceptables en pré-greffe, et l'apparition de DSA *de novo* en post-greffe. Sa sensibilité a permis une meilleure compréhension des rejets de greffe à médiation humorale, notamment par la détection d'anticorps anti-HLA jusqu'alors non identifiables (comme ceux dirigés contre les molécules HLA-C, -DP, DRB3,-4,-5, les chaînes α du DQ ou du DP, ou contre certains allèles).

3.4.3.3 Limites de la méthode

3.4.3.3.1 Interférences négatives

En 2011, une équipe a décrit un effet « prozone », appelé ainsi en raison de la décroissance du signal observé pour les anticorps de forte voire très forte MFI (61). Les auteurs observaient une réversibilité de l'interférence par un traitement du sérum à l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), au DTT, à la chaleur (56°C pendant 30 min) ou par la dilution du sérum. Ces trois premiers traitements ayant en commun leur capacité de détruire le complexe C1. Ainsi une des hypothèses était que l'association des fragments C1r, C1s et C1q empêchait la fixation du conjugué anti-IgG fluorescent aux anticorps anti-HLA liés aux billes par un encombrement stérique. Cette encombrement est en fait dû à l'accumulation des produits d'activation du complément tel que C3 ou C4 responsable du masquage de la fraction Fc des anticorps anti-HLA au conjugué. Cette interférence, surtout rencontrée avec les kits du fournisseur One Lambda® (utilisé à Bordeaux et dans la majorité des laboratoires), expliquait les variations de profil au cours du temps observées chez certains patients fortement immunisés. Elle est maintenant prévenue par le traitement systématique des sérums à l'EDTA, par exemple (62).

3.4.3.3.2 Interférences positives

3.4.3.3.2.1 Interférence médicamenteuse

Les préparations des Ig-IV (intra-veineuse) contiennent des anticorps anti-HLA et entraînent une positivité de la quasi-totalité des billes en *Single Antigen*.

3.4.3.3.2.2 Antigènes dénaturés

Comme nous l'avons vu précédemment, la détection d'anticorps anti-HLA chez des sujets n'ayant jamais eu d'évènement allo-immunisant est possible et varie selon les groupes de population

étudiés. Cependant la fréquence observée parfois très élevée de ces anticorps « naturels » a remis en question la sensibilité élevée du SAG.

Sur une cohorte de sujet présentant des anticorps naturels, une étude plus poussée des épitopes reconnus par ces anticorps a montré que 40% d'entre eux se situaient directement à la surface des molécules HLA (anticorps naturels anti-HLA natif ou nHLA), et 60% se situaient dans une zone accessible uniquement après dénaturation de la molécule HLA par un traitement acide (anticorps naturel anti-HLA dénaturé ou anti-dHLA). L'hypothèse avancée, sur le fait que la technique SAG puisse détecter ces anti-dHLA, est que les contraintes imposées aux molécules HLA lors des procédés de purification et de fixation sur les billes seraient à l'origine d'une altération plus ou moins importante de leur structure, exposant des épitopes cryptiques (19,54). L'impact clinique réel des anticorps naturels reste encore à déterminer mais le rôle potentiellement pathogène des anticorps naturels anti-nHLA ne doit pas être négligé.

Concernant les anticorps anti-HLA dirigés contre les antigènes dénaturés, plusieurs études ont montré que ces anticorps ne positivent pas les XM par incapacité à reconnaître l'antigène à la surface des cellules et n'ont donc pas d'impact clinique (60,63). Ces anticorps anti-dHLA ne devraient donc pas être pris en compte dans les stratégies d'attribution des greffons étant donné qu'ils peuvent réduire l'accès à la greffe de manière injustifiée.

Il est cependant difficile en pratique de les identifier. Une méthode consiste à traiter les billes avec un tampon acide ($\text{pH} < 3$) entraînant une dénaturation franche des molécules HLA. Si les MFI de certaines spécificités augmentent de façon significative après dénaturation, la présence d'un anticorps anti-dHLA peut être suspectée. Par ailleurs, le fabricant One Lambda® proposait un réactif appelé les iBeads®, constitué de billes SAG classe I ayant subi des traitements enzymatiques permettant de retirer tout ou partie des molécules HLA dénaturées de leur surface, ce qui devait diminuer leur sensibilité aux anti-dHLA. Celles-ci ont été testées dans quelques études et donnaient des résultats prometteurs, mais elles ne sont plus commercialisées (60,63).

3.4.3.3 Seuils de décision

Les fournisseurs des tests n'ont pas défini de seuil de positivité de MFI, supposant que tout signal supérieur au bruit de fond puisse être positif sur le plan biologique. Cependant le seuil à partir duquel est objectivé un impact clinique n'est pas clairement défini. Qui plus est, l'absence de standardisation entre les tests des deux fabricants disponibles et la relative hétérogénéité des résultats entre laboratoires d'histocompatibilité rendent difficile une codification stricte des résultats bruts obtenus.

En situation pré-greffe, l'agence de Biomédecine définit un antigène comme étant « permis » lorsque la bille la plus élevée portant cet antigène présente une $\text{MFI} < 500$ (réactifs One Lambda) ou un $\text{AD-BCR} < 2$ (Antigen density adjusted B-cell receptor)(réactif Immucor). Ces antigènes sont ceux contre lesquels un receveur ne possède aucune immunisation. Par ailleurs, une MFI supérieure à 1000 est communément utilisée pour définir les « antigènes interdits », c'est-à-dire les antigènes contre lesquels un risque immunologique existe pour le patient, avec un risque non négligeable d'obtenir un XM CMF positif. Ce seuil est augmenté à 2000 pour les patients hyperimmunisés. On parle de « zone grise » pour les spécificités ni permises ni interdites.

A noter que certains centres pratiquent pour certains patients des transplantations à risque immunologique plus élevé pour lesquelles, en général, une MFI maximum de 3000 est la limite à ne pas franchir et une thérapie adaptée doit être mise en place. En effet, comme vu précédemment, Lefaucheur et al. ont montré que le risque de rejet humoral augmentait avec la

valeur des MFI des DSA préformés avant la greffe (les patients avec des MFI>6000 avaient un risque 100 fois plus élevé de développer un rejet humoral que ceux avec des MFI<465).

3.4.4 Détermination des classes et sous-classes d'immunoglobulines

L'utilisation de conjugués spécifiques a permis d'étudier les sous-classes des IgG anti-HLA et également d'autres classes que les IgG, notamment les IgM et IgA anti-HLA.

Dans plusieurs études, la quasi-totalité des patients présente des IgG1(64,65). De plus, les auteurs observaient que la composition en sous-classes pouvait être influencée par le mode d'immunisation, les grossesses et les pertes de greffons entraînant des immunisations composées de sous-classes multiples, et les transfusions des immunisations limitées aux IgG1. La présence de DSA d'isotype IgG4 était associée aux rejets humoraux infra-cliniques, par opposition à la présence d'IgG3 plutôt associée aux rejets aigus humoraux. (66,67)

Concernant les IgM, une étude portant sur 92 patients hyperimmunisés a montré que la présence de DSA d'isotype IgM en post transplantation (resynthèse ou expression de novo) était associée à une mauvaise survie du greffon (68). Enfin, une équipe s'est plus récemment intéressée à l'impact des anticorps anti-HLA de type IgA sur 694 patients re-transplantés et a mis en évidence une réduction significative de la survie du greffon lorsque ces anticorps anti-HLA de type IgA étaient présents, d'autant plus s'ils étaient associés à des anticorps anti-HLA de type IgG (69).

Cependant, l'étude des classes et sous-classes des anticorps anti-HLA n'est pas réalisée en routine en raison du surcoût important engendré par ces tests et l'absence d'étude médico-économique justifiant leur utilisation.

3.4.5 Tests d'activation et fixation du complément

Des modifications du test SAG ont été réalisées afin de détecter les anticorps capables de fixer le C1q ou d'activer le complément (test C3d). De nombreuses études ont décrit une association entre la détection de DSA C1q+/C3d+ et la survenue de rejet humoral ou la perte de greffon plus rapide (70,71), mais d'autres ont décrit l'inverse (72–74). Ces études semblent néanmoins pointer du doigt le fait que la fixation du C1q/C3d est, à de rares exceptions près, souvent corrélée à la MFI de l'anticorps correspondant, ce qui limiterait son intérêt en pratique (72). Cela n'a cependant pas été formellement démontré. L'étude de la fixation/activation du complément par les anticorps anti-HLA n'est pas réalisée en routine en raison du surcoût important engendré par ces tests et l'absence d'étude médico-économique justifiant leur utilisation.

3.4.6 Cross match virtuel

L'apparition des techniques sensibles permet désormais d'établir avec précision la liste des anticorps anti-HLA produits par un individu. En cas de proposition d'un greffon, la confrontation des anticorps du receveur aux antigènes du donneur, typé en urgence, permet de conclure quant à la présence ou l'absence de DSA, dans les limites des loci HLA typés, sans avoir à attendre le résultat du XM. Ceci définit le XM virtuel (75). Le but de cette approche est d'anticiper le résultat du XM prospectif et de récuser d'emblée les donneurs présentant des spécificités contre lesquelles des anticorps sont présents chez le receveur. Elle permet ainsi une meilleure régulation du flux des greffons vers les patients pour lesquels le XM est négatif et permet un gain de temps en termes d'ischémie froide par le transfert du greffon en même temps que celui du matériel biologique.

La procédure XM virtuel a été mise en place à l'échelon national en juin 2016. Pour qu'elle soit effective, les antigènes non acceptables ou « interdits » doivent être renseignés pour tous patients immunisés en attente de greffe sur une application internet faisant le lien entre donneur et receveur : CRISTAL. La définition du seuil des antigènes interdits doit se décider en concertation entre le laboratoire et l'équipe clinique sur la base d'un risque immunologique acceptable. Ce seuil peut varier selon les équipes et selon les types de greffons. Il est à noter que seules les spécificités HLA-A,-B en classe I et HLA-DR,-DQ en classe II peuvent être renseignées dans CRISTAL. Il est par ailleurs maintenant recommandé de prendre en compte les déséquilibres de liaison connus entre HLA-DRB1 et HLA-DRB3/4/5 ou HLA-DQA1 pour affiner la liste des antigènes à interdire dans CRISTAL. De même, un antigène pour lequel un patient présentera un anticorps anti-HLA limité à un allèle est à interdire selon la fréquence de cet allèle dans la population. Enfin, pour les patients hyperimmunisés, les antigènes permis doivent également être renseignés.

En cas de données manquantes (typage non précis, sérum de suivi manquant, événement immunisant intercurrent) le XM virtuel n'est pas réalisable.

3.5 Pathogénicité des anticorps anti-HLA

Les anticorps anti-HLA ont trois fonctions majeures. Ils sont tout d'abord capables d'agir directement sur les cellules cibles notamment vasculaires endothéliales de l'organe transplanté et entraîner leur activation. Ils peuvent également activer la voie classique du complément et enfin participer au recrutement des cellules myéloïdes et lymphoïdes via leur fraction Fc, déclenchant ainsi les phénomènes de phagocytose et d'ADCC.

3.5.1 Activation des cellules endothéliales

Plusieurs travaux ont montrés que les anticorps bivalents étaient capables, en créant un « *cross link* » entre deux molécules HLA à la surface des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses, d'entraîner une signalisation intracellulaire. Les molécules HLA n'ont cependant pas d'activité kinase intrinsèque et, par conséquent, doivent s'associer avec d'autres protéines pour transduire les signaux, comme par exemple l'intégrine $\beta 4$ pour les molécules HLA de classe I. La liaison des anticorps anti-HLA avec leur ligand active la voie de signalisation PI3K / AKT / mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et conduit à la phosphorylation des cibles en aval tel que S6K (*S6 kinase*) et S6RP (*S6 ribosomal protein*)(76) ainsi que de la protéine ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)(77) avec pour conséquence une réorganisation du cytosquelette, une prolifération, une migration et une augmentation de la survie cellulaire (78,79). L'endothélium activé acquiert par ailleurs une résistance à la lyse induite par le complément (80). La prolifération ainsi que l'hyperplasie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses sont à l'origine d'une vaso-occlusion progressive, qui conduit à terme à une ischémie du greffon puis à une dégradation progressive de sa fonction.

Les anticorps anti-HLA de classe I sont également capables de stimuler l'expression de P-sélectine et ainsi de faciliter l'adhésion de monocytes et neutrophiles à l'endothélium. Ils peuvent également, par exocytose des corps de Weibel-Palade, libérer du facteur Willebrand permettant la capture, l'activation et l'agrégation des plaquettes (81).

Ces lésions vasculaires peuvent être objectivées au niveau histologique. Sur biopsies du greffon rénal sont en effet observées des lésions de glomérulite et de capillarite péri-tubulaire, correspondant à l'occlusion de la lumière des capillaires par des cellules inflammatoires ou endothéliales.

3.5.2 Activation du complément

La grande majorité des anticorps anti-HLA retrouvés chez les patients sont d'isotype IgG1 et/ou IgG3 et sont donc en mesure d'activer la voie classique du complément une fois fixés sur l'endothélium du greffon. La cascade d'activation et les conséquences générales ont été décrites précédemment (partie 3.1.3). La production des anaphylatoxines C3a et C5a active les cellules endothéliales en induisant l'expression de molécules d'adhésion, comme la E-selectine, VCAM1 (*vascular cell-adhesion molecule 1*) et ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*), ainsi que la synthèse de cytokines et de chimiokines, comme l'interleukine-1 α (IL-1 α), IL-6, CCL5 (ou RANTES) et CXCL8 (ou IL-8)(82). Les anaphylatoxines favorisent également le recrutement des cellules immunitaires innées et adaptatives localement.

L'activation du complément a également un rôle pro-coagulant. En effet, les cascades du complément et de la coagulation comprenant toutes deux des sérines protéases, leur activation peut s'interconnecter et ainsi conduire à la survenue d'évènements thrombotiques délétères pour le greffon (83).

Outre les variations inhérentes aux différentes sous classes d'IgG, plusieurs facteurs peuvent jouer sur l'activation de la voie classique du complément. Selon certaines études, l'activation augmenterait avec la quantité d'anticorps fixés à la surface des cellules endothéliales ainsi qu'avec la présence synchrone de plusieurs anticorps reconnaissant des épitopes différents (65). Enfin, chaque patient ne présente pas exactement la même concentration plasmatique en protéines du complément selon son polymorphisme génétique, ces variations pourraient également moduler la capacité des DSA à activer le complément au contact du greffon (84).

Les cellules endothéliales expriment par ailleurs à leur surface des protéines régulatrices du complément comme DAF (CD55). Ces protéines inactivent les fractions formées après activation comme le C4b en C4d. Le dépôt linéaire de C4d au niveau de l'endothélium du greffon est un marqueur de rejet humoral, utilisé en histologie, et témoigne de manière indirecte de la présence d'anticorps spécifique du donneur.

3.5.3 Interaction avec les récepteurs des fragments Fc

La fraction Fc des anticorps anti-HLA permet de recruter les cellules du système immunitaire au niveau du site de reconnaissance de l'antigène au niveau de l'endothélium du greffon. Ce recrutement passe par les récepteurs FcRs et plus particulièrement les Fc γ R. Il existe trois types de Fc γ R : deux de faible affinité, Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIII (CD16) et un de haute affinité Fc γ RI (CD64). Ces récepteurs sont largement exprimés par les cellules myéloïdes et lymphoïdes. La fixation de l'anticorps sur ce type de récepteur entraîne une activation de la cellule et déclenche les fonctions effectrices telles que la phagocytose ou l'ADCC.

Au cours du rejet humoral, de nombreux travaux utilisant des analyses histologiques ou transcriptomiques témoignent de la présence d'un infiltrat leucocytaire dans le greffon constitué de macrophages CD68+, de polynucléaires neutrophiles ou de cellules NK (85,86).

L'existence de variants alléliques des Fc γ R ou des variations impliquant l'isotype ou le type de glycosylation des anticorps anti-HLA pourrait moduler la capacité des DSA à recruter ces cellules immunitaires et à activer l'ADCC (87).

3.6 Anticorps anti-HLA préformés en transplantation rénale

3.6.1 Impact des DSA préformés

Historiquement, la présence de DSA contre les antigènes HLA de classe I à titre élevé était à l'origine de rejets hyper-aigus correspondant à une nécrose rapide du greffon après implantation, et pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. Les DSA de classe II à titre élevé entraînaient quant à eux un rejet en 2 à 4 jours après la transplantation, ce délai étant dû au fait que les cellules endothéliales n'expriment pas constitutivement les molécules HLA de classe II. La mise en place des techniques de XM en LCT a permis de réduire voire de faire disparaître ce type de rejet.

Il arrive cependant qu'une transplantation ait lieu malgré un XM positif, certains types de résultat ne représentant pas une contre-indication absolue : XM LCT positif sur lymphocyte B uniquement, XM positif par cytométrie en flux (CMF), XM positif sur sérums historiques. Il est cependant établi que les transplantations réalisées avec un XM positif aboutissent à une survie du greffon inférieure. L'avènement des techniques sensibles ont permis par la suite de mettre en évidence l'existence de DSA préformés à des titres plus faibles, n'entraînant pas de positivité des XM.

Une étude portant sur 402 patients transplantés rénaux ayant un XM négatif au moment de la greffe a montré que la survie des greffons à 8 ans était significativement inférieure en présence de DSA (61%) par rapport aux patients porteurs d'anticorps anti-HLA non dirigés contre le greffon (93%) et aux patients non immunisés (84%)(88).

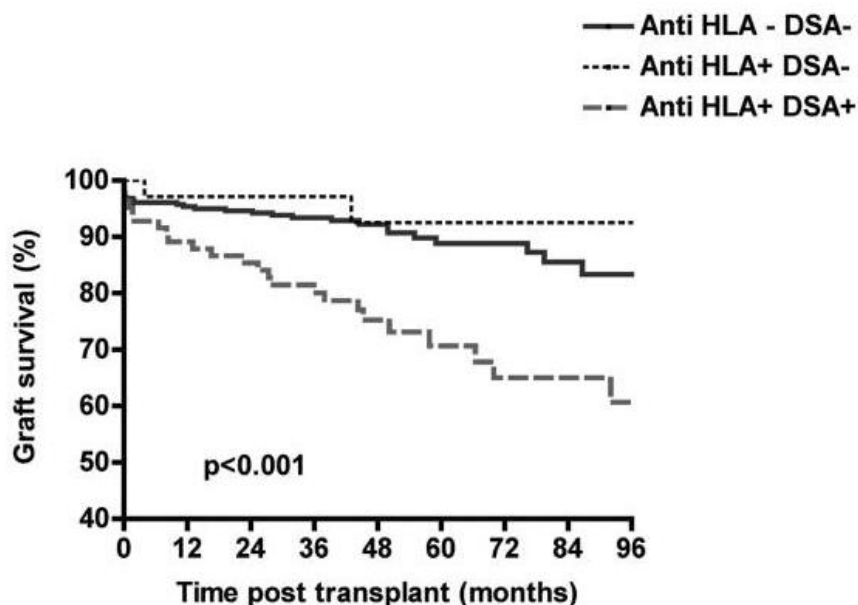


Figure 12 - Rôle des DSA dans la survie du greffon

D'après Lefaucheur et al. (88)

Par la suite une méta-analyse incluant sept études de cohortes rétrospectives et totalisant 1119 patients transplantés rénaux a révélé que la présence isolée de DSA préformés doublait le risque de rejet humoral et augmentait le risque de perte du greffon. Deux études plus récentes suggèrent que le risque de survenue de rejet humoral dans les 6 mois à 1 ans après la transplantation concerne surtout les patients présentant des DSA avec des MFI > 3000 (89,90). Une autre équipe a par ailleurs montré que la persistance des DSA en post transplantation constituait un risque plus important de

développer un rejet humoral (91). Ces données laissent penser que la sélection des donneurs devrait tenir compte de la présence de DSA préformés chez le receveur détecté en SAG, même en présence d'un résultat de XM CMF négatif.

3.6.2 Définition du rejet humoral

Le rejet de greffe à médiation humorale doit être considéré comme une maladie chronique d'évolution progressive, marquée par un processus lésionnel dynamique qui fluctue dans le temps. Ainsi on distingue trois entités : le rejet humoral infra clinique, le rejet humoral actif et le rejet humoral actif chronique.

Le diagnostic de rejet humoral se pose devant un cortège d'observations associant un déclin de la fonction du greffon avec plus ou moins l'apparition d'une protéinurie, accompagnées de critères histologiques et sérologiques.

La détection des DSA est un critère majeur pour poser le diagnostic. Les avancées dans les techniques de dosage permettent une détection sensible des anticorps qu'ils soient préformés ou synthétisés *de novo*.

Les signes histologiques sont regroupés dans la classification de Banff régulièrement mis à jour (85).

Le rejet humoral actif se caractérise par la présence de signes d'inflammation de la microcirculation (glomérulite et capillarite péri-tubulaire) ou des artères, voire des lésions de microangiopathie thrombotique. Les lésions inflammatoires peuvent se pérenniser si les DSA restent présents et ainsi aboutir à un remodelage du tissu, caractéristique des rejets chroniques.

Les lésions histologiques, liées à un rejet humoral actif chronique, associent des lésions d'athérosclérose avec fibrose interstitielle, ainsi qu'une glomérulopathie du greffon et une altération sévère des membranes basales capillaires péri-tubulaires (multi lamellation), irréversible. Dans les deux cas, un témoin de l'interaction entre les anticorps anti-HLA et l'endothélium vasculaire doit être objectivé : soit par le dépôt linéaire de C4d soit par l'inflammation tissulaire importante ou par des analyses transcriptomiques.

3.6.3 Traitement des rejets liés aux anticorps anti-HLA

Les traitements du rejet humoral actif doivent être mis en place le plus tôt possible afin de limiter la progression des lésions vers un état irréversible (lésions chroniques) sur lesquelles les traitements ont peu d'effet. Plusieurs stratégies sont à ce jour utilisées reposant le plus souvent sur une association de molécules, mais aucun traitement n'est actuellement standardisé.

Les premiers traitements possibles sont la réalisation d'échanges plasmatiques ou de plasmaphérèse visant à diminuer le taux de DSA dans le sérum. Ces méthodes permettent également de diminuer l'activation du complément mais reste cependant suspensives. C'est également le cas d'une nouvelle molécule, l'IdaS (imlifidase), qui est une enzyme dégradant les IgG et permet de réaliser des désensibilisations transitoires (92).

L'administration d'immunoglobulines intraveineuses est souvent associée aux traitements suspensifs dans le but de diminuer la re-synthèse des DSA. Le rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20, qui cible les lymphocytes B entraînant leur déplétion dans le sang périphérique et dans une moindre mesure dans les tissus, est aussi utilisé dans cette optique et semble améliorer la survie du greffon à court terme en association avec les Ig-IV et les plasmaphérèses (93).

Les plasmocytes à longue durée de vie sont également une cible thérapeutique intéressante. Aussi, le recours au bortezomib, molécule initialement utilisée dans le traitement du myélome est parfois de mise. Cette molécule est un inhibiteur du protéasome et a été décrite comme pouvant entraîner l'apoptose de plasmocytes producteurs d'anticorps anti-HLA (94).

D'autres traitements agissant sur l'activation du complément ont également été testés chez des patients transplantés. Parmi eux, l'eculizumab, anticorps monoclonal dirigé contre le facteur C5 de la cascade du complément, permettrait de maîtriser le rejet humoral aigu mais pas le rejet chronique. Le C1-inhibiteur a aussi été testé comme traitement d'appoint vs placebo dans une étude de phase 2 multicentrique, randomisée, en double aveugle, qui n'a pas montré de différence notable sur la survie du greffon entre les deux groupes mais une tendance à une amélioration durable de la fonction rénale dans le groupe traité par C1 inhibiteur (95). Des études complémentaires sont en cours.

D'autres molécules sont actuellement à l'essai tel que le tocilizumab (anticorps anti interleukine 6)(96) ou le belimumab (anticorps anti-BAFF). Le suivi des DSA permet d'apprécier l'efficacité théorique du traitement, une baisse rapide des MFI des DSA étant corrélée à une meilleure survie du greffon.

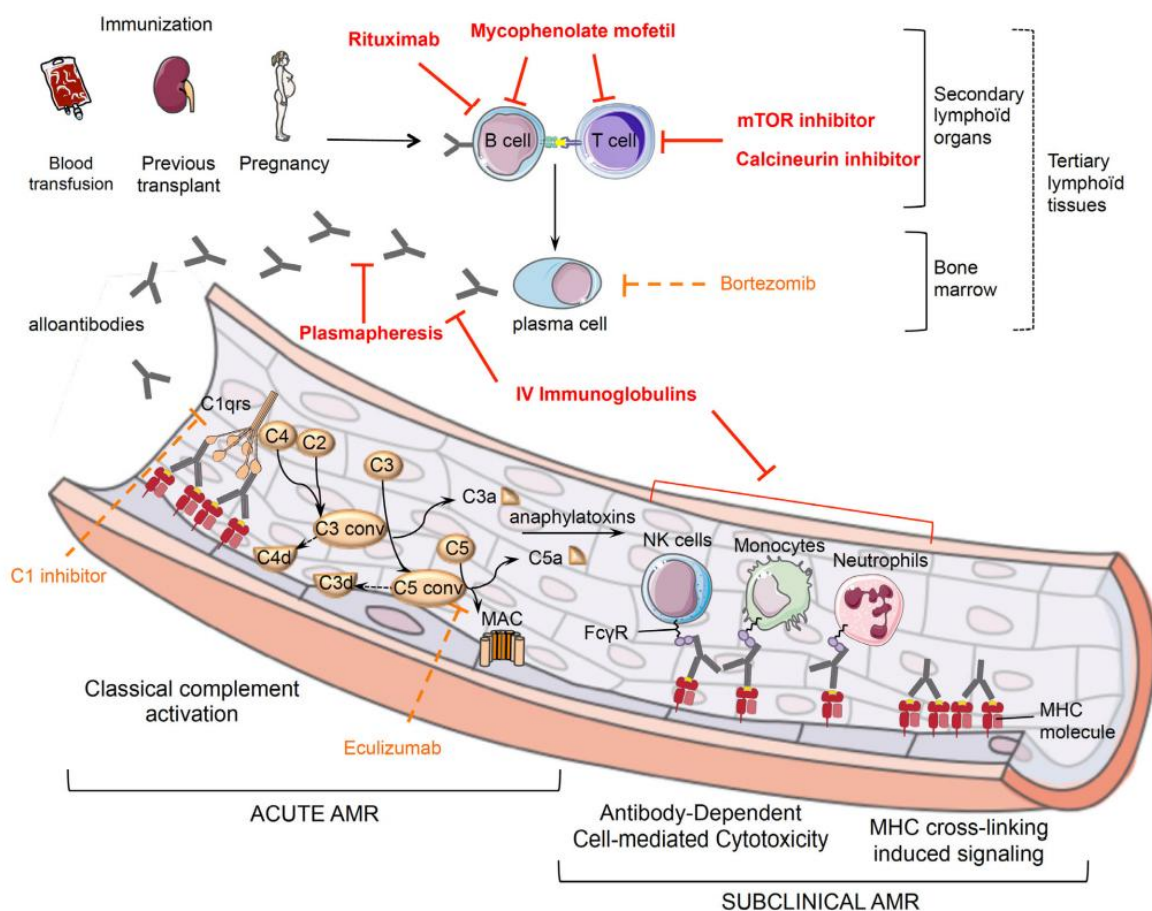


Figure 13 - Mécanisme du rejet humoral et cibles thérapeutiques

D'après Pouliquen et al. (97)

De nombreuses thérapies peuvent donc être utilisées pour le traitement des rejets humoraux, les plus courantes étant l'association de plasmaphérèse et de perfusion d'Ig-IV, mais une méta-analyse récente souligne le fait qu'aucune n'a fait preuve d'une efficacité suffisante, notamment par manque d'essais randomisés contrôlés (98). Les rejets chroniques humoraux restent une des causes principales de pertes tardives de greffon. Il est donc d'autant plus important d'éviter de greffer des organes chez des patients ayant des DSA préformés.

3.7 Evolution des anticorps anti-HLA après allo-immunisation

Après un événement allo-immunisant, les anticorps nouvellement formés peuvent disparaître rapidement ou persister pendant de nombreuses années. Les mécanismes à l'origine de cette variabilité inter et intra-individuelle sont mal connus mais certaines hypothèses ont été avancées pour les expliquer.

3.7.1 Rôle des lymphocytes B mémoires dans les variations du profil d'immunisation anti-HLA

Les lymphocytes B mémoires constituent 40 à 50% des lymphocytes B circulants. Le maintien de ces cellules mémoires dans la circulation ne nécessite pas d'exposition continue à l'antigène (99). Ainsi, tout patient ayant présenté des allo-anticorps anti-HLA est susceptible de présenter des lymphocytes B mémoires spécifiques d'allo-antigènes. Cette hypothèse a été confirmée par plusieurs équipes qui ont détecté des lymphocytes B allo-réactifs chez les patients allo-immunisés en attente de transplantation rénale en utilisant des techniques de stimulation polyclonale des lymphocytes B couplées à la technique ELISpot ou à une analyse des surnageants de culture. La fréquence des lymphocytes B mémoires spécifiques d'un allo-antigène semble corrélée à la force de l'allo-immunisation (appréciée par les valeurs de MFI des anticorps correspondant). Cependant des lymphocytes allo-réactifs peuvent être détectés sans la présence concomitante d'anticorps anti-HLA. En cas de transplantation antérieure, les lymphocytes B mémoires spécifiques du donneur pouvaient être retrouvés jusqu'à plus de 20 après la transplantation et étaient impliqués dans la survenue de rejet à médiation humorale après une nouvelle transplantation (100,101).

Un certain nombre de travaux suggèrent que la réactivation de ce pool de lymphocytes B mémoires allo-réactifs et leur différenciation en plasmocytes pourraient se produire à l'occasion de divers événements immunologiques, conduisant à des variations objectivables du profil d'anticorps anti-HLA des patients. Parmi eux, on retrouve les vaccinations (102–105), les infections mais aussi les états inflammatoires aspécifiques tels que traumatisme ou chirurgie (106,107).

3.7.1.1 Vaccination

La vaccination antigrippale a été la plus investiguée et des données contradictoires ont été retrouvées chez les patients transplantés : certains auteurs n'ont trouvé aucun changement significatif de l'immunisation anti-HLA après vaccination (108) alors que d'autres ont objectivé une évolution portant à la fois sur des spécificités nouvelles et préexistantes (103,109). L'équipe de Marino et al. s'est attachée à comparer de façon prospective la survenue d'anticorps anti-HLA après vaccination grippale sur un total de 129 individus répartis en différents groupes : donneurs sains, patients en attente de transplantation, patients transplantés et donneurs sains ayant refusé la vaccination. Les proportions d'anticorps anti-HLA *de novo* apparues 6 mois après en Single Antigen étaient respectivement de 2,4%, 17,5%, 20% et 0%. Fait intéressant, seule la présence d'anticorps anti-HLA préformés était un facteur prédictif de l'apparition d'anticorps anti-HLA *de novo*, suggérant bien l'implication d'événement allo-immunisants antérieurs dans l'apparition de ces nouvelles spécificités (105).

Une étude portant sur le vaccin de l'hépatite B retrouvait de façon surprenante une positivité des anticorps anti-HLA pour 8 donneurs sains sur 20, un mois après l'injection d'une dose de vaccin, alors que ces patients étaient antérieurement négatifs et qu'aucun lien avec une réponse B mémoire n'ait pu être établi (102).

Concernant la vaccination anti-pneumococcique, les données de la littérature ne semblent pas en faveur d'une augmentation de l'immunisation anti-HLA après vaccination chez les patients transplantés, que ce soit avec le vaccin conjugué à 13 valences ou le vaccin non conjugué à 23 valences. Une disparité selon le sexe semblait néanmoins se dégager. En effet, les femmes, chez qui des lymphocytes B mémoires allo-réactifs pouvaient être présents suite à d'éventuelles grossesses, produisaient plus fréquemment des anticorps anti-HLA *de novo* que les hommes (104).

Plus récemment une méta-analyse portant sur l'ensemble des patients transplantés et regroupant quatre-vingt-dix études soit 15 645 patients vaccinés et 42 924 patients témoins ont montré que l'incidence de survenue de DSA *de novo* n'était que de 1,85% à 3 mois post vaccination et que le risque de rejet n'était pas augmenté dans le groupe des patients vaccinés par rapport à ceux ne l'étant pas (110).

Il semble donc que les variations du profil d'immunisation anti-HLA induites par les vaccinations soient accessoires pour les patients transplantés, mais peu de données sont disponibles concernant les patients en attente de transplantation rénale.

3.7.1.2 Etat inflammatoire

Une étude rétrospective menée sur 65 patients allo-immunisés en attente de transplantation rénale a montré que 83% d'entre eux présentait une augmentation significative du taux d'anticorps anti-HLA au cours du mois suivant un événement inflammatoire, les événements recensés allant de l'infection myocardique aux procédures chirurgicales. Ce taux atteignait 97% en cas d'infection documentée. Sur le plan physiopathologique, l'expression de signaux de danger tels que les DAMPs en contexte inflammatoire voire même les PAMPs en cas d'infection pourrait être à l'origine de la réactivation polyclonale des lymphocytes B mémoires via leur reconnaissance par les TLRs. Les cytokines pro-inflammatoires pourraient également intervenir dans ce mécanisme (107).

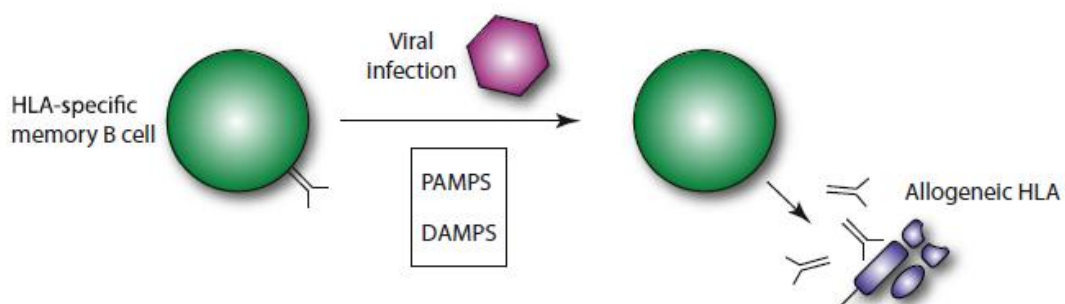


Figure 14 - Modèle d'activation aspécifique

D'après Lloyd D'Orsogna et al. (111)

3.7.2 Plasmocytes de longue durée de vie

Outres les lymphocytes B mémoires, les plasmocytes de longue de durée de vie, nichés dans la moelle osseuse, représentent la source majeure des anticorps. Ainsi tous les facteurs qui agissent de façon positive ou négative sur ces cellules sont susceptibles de moduler le taux d'anticorps sériques. La chimiokine CXCL12 produite localement par les cellules stromales, l'IL6 et APRIL sécrétées notamment par les mégacaryocytes ou d'autres molécules telles que le TNF α et BAFF favorisent la survie des plasmocytes. A l'inverse, la transduction du signal après fixation d'IgG sur les récepteurs inhibiteurs Fc γ RIIB induit leur apoptose et participe à leur homéostasie. Par ailleurs, plusieurs agents peuvent directement influencer sur la production d'anticorps. En cas de réception de signaux de danger, reconnus par les *Toll like receptor* (TLR) celle-ci est augmentée, alors qu'elle est bloquée par la chimiokine CCL2 sécrétée par les cellules stromales (25).

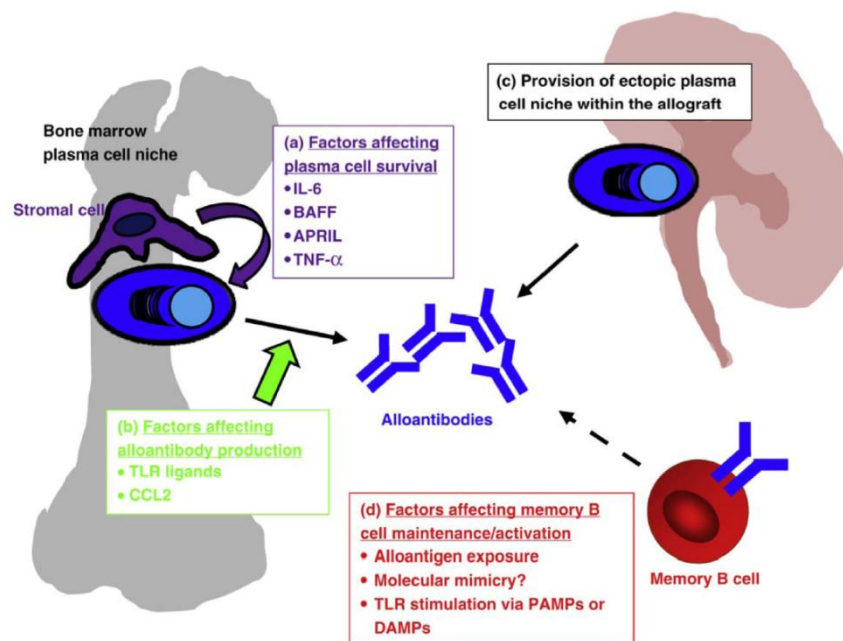


Figure 15 - Maintien de la production d'anticorps anti-HLA

D'après Clatworthy *et al.*(25)

3.7.3 Spécificité de la grossesse

Un des facteurs pouvant influencer le maintien de la production d'anticorps après une grossesse est la persistance de cellules fœtales chez la mère. Ce phénomène, appelé microchimérisme, correspond à la présence permanente d'antigènes paternels. Des cellules progénitrices fœtales peuvent en effet être retrouvées dans le sang périphérique maternel plus de 20 ans après l'accouchement. Un tel microchimérisme a été décrit chez 66% des patientes immunisées versus 25% des patientes non immunisées (112).

4. Accès à la transplantation rénale

La transplantation représente le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale, compte tenu du bénéfice supérieur qu'elle apporte en matière de qualité de vie et d'espérance de vie comparée à

la dialyse. En France c'est l'agence de Biomédecine, sous la tutelle du ministère chargé de la santé, qui coordonne les prélèvements d'organes, la répartition et l'attribution des greffons sur le territoire. Afin de fournir un système d'allocation des greffons qui soit le plus juste possible entre les différents types de patients en attente de transplantation rénale, les règles de répartition des greffons ainsi que les recommandations sur le suivi pré-greffe sont régulièrement mises à jour et ajustées.

Les patients peuvent être inscrits après ou avant la mise en dialyse, on parle dans ce dernier cas d'inscription préemptive. Pour être inscrit sur liste d'attente, chaque patient doit bénéficier d'un typage HLA-A, -B, -DR et -DQ (rendu en sous-types) ainsi qu'une recherche d'anticorps anti-HLA de classe I et de classe II sur au moins deux sérums à trois mois d'intervalle par une technique sensible afin d'établir son profil d'immunisation.

Le suivi sérologique s'effectue par la suite tous les 6 mois maximum si le patient n'est pas connu immunisé ou faiblement immunisé par le biais de technique de dépistage +/- SAG afin d'établir une identification précise des nouvelles spécificités qui apparaissent. Le passage du statut de non immunisé au statut d'immunisé doit être confirmé sur un deuxième prélèvement si possible à 3 mois du précédent. C'est au laboratoire d'histocompatibilité qu'il incombe de saisir et de mettre à jour les spécificités des anticorps anti-HLA-A, -B, -DR et -DQ identifiées selon le seuil de détection retenu localement sur la base CRISTAL (Recommandations : le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes ou greffés. Agence de la Biomédecine).

Par ailleurs, tout événement allo-immunisant tel que grossesse transfusion ou greffe d'organe doit être répertorié et nécessite un suivi rapproché en suivant (comprenant minimum deux sérums à prélever entre J15 et J21 et à J30).

La difficulté d'accès à la greffe est établie sur l'estimation du FAG ou indicateur de facilité d'accès à la greffe, calculé à partir du nombre de donneurs potentiels sur les 5 dernières années en isogroupe ABO, avec lesquels le receveur n'a pas présenté plus de 3 incompatibilités HLA, en tenant compte par ailleurs des spécificités HLA-A, -B, -DR et -DQ interdites. Cet indicateur est utilisé pour le calcul du score national d'attribution des greffons rénaux, appelé le score Rein. Ce score est calculé à chaque fois qu'un greffon est disponible et sa valeur varie pour un même receveur selon le donneur potentiel. Le calcul est réalisé en appliquant une pondération à différents critères d'attribution : la durée de dialyse, la durée de séjour en liste d'attente, l'appariement HLA pour les spécificités HLA-A, -B, -DR et -DQ et le FAG. Pour ces deux derniers critères, les sujets jeunes obtiennent le maximum de points, puis cela devient dégressif à partir de 45 ans, et plus pris en compte au-delà de 75 ans, l'objectif étant une épargne immunologique des patients jeunes afin qu'ils puissent à nouveau avoir accès facilement à la greffe en cas d'échec d'une première transplantation. Par ailleurs, la compatibilité HLA-DR rapporte le plus de points (et par la même occasion se solde souvent par une compatibilité HLA-DQ). Le score tient aussi compte de l'appariement en âge entre receveur et donneur.

Un autre indicateur existe : le TGI pour taux de greffon incompatible. Il estime le pourcentage de donneurs HLA incompatibles, calculé après prise en compte des spécificités interdites HLA-A, -B, -DR et -DQ β , prélevés d'au moins un rein greffé au cours des 5 dernières années en France, en isogroupe ABO. À la différence du FAG, le TGI ne tient pas compte de la qualité de l'appariement HLA. Le TGI est recalculé chaque nuit pour prendre en compte de nouvelles spécificités interdites ou plus rarement des spécificités retirées de la liste. Cet indicateur permet de définir le statut hyperimmunisé d'un individu. En effet, un patient en attente de transplantation est dit "hyperimmunisé" dès lors que son TGI dépasse 85% et reste supérieur à 70 % au moment de la proposition de greffon.

4.1 Règles d'attribution des greffons rénaux en France

Les greffons rénaux sont attribués en isogroupe ABO (exception pouvant être faite pour les patients hyperimmunisés ou en cas de mesure dérogatoire).

Un des 2 reins est attribué à l'équipe locale selon le score Rein sans prise en compte des distances, sauf si l'appariement en âge est trop mauvais.

Le second rein est attribué selon le score Rein sur l'ensemble du territoire national, équipe locale exclue, après vérification de l'absence de priorité nationale ou régionale.

Les personnes pouvant bénéficier d'une priorité nationale sont les suivantes :

1. les patients hyperimmunisés avec un TGI historique $\geq 85\%$ si au moment de la proposition de greffe :
 - il n'existe aucune incompatibilité HLA entre donneur et receveur (0 mismatch)
 - il n'existe qu'une seule incompatibilité HLA entre donneur et receveur (1 mismatch)
 - le patient est éligible pour le programme "antigènes permis" et les conditions d'appariement à l'âge et aux antigènes HLA sont respectées.
2. Les patients immunisés présentant au moins une spécificité anti-HLA saisie dans CRISTAL (TGI>1%) si au moment de la proposition de greffe :
 - il n'existe aucune incompatibilité HLA entre donneur et receveur (0 mismatch).

Dans certaines situations où les patients ont peu de chance d'être greffé bien qu'ils ne soient pas hyperimmunisés (groupe sanguin et/ou HLA rare) un avis d'expert peut être demandé afin qu'ils puissent bénéficier d'une priorité exceptionnelle. Celle-ci peut être accordée à plusieurs niveaux : soit régionale (n'accordant alors pas plus d'une incompatibilité HLA-DR et pas plus de 2 incompatibilités HLA-B et -DR avec le donneur), soit nationale (répondant aux mêmes critères que les patients hyperimmunisés).

4.3 Spécificité des patients hyperimmunisés

Les patients hyperimmunisés ont en pratique une chance restreinte d'accéder à la transplantation et sont plus exposés au risque de rejet. L'immunisation anti-HLA constituerait par ailleurs un facteur de risque indépendant de mortalité chez les patients en insuffisance rénale terminale en attente de transplantation. Cette population est enrichie en femmes, en patients jeunes ainsi qu'en patients avec antécédent de transplantation. Afin d'améliorer les conditions d'accès à la greffe de ces patients tout en maintenant un risque immunologique acceptable, un programme inspiré du programme « acceptable mismatch » (AM) d'Eurotransplant a été mis en place en France depuis 2005. Il s'agit du programme hyperimmunisé à antigènes permis.

4.3.1 Programme HAP

Ce programme tolère un niveau d'exigence moindre en terme de compatibilité HLA sous condition que chaque incompatibilité HLA-A, -B, -DR, -DQ avec le donneur corresponde à un antigène « permis » défini par une MFI<500 avec la technique Single Antigen (technique One Lambda). L'attribution est effectuée en ABO compatible pour les receveurs B et avec une dérogation restreinte

en A pour les receveurs AB. La dérogation ABO compatible devient sans restriction de groupe pour tous les receveurs de TGI au moins égal à 95 %.

Pour pouvoir bénéficier de ce programme les patients doivent remplir certaines conditions. Ils doivent tout d'abord être hyperimmunisés et inscrits sur la liste d'attente depuis plus de 18 mois. Cette restriction a été mise en place afin de ne pas entraîner de déséquilibre trop important pour ce qui est du temps d'attente entre les patients avec et sans priorité nationale liée au programme HAP. Leur dossier CRISTAL doit par ailleurs être à jour et comprendre :

- la liste des antigènes permis
- la liste des antigènes interdits (correspondant aux antigènes HLA pour lesquels le patient présente des anticorps)
- la date du dernier sérum testé, qui doit être de moins de 105 jours (un peu plus de 3 mois).

Si ce suivi sérologique trimestriel n'est pas respecté, le patient perd alors la priorité nationale jusqu'à la prochaine mise à jour.

Enfin, en cas de proposition de greffon le patient est éligible si :

- chaque incompatibilité HLA-A,-B,-DR,-DQ β correspond à une spécificité antigénique permise
- il n'existe pas plus de 4 incompatibilités HLA-A,-B,-DR,-DQ β
- il n'existe pas plus de 2 incompatibilités HLA-B et -DR, pas plus d'une incompatibilité -DR et pas plus d'une incompatibilité DQ β
- le différentiel d'âge est < à 15 ans entre donneur et receveur pour les receveurs > 50ans
- le XM en LCT est négatif.

(Règles de répartition et d'attribution des greffons prélevés sur personne décédée, Mise à jour : octobre 2014, Agence de la Biomédecine)

4.3.2 Programmes étrangers

Le programme AM de la fondation Eurotransplant qui regroupe 8 pays, mis en place en 1989 est très similaire au programme HAP qui s'en est inspiré. Seuls les patients ayant un PRA \geq 85% et inscrits depuis plus de deux ans sont éligibles. Cependant, ce premier critère va bientôt changer pour prendre en compte un nouvel indicateur correspondant au pourcentage de donneur compatible après prise en compte des spécificités interdites et du groupe sanguin qui devra être <2%. Les patients possédant principalement des anticorps anti-HLA détectés en phase solide mais n'activant pas le complément, ne sont pas éligibles.

Dans les critères d'appariement, on retrouve la nécessité de partager avec le donneur éventuel au minimum un antigène HLA-B et -DR ou 2 antigènes HLA-DR. Toutes les spécificités incompatibles entre donneur et receveur doivent faire partie des antigènes permis. Les critères minimaux d'appariement peuvent ne pas être respectés si les chances de trouver un donneur sont faibles (fréquence du donneur <0,1%). Le suivi sérologique se fait également par technique sensible tous les 3 mois comme le recommande les standards EFI en vigueur (version 7.0) avec une limite acceptable jusqu'à 5 mois. Aucune distinction n'est faite entre les différents types de patients en matière de suivi (Eurotransplant Manual© –version 4.2, 2017).

Aux Etats Unis le système d'allocation des greffons a changé en 2014. L'ancien système était principalement basé sur une politique du « premier arrivé, premier servi », largement dicté par le temps d'attente. L'une de ses faiblesses était l'absence de priorité accordée aux patients hautement

immunisés. Leur approche est très différente des systèmes européens. En effet, pour chaque couple donneur/receveur existe des indicateurs. Le KDPI (*Kidney Profile Metric Index*) combine 10 composantes du donneur (comme l'âge, la cause du décès, etc) en une seule valeur, prédictive du risque potentiel d'échec de la greffe selon la qualité initiale du greffon. Le receveur est quant à lui associé à un score EPTS (*Expected Post Transplant Survival*) basé sur quatre facteurs : l'âge, la durée de dialyse, l'existence d'un diabète ou des antécédents de transplantation, qui visent à prédire la survie du greffon. Pour les organes provenant d'un donneur ayant un KDPI<20% l'allocation se fait en priorisant les receveurs ayant les meilleurs score EPTS afin d'optimiser la longévité de la greffe. Pour un même receveur, plusieurs seuils maximums du KDPI sont définis selon l'appariement HLA des donneurs potentiels (absence ou présence de mismatches HLA). Ainsi un receveur peut recevoir un organe d'un donneur ayant un KDPI à 100% s'il n'existe aucun mismatch entre donneur et receveur. L'allocation est par ailleurs basée sur un système de points, alloués selon la durée d'attente sur la liste avec un DFG<20 ml/min (débit de filtration glomérulaire) et la durée en dialyse. Les patients immunisés se voient accorder des points supplémentaires selon le degré d'immunisation évalué par le cPRA et une priorité régionale ou nationale est accordée aux patients hyperimmunisés avec un PRA>98%. La société américaine d'histocompatibilité laisse la liberté à chaque centre de définir ses propres conditions de suivi (113,114)(The New Kidney Allocation System (KAS), OPTN).

4.3.3 Apport des programmes sur l'accès à la greffe des patients hyperimmunisés

Quatre ans après la révision du système d'allocation des greffons rénaux aux Etats-Unis, une tendance se dessinait vers une amélioration de l'accès à la greffe des patients immunisés et une meilleure équité dans la répartition des greffons. Le programme AM d'Eurotransplant a permis quant à lui une réduction du temps d'attente et de bons résultats post-greffe pour les patients hyperimmunisés. Une étude a notamment montré que les patients hyperimmunisés transplantés via ce programme bénéficiaient d'une meilleure survie du greffon à 10 ans par rapport aux patients hyperimmunisés transplantés via le système traditionnel. En France, les résultats de la greffe ne semblaient pas différer entre les patients hyperimmunisés transplantés via ou hors programme HAP (taux d'échec à 1 an de 8.9% vs 9.2%) sur la période 2005-2016, mais une réduction de la durée d'attente médiane a pu être observée. Par ailleurs, le nombre de candidats éligibles au programme HAP a été multiplié par 6 en moins de 10 ans, ceci pouvant être expliqué par une hétérogénéité des pratiques sur le plan clinique (politiques d'inscription différentes) et biologique (techniques et seuil de déclaration des antigènes interdits variables). Cette augmentation dilue le bénéfice de la priorisation de l'accès à la greffe et dessert les patients avec des phénotypes rares. Pour pallier à cela, le seuil de MFI à partir duquel une spécificité est à interdire a été fixé à 2000 ou à 5 AD-BCR sur recommandations des experts en 2017.

4.3.4 Alternative au programme HAP

Un autre moyen d'améliorer l'accessibilité à la greffe des patients hyperimmunisés peut être le recours à une désensibilisation permettant de diminuer le TGI et d'obtenir un XM négatif le jour de greffe malgré la présence historique de DSA. Plusieurs études ont en effet montré que cette pratique améliorait l'accès à la greffe avec de bon résultat en termes de survie globale lors des transplantations avec un donneur vivant (115,116). Les traitements inclus dans les protocoles sont le plus souvent les IgIV, la plasmaphérèse et le rituximab. Cependant, selon l'intensité de l'immunisation princeps, le risque de rejet n'est pas anodin et la iatrogénie des traitements utilisés exposant à un risque infectieux plus élevé invite à réserver cette thérapeutique pour des centres expérimentés et à des patients dont le bénéfice a clairement été établi.

PROBLEMATIQUE et OBJECTIFS GENERAUX

La transplantation rénale est la solution qui apporte la meilleure qualité de vie et la meilleure espérance de vie pour les personnes atteintes d'insuffisance rénale au stade terminal. En 2018, 14291 patients sont en attente de transplantation rénale en France pour 3 546 greffes réalisées. La présence d'anticorps anti-HLA chez les patients sur liste d'attente représente un obstacle à l'accès à la greffe, le taux de greffon incompatible (TGI) augmentant avec le nombre de spécificités contre lesquels un anticorps est présent. Les patients hyperimmunisés (avec un TGIH>85%) sont les plus touchés et sont exposés à un risque de rejet humoral plus important. Le rejet humoral est considéré aujourd'hui comme l'une des causes majeures des pertes de greffon tardives et les thérapeutiques actuelles ne permettent pas de stopper la progression des lésions. Dans ce contexte, il apparaît donc primordial d'éviter de transplanter un organe pour lequel le receveur présenterait des anticorps contre les molécules HLA du donneur (DSA), même avec une faible MFI.

Les patients hyperimmunisés bénéficient d'un suivi sérologique rapproché (tous les 3 mois) comparé aux patients immunisés ou non immunisés (au moins tous les 6 mois à Bordeaux) afin de détecter toute variation du profil d'immunisation pouvant conduire à une restriction des antigènes acceptables ou « permis » en cas de proposition de greffe. Ce suivi tous les 105 jours est obligatoire sous peine de perdre la priorité nationale accordée de principe à ces patients. La variabilité des profils d'immunisation est un phénomène peu étudié, de surcroît chez les patients hyperimmunisés. L'impression générale du laboratoire d'histocompatibilité de Bordeaux et des autres centres est que ces profils semblent pour la majorité stable dans le temps. Or, les techniques Single Antigen utilisées pour l'identification des anticorps anti-HLA sont très coûteuses et le matériel investi dans le suivi pré-greffe est alors moins mobilisable pour un monitoring systématique en post-greffe qui n'est que d'une fois par an en dehors de toute suspicion de rejet humoral aigu ou chronique, d'une diminution de l'immunosuppression ou d'événements immunisants.

Le but de notre étude était dans un premier temps de dresser un état des lieux des caractéristiques de la population des patients hyperimmunisés en attente de greffe rénale entre 2013 et 2017 en Aquitaine. Dans un deuxième temps, nous avons évalué la pertinence du suivi trimestriel des patients hyperimmunisés en attente de transplantation rénale en réalisant une étude comparative des profils d'immunisation à 3 mois d'intervalle et en évaluant l'impact des modifications de profil observées. Afin d'apprécier les causes éventuelles de ces modifications, une confrontation clinico-biologique a ensuite été réalisée pour tous les patients dont nous disposons de données cliniques à l'heure de la rédaction de ce manuscrit.

MATERIELS ET METHODES

1. Population étudiée

A partir des données issues de la base CRISTAL, nous avons inclus tous les patients hyperimmunisés (défini par un TGIH \geq 85% et un TGI jour \geq 70%) greffés de juillet 2013 à décembre 2017 et ayant un suivi pré-greffe comportant au minimum 2 sérums testés à 3 mois d'intervalle, le sérum le plus récent devant être dosé dans un délai de 3 mois maximum avant la greffe. La date d'inclusion ou J0 correspond pour ces patients à la date de greffe. Par ailleurs, tous les patients hyperimmunisés sur liste d'attente au 31/12/2017 et ayant un suivi trimestriel de leurs anticorps anti-HLA dans les 6 mois précédant cette date (c'est-à-dire un sérum testé dans les 3 mois ou moins, et un second 3 mois avant) ont également été inclus, la date d'inclusion correspondant au 31/12/2017. Les patients étaient exclus dans le cas où l'un des deux sérums à J0-3 mois ou J0-6 mois n'était pas dosé, ou dans le cas où l'hyper immunisation était en train de se constituer (TGIH $<$ 85% à J0-6 mois).

L'inclusion des patients greffés s'est limitée à juillet 2013 du fait d'un changement des pratiques dans la méthode de dosage fin 2012. En effet, c'est à partir de cette année qu'a été introduit le traitement systématique des échantillons à l'EDTA afin de s'affranchir de l'interférence liée à l'activation du complément qui entraînait une sous-estimation voire de faux négatifs pour les anticorps anti-HLA avec des MFI hautes.

Le nombre de sérums inclus par patient pour l'analyse sérologique pouvait aller jusqu'à 4, si en remontant le temps à partir de la date d'inclusion, un dosage était réalisé à J0-9mois et J0-12mois, soit une comparaison de 3 paires de sérums maximum par patient.

2. Dosage des anticorps anti-HLA

Le dosage des anticorps anti-HLA a été réalisé par technique Luminex[®] Single Antigen en utilisant les réactifs du fournisseur One Lambda (réactifs LS1A04 et LS2A01 pour la classe I et II respectivement). De manière succincte, 18 μ L des différents sérums étaient distribués dans une plaque à filtre de 96 puits avec 2 μ L de solution EDTA pendant 10 minutes, puis 2,5 μ L de solution contenant les billes a été ajoutée à chaque puits et incubée pendant 30 minutes à l'obscurité sous agitation douce. Après plusieurs lavages, les billes étaient remises en suspension dans 100 μ L d'anti-IgG PE (Phycoérythrine) puis incubées pendant 30 minutes à l'obscurité sous agitation douce. Après un nouveau cycle de lavages, elles étaient reprises dans 80 μ L de PBS et passées au cytomètre Luminex[®]. Les données obtenues étaient analysées via le logiciel Fusion[®] et les résultats étaient exprimés en *Mean fluorescence Intensity* (MFI). Chaque série était validée par la conformité de contrôle positif et négatif.

Pour un petit nombre de patients, un test de dépistage a été réalisé en parallèle. La technique s'est déroulée de la même manière que pour le Single Antigen, le réactif utilisé étant cette fois le LSM12.

3. Données cliniques

Les évènements immunologiques tel que grossesses, transfusions, diminution d'immunosuppression, transplantectomie, vaccins et « état inflammatoire » clinique et/ou biologique ont été recensés de manière rétrospective à l'aide des dossiers informatiques. Ces données ont été anonymisées dans la base de données.

4. Analyses statistiques

Les variables qualitatives ont été décrites en pourcentage, les variables quantitatives en médiane et 10^e-90^e percentiles. La comparaison entre les variables qualitatives a été réalisée avec le test exact de Fisher. La comparaison entre les variables quantitatives étudiées a été réalisée à l'aide de tests non paramétriques. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé en cas de comparaison de plus de 2 paramètres, le test de Mann-Whitney était utilisé dans les autres cas. Les graphiques ont été élaborés à l'aide du Logiciel Prism 8[®] et MedCalc[®]. L'absence de précision sur les graphiques signifie qu'il n'y a pas de significativité statistique, dans le cas contraire : *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0,0001.

PARTIE I

**Etat des lieux de la population de patients hyperimmunisés
en attente de greffe rénale entre 2013 et 2017
en région Aquitaine**

RESULTATS

1. Diagramme des flux

Au total 220 patients hyperimmunisés ont été recensés à partir de la base CRISTAL. Parmi eux, 166 répondaient aux critères d'inclusion. La principale cause d'exclusion était l'absence de sérum à J0-3 mois ou J0-6 mois pour 50 d'entre eux. Par ailleurs, deux patients n'étaient pas hyperimmunisés sur le sérum à J0-6 mois et deux autres présentaient des profils ininterprétables, l'un après avoir bénéficié d'un protocole de désensibilisation, l'autre en raison d'un important bruit de fond. Ces 4 patients ont donc été également exclus de l'analyse sérologique et clinique. A ce jour, le relevé des données cliniques a pu être réalisé pour 75 des 166 patients inclus.

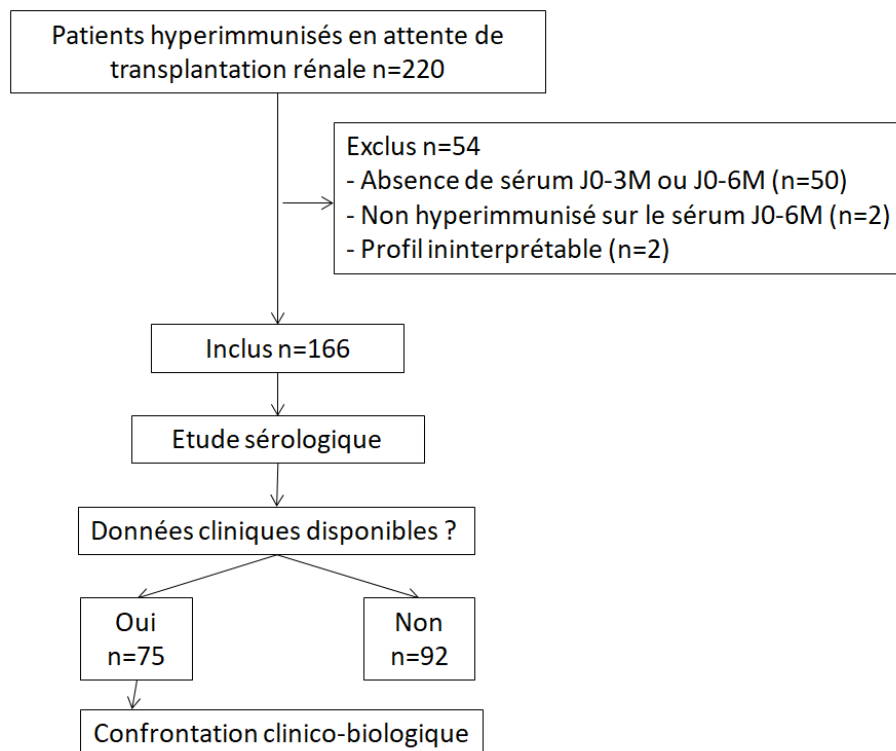


Figure 16 - Diagramme de la population de patients étudiée

2. Caractéristiques générales de la population des patients hyperimmunisés d'Aquitaine

En 2017, les patients hyperimmunisés représentaient 23,3% des patients en attente de transplantation rénale en Aquitaine. Ce chiffre était globalement constant depuis 2013 (Figure xxx) et se rapproche du taux national pour la même année (24,5%). Par ailleurs, sur les 220 patients constituant la population hyperimmunisée, 51% étaient des femmes et 69% étaient des patients inscrits pour une re-transplantation. La population hyperimmunisée régionale se démarque donc par une proportion de femmes moins importante qu'au niveau national (51 vs 59% en 2016) au profit d'une proportion plus marquée de patients en attente d'une re-transplantation (69 vs 53%). La médiane des âges était de 55 ans (37 – 71), les patients hyperimmunisés de cette cohorte sont donc plus âgés que leurs homologues nationaux (52% > 55 ans vs 37,9% à l'échelle nationale).

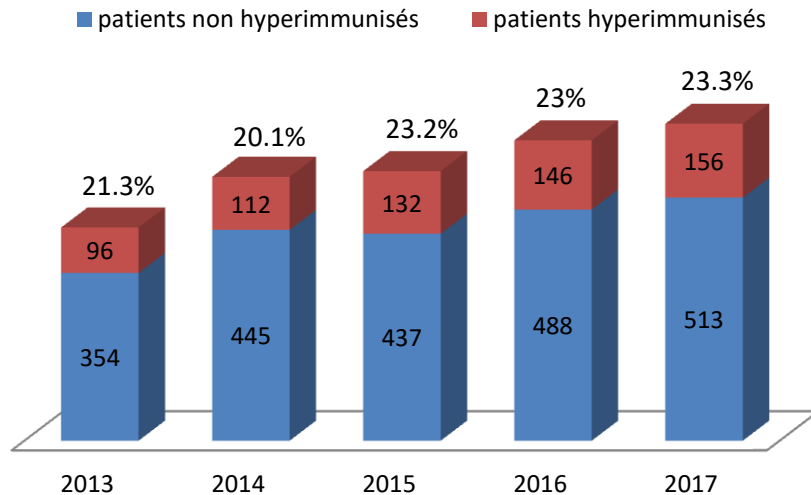


Figure 17 - Evolution de la proportion de patients hyperimmunisés entre 2013 et 2017 au sein de la population en attente de transplantation rénale.

Le TGI jour médian était de 97% (85%- 100%). Parmi tous les patients, 41% ont pu bénéficier d'une transplantation rénale. Comme attendu, le TGI était significativement plus élevé chez les patients greffés [94% (83% - 99%)] que chez les patients toujours sur liste d'attente [99% (90% - 100%)]. La durée d'attente était également raccourcie chez ces patients avec une durée médiane de 2,1 ans (0,5 - 5,85) contre 2,95 ans (0,55 - 7,75) pour les patients toujours en attente. A noter que la mise en place du délai de carence de 18 mois au cours de l'année 2016 visant à contrôler la priorisation des patients HAP a fait régresser d'environ 5 mois l'accès à la greffe de ces patients, les différences observées entre les patients greffés avant et après 2016 n'étaient cependant pas significatives ($p=0,37$).

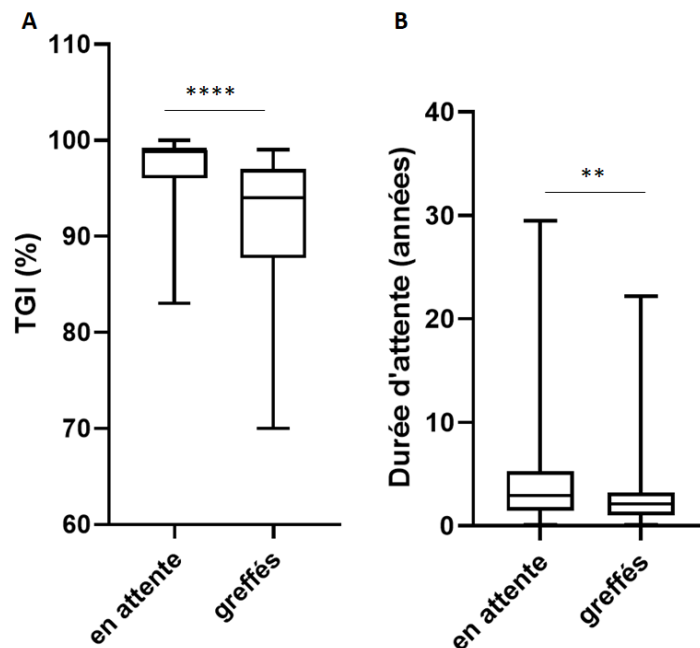


Figure 18 - Comparaison des patients hyperimmunisés en attente de greffe ou greffés.

Le graphique représente la médiane, les 1^{er} et 3^e quartiles et les valeurs minimales et maximales (barres d'erreur) du TGI (A) et de la durée d'attente (B). ** $p<0.01$, **** $p<0,0001$.

PARTIE II

Evaluation de la pertinence du suivi sérologique trimestriel des patients hyperimmunisés en attente de greffe rénale

ARTICLE

Evolution of anti-HLA sensitization of highly sensitized patients awaiting kidney transplantation: is a quarterly follow-up essential?

Wojciechowski E^{1,2,3}; Jambon F^{2,3,4}; Le Gars M^{1,2,3}; Guidicelli G¹; Merville P^{2,3,4}; Taupin JL^{1,2,3}; Couzi L^{2,3,4}; Visentin J^{1,2,3}

¹CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France; ²Université de Bordeaux, Bordeaux, France; ³Immuno ConcEpT, UMR CNRS 5164, Bordeaux, France; ⁴CHU de Bordeaux, Service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse et Aphérèses, Bordeaux, France

Background. Anti-HLA highly sensitized (HS) patients awaiting kidney transplantation benefit from national priority through the “HAP” program (HS with acceptable antigens). Maintaining this priority requires these patients have a serum tested with Single Antigen Flow Beads (SAFB) assays every 105 days in order to detect potential anti-HLA antibodies emergence and then prevent unexpected positive crossmatches. However, it seems that there is an imbalance between this high surveillance rate and the apparent stability of patient sensitization profiles. We aimed to assess the relevance of the quarterly biological follow-up of HS patients.

Methods. We included 166 HS patients displaying at least 2 sera tested at 3-month intervals during their waiting period (S, the most recent, and S-3M). A median of 3 sera per patient were tested with SAFB. We also retrieved the occurrence of allogeneic and non-allogeneic immunological events for 75 patients, in order to assess whether they were related to variations in anti-HLA antibodies profiles.

Results. From the 357 serum pairs studied, only 0.7% of class I beads and 0.5% of class II beads crossed the unacceptable antigen threshold at the S serum [mean fluorescence intensity (MFI)≥2000] with a median MFI of 2963 and 2607, respectively. These beads corresponded to 248 antigens. Among them, 90% were above the threshold of the acceptable antigens (500 <MFI< 2000) at S-3M, meaning that only few antigens crossing the 2000 MFI threshold could have been proposed under a national priority within the 3 months. The mean increase of calculated panel reactive antibodies was 2%. Variations in HS patient profiles were not related to patient history of allogeneic events but depended on the occurrence of non-allogeneic events such as vaccines, inflammatory states and even more of allogeneic events such as immunosuppression withdrawal/transplantectomy, transfusion or pregnancy.

Conclusion. Changes in HS patient anti-HLA profiles are marginal within 3-months periods and had a limited immunological impact. Most of them are related to the occurrence of immunological events. Therefore, the monitoring of these HS patients could be optimized towards a dynamic monitoring rather than a systematic quarterly monitoring.

Keywords: Highly sensitized patients, HLA antibodies, single antigen flow beads, pre-transplant follow-up Immunological events.

Introduction

Kidney transplantation provides the best available treatment for end-stage kidney disease (ESKD) as it increases patients' survival and quality of life. However, anti-HLA sensitization represents a significant barrier to kidney transplantation by limiting the access to compatible donors (1, 2). Highly sensitized patients (HS) were described as the most exposed to the risk of graft rejection (3). These two last decades, this higher risk was linked to their likelihood of displaying preformed donor specific anti-HLA antibodies (DSA) (4–6). Nowadays, anti-HLA antibodies can be easily detected by using Single Antigen Flow Beads (SAFB) assays and they are, even at low MFI, widely recognized as responsible for antibody-mediated rejection and for higher risk of graft loss (7).

Since several years, specific allocation programs have been set up in order to improve access to transplant for HS patients without increasing the risk for graft rejection (8). In France, to this end, the scope of potential donors is no longer limited to the regional level but extends to the national level. The principle of is to accept a lower HLA matching between the donor and the HS recipient through favoring pairs without preformed DSA. They are therefore based on the definition of acceptable antigens. In France, acceptable antigens are antigens against which a patient does not have anti-HLA antibodies, either in the last serum tested or in a previous serum. Acceptable antigens are defined by a Mean Fluorescence Intensity (MFI) < 500 with One Lambda's SAFB assays, and an AD-BCR < 2 with Immucor's assays, AD-BCR being the MFI adjusted to the quantity of coated antigen per bead. Indeed, knowing the preexisting anti-HLA sensitization of the recipient as well as the donor HLA-typing allows the results of the crossmatch (XM) assays to be predicted, what is called a virtual XM (9). When a suitable organ is proposed, i.e. that every mismatched antigen is an acceptable antigen, a national priority is given to HS patients, without taking into account the distance between donor and recipient centers. In some cases, this virtual XM allows sending the transplant to the recipient's center without waiting for the result of the real XM and saves time in terms of cold ischemia. It is thus essential that virtual XM truly predicts the real XM. Consequently, this priority is delivered only if HS patients had an anti-HLA antibodies measurement for the last 105 days in order to detect potential de novo anti-HLA antibodies and then limit the risk for unexpected positive XM. The frequency of this monitoring follows current guidelines from the European Federation of Immunogenetics standards. However, to our knowledge, this quarterly follow up is not based on any published data, and there seems to be an imbalance between this surveillance rate and the apparent stability of HS patient sensitization profiles.

While humoral response to an allogeneic event (such as pregnancy, transfusion or previous transplantation) is well described, few studies focused on the mechanisms underlying the variability

of anti-HLA antibody sensitization, including the appearance or disappearance of antigenic specificities (10, 11). A very recent study suggested that the kinetics of anti-HLA antibodies on renal transplant candidates is not related to time scale but depend on allogeneic sensitization history (12). Patients with previous transplantation appeared to have the most variable sensitization profile over time, compared to those with previous pregnancy or transfusion. However, no information was provided on their calculated Panel Reactive Antibodies (cPRA) and besides their allogeneic sensitization history it seemed that individual factors could play a role, some patients from each group showing more variations than others. One could expect that other events such as inflammatory events caused for instance by vaccine, infection, or major surgery could impact anti-HLA sensitization profile variability.

In line with this, Mariano et al. showed that influenza vaccination in patients awaiting transplantation lead to the formation of de novo anti-HLA antibodies, 17.5% of them within 6 months (13). Interestingly, only prior anti-HLA sensitization was a predictive factor for these de novo anti-HLA antibodies. Another study by Locke et al. highlighted that 83% of sensitized transplant candidates with a documented pro-inflammatory event had an associated increase in the breadth or strength of anti-HLA antibody profile (14). These results suggest that anti-HLA sensitized patients may have an immune memory against HLA molecules that could be perceptible with SAFB assays only at given time points. In line with this, the recent recommendations driven by the Assessment of Risk (STAR) working group propose that every inflammatory event in sensitized patients should be share prospectively with the histocompatibility laboratories (15).

In this study, we first aimed to assess the relevance of the systematic quarterly follow-up with SAG of HS patients awaiting kidney transplantation. We performed a comparative study of sensitization profiles at 3 month intervals and then evaluated the impact of the profile changes on access to a transplant. Second, we tested whether Luminex screening assays could represent an alternative to SAFB assays for HLA antibodies monitoring in HS patients. Third, we linked retrospective clinical data with anti-HLA sensitization variations in order to assess the relation between some immunological events and anti-HLA antibody profile evolution, and also the temporality of this relation.

Materials and methods

1 Patients and sera

The CRISTAL allocation database reported 220 HS patients (defined in France by a cPRA \geq 85%) awaiting kidney transplant followed in our center between July 2013 and December 2017. Among them, 166 were included. Inclusion date was 12/31/2017 for patients still on waiting list or the day of transplantation for transplanted patients. Inclusion criteria were the availability of at least 2 sera tested 3 months apart, the first within 3 months before the inclusion date, defined as the reference serum, and the second within 6 months. Depending on the transplantation waiting time and the immunological status of each patient, up to 2 additional sera could be studied (at 9 months \pm 12 months before the inclusion date). The other 54 patients were excluded: 50 because of a lack of a serum tested at 3 or 6 months before inclusion, 2 were not HS at 6 months before inclusion and the 2 others had an uninterpretable SAFB sensitization profile because of a desensitization protocol or a high background noise.

2 Anti-HLA antibodies detection

2.1 Single Antigen assay

All sera were tested with SAFB (LABScreen™ LS1A04 and LS2A01 for class I and II, respectively, One Lambda, Canoga Park, CA) according to the manufacturer's recommendations for routine assay use and acquired on a Luminex 100 analyzer (Luminex, Austin, TX). They were treated with EDTA to get rid of complement interference phenomenon (16–18) MFI values were normalized using the baseline formula (Fusion software; One Lambda). With One Lambda's reagents, SAFB MFI values greater than 1000 was usually used to define unacceptable antigens and calculate initial cPRA for non-HS patients. However, since 2017, once the patient' cPRA exceeds 85% and then the patient considered as HS, the French Biomedicine Agency recommends to consider only specificities above 2000 as unacceptable antigens. Antigens with a SAFB MFI between 500 and 1000 (500 and 2000 for HS patients) are attributed to the grey zone. Regardless of the sensitization status of patients, MFI<500 defined acceptable antigens. In the SAFB kits, some HLA antigens are represented by more than one allele. In these cases, anti-HLA antibodies not reacting with all the alleles available for an antigen resulted or not in an acceptable or a unacceptable antigen according to the respective frequency of the corresponding allele(s) in the Caucasian population, as recommended by the Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique. Linkage disequilibrium between HLA-DRB1 and HLA-DRB3/4/5 or HLA-DQA1 were also taken into account. Samples with high background (negative

control bead raw MFI \geq 500) or low signal with the positive control bead (MFI $<$ 5000) were not considered in the study.

2.2 Screening assay

Luminex antibody screening assays were carried out on selected sera using LABScreen™ Mixed kit LSM12 (One Lambda). This assay detects simultaneously class I and class II anti-HLA antibodies. Experiments were performed according to the manufacturer's instructions and acquired on a Luminex 100 analyzer. Sera were also treated with EDTA. Experiments were performed by the same experienced operator by using the same batch reagents for all sera in order to avoid batch to batch variability. Data were analyzed with Fusion software (One Lambda) and two types of results were provided for each bead: the raw fluorescence data and the normalized background ratio (NBG ratio), i.e. the mean fluorescence value of the beads after deducting background of negative control beads, normalized to the negative control serum. We analyzed 4-year positive serum control results and then determined robust coefficients of variation (CV) for these two parameters. These coefficients were different depending on the value of MFI or NBG ratio. Fifteen pairs of sera, each collected at 3 months interval, were tested: one time for the reference serum and two times for those harvested earlier. They were previously selected according to their characteristics in SAFB assay: no change, low changes (one to 2 newly positive antigens in the reference serum), significant changes ($>$ 2 newly positive antigens) and sensitization outbreaks (multiple newly positive antigens with high MFI). With the screening assay, we considered that there was a change in the antibody profile if the raw fluorescence data or the NBG ratio of at least one bead of the panel varied by more than two standard deviations with the S serum when compared to the S-3M serum.

3 PRA calculation

The evolution of cPRA between two compared sera showing profile modification was performed by calculating the cPRA via the Organ Procurement and Transplantation Network of United States calculator (<https://optn.transplant.hrsa.gov/resources/allocation-calculators/cpra-calculator/>).

4 Clinical data

Reliable clinical data were available for 75 out of the 166 patients included. Data collection was performed retrospectively using electronic and paper records. Allogeneic events such as pregnancies, transfusions, and previous transplants were searched for the entire follow-up. In the case of previous transplant, cessation or reduction of immunosuppressive drugs and transplantectomies were also retrieved. Other immunological events such as vaccinations and clinical and/or biological

inflammatory states were also recorded (ranged from infectious disease to surgery or non-specific processes with serum C-reactive protein increase). A qualitative analysis of the variability in the sensitization profile was performed over the entire pre-transplant follow-up available for each patient. Variability of sensitization profiles were initially analyzed depending on the sensitization mode (according to the allogeneic events history) and then depending on the occurrence of immunological events (including allogeneic and inflammatory events) during the pre-transplant follow-up.

5 Statistical analysis

Descriptive statistics used percentage, median and 10th-90th percentiles. Study of qualitative variables used Fisher's exact test. Comparisons between independent quantitative variables used non-parametric tests: the Mann-Whitney U-test or the Kruskal-Wallis test when more than 2 parameters were studied. Analysis and figures were performed with Prism 8® (GraphPad, San Diego, USA) or MedCalc® (Medcalc, Mariakerke, Belgium) softwares.

Results

1 Population characteristics

Among the 166 HS patients included, 147 patients were sensitized against both class I and II HLA, 7 against class I HLA only and 12 against class II HLA only. The sex ratio was 49/51 F/M, the median age was 56 years (10th – 90th percentile 35-70) and 72% received a previous kidney transplant. Calculated PRA median value was significantly higher for patients still awaiting a transplant compared to the transplanted group [99% (91%-100%) vs 94% (84%-99%)($p < 0.0001$)]. The frequency of sensitization against HLA-A,-B,-Cw,-DR, -DQ and -DP specificities was 84%, 91%, 64%, 78%, 74% and 58%, respectively. Anti-HLA-DQ sensitization stood out for its strength, as MFI values of anti-HLA-DQ specificities were significantly higher than MFI values of anti-HLA-A, -DP, -DR, -B and -Cw specificities (descending order, Figure 1 and Table 1).

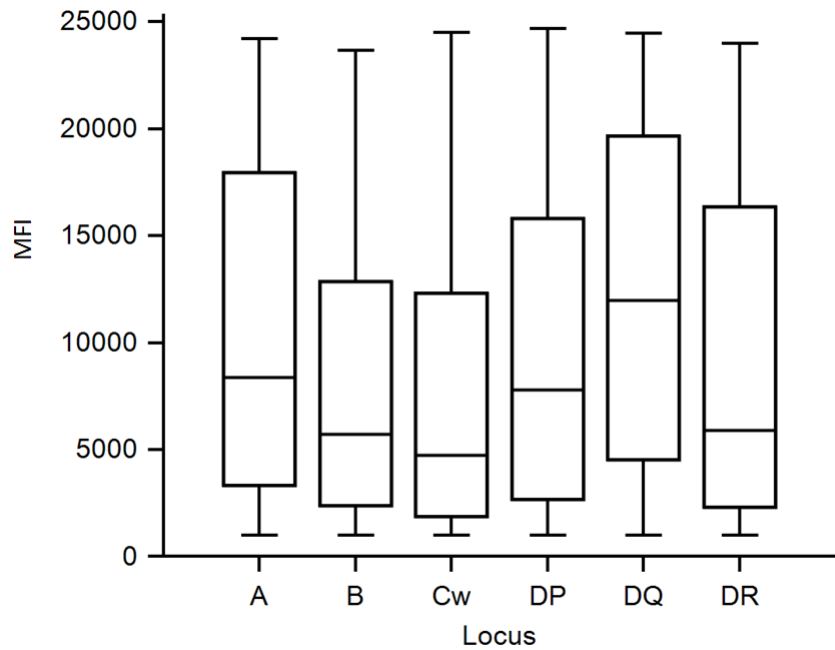


Figure 1 - MFI level of HS patients according to targeted HLA loci.

MFI of all positive antigens (MFI>1000) in the reference serum of HS patients. The boxes depict the median, and the first and third quartiles. The vertical line encompasses the range, the “outliers” being represented as dots. HS: Hypersensitized; MFI: Mean Fluorescence Intensity.

| MFI\Locus | A | B | Cw | DP | DQ | DR |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Median | 8402 | 5730 | 4773 | 7814 | 12002 | 5934 |
| Minimum | 1014 | 1000 | 1002 | 1005 | 1020 | 1000 |
| Maximum | 24197 | 23643 | 24491 | 24656 | 24451 | 23995 |
| 10th - 90th percentiles | 1772 - 21200 | 1435 - 20709 | 1277 - 20022 | 1403 - 20445 | 2185 - 22051 | 1378 - 20709 |

Table 1 - MFI level of HS patients according to targeted HLA loci. MFI of all positive antigens (MFI>1000) in the reference serum of HS patients. HS: Highly sensitized; MFI: Mean Fluorescence Intensity.

2 Sensitization profile of HS patients barely change over time

The serological study was carried out by comparing each serum (called S) with the one tested 3 months earlier when available (called S-3M). We therefore assessed the evolution of anti-HLA antibodies per quarter. On average, 3 sera were studied per patient, bringing to 351 and 346 the number of serum pairs studied for class I and II, respectively.

2.1 Evolution of unacceptable antigens for 3 months periods

Over all the quarters studied, 2.4% of class I beads and 1.9% of class II beads crossed the unacceptable antigen threshold (MFI≥2000) yet only 0.7% and 0.5% were positive de novo, i.e. were

not found positive in a previous serum tested beyond 3 months. The median MFI of de novo positive beads was 2963 (10th – 90th percentiles 2149 - 5639) and 2607(10th – 90th percentiles 2005 – 6566) for class I and II, respectively (Figure 2 and Table 2A).

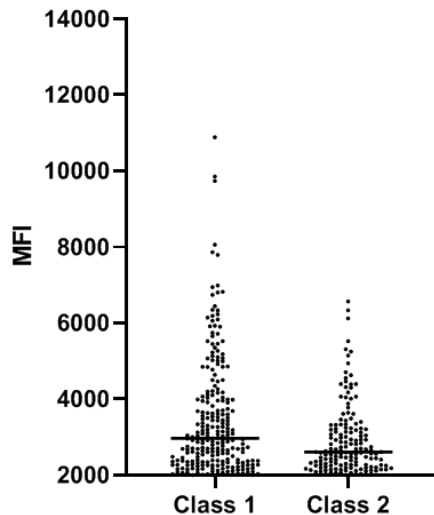


Figure 2- MFI of beads crossing the unacceptable antigens MFI threshold over 3 months of monitoring. The horizontal lines depict the median. MFI: Mean Fluorescence Intensity.

The bead conversion rate was similar when using a MFI threshold of 1000 (Supplementary Table S1). The median MFI of beads crossing the 2000 MFI threshold was lower than the median MFI of previously positive beads [(2732 vs. 10522 for class 1 and 2615 vs. 12097 for class 2 ($p < 0.0001$)]. After transformation of positive/negative beads into anti-HLA antigenic specificities, the pool of de novo positive beads corresponded to 248 antigenic specificities of which 17% HLA-A, 44% HLA-B, 17% HLA-Cw, 8% HLA-DR, 3% HLA-DQ and 12% HLA-DP. These de novo specific anti-HLA antibodies were not distributed homogeneously as they affected 38% of patients and ranged from 1 to 17 specificities per quarter, meaning that sensitization outbreaks were uncommon (Figure 3A). Since only HLA-A,-B,-DR and -DQ specificities are taken into account in the French kidney transplant allocation, an update of patients' antibody profile in the CRISTAL database was required for only 15% of the quarters studied for class I and 4% for class II. Otherwise, there was no significant difference in MFI between the de novo positive antigens considered in the graft matching (HLA-A, -B, -DR and -DQ) versus those not considered (HLA-Cw and -DP)($p=0.3$ and 0.7 , respectively).

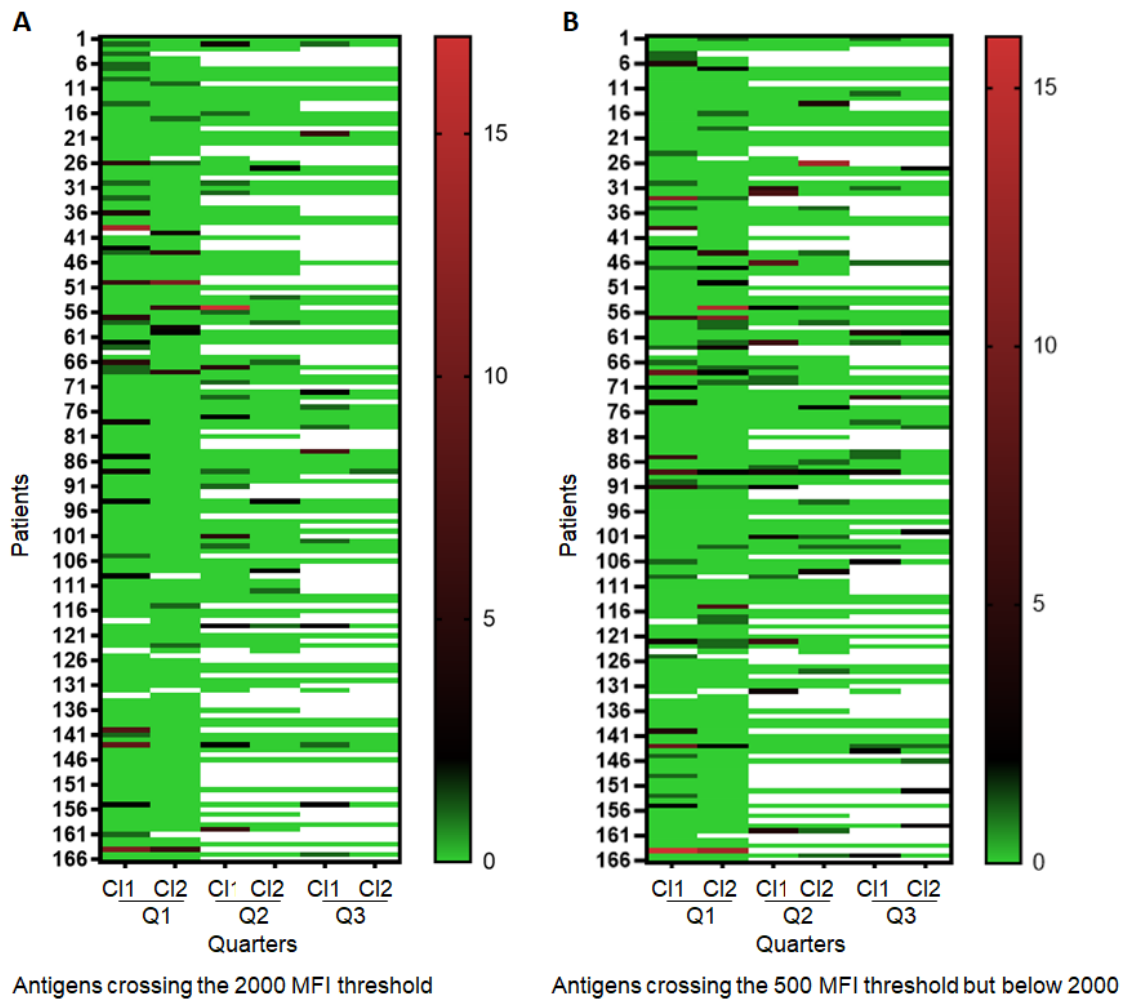


Figure 3 - Heatmaps of sensitization profiles changes for HS patients. Representation of the quarterly follow-up available in class I and II for the 166 included patients. White areas represent periods without sensitization or without follow-up. Figure 3A shows the number of new unacceptable antigenic specificities per quarter. Figure 3B shows the number of acceptable antigenic specificities that switched to the grey zone per quarter.

| MFI≥2000 | Class I | MFI median | MFI min | MFI max | 10th - 90th percentiles | Class II | MFI median | MFI min | MFI max | 10th - 90th percentiles |
|--|---------|------------|---------|---------|-------------------------|----------|------------|---------|---------|-------------------------|
| Total beads compared | 34047 | | | | | 32681 | | | | |
| Positive beads after 3 months | 30.8% | 9375 | 2000 | 26880 | 2720 - 21457 | 29.1% | 11596 | 2000 | 25371 | 2847 - 21940 |
| Positive conversion after 3 months | 2.4% | 2732 | 2001 | 19184 | 2112 - 4924 | 1.9% | 2615 | 2003 | 21343 | 2090 - 4927 |
| Positive conversion <i>de novo</i> after 3 months | 0.7% | 2963 | 2001 | 10883 | 2147 - 5639 | 0.5% | 2607 | 2005 | 6566 | 21224311 |
| Positive conversion useful for database update | 0.5% | 3110 | 2001 | 10883 | 2170 - 5804 | 0.1% | 2642 | 2033 | 6334 | 2111 - 4091 |
| MFI≥500 but <2000 (grey zone) | | | | | | | | | | |
| Grey Zone (GZ) beads after 3 months | 13.6% | 1004 | 500 | 1999 | 579 - 1743 | 12.1% | 1000 | 500 | 1998 | 568 - 1733 |
| GZ conversion after 3 months | 2.8% | 734 | 500 | 1991 | 543 - 1309 | 2.7% | 679 | 500 | 1971 | 526 - 1220 |
| GZ conversion <i>de novo</i> after 3 months | 0.7% | 723 | 500 | 1973 | 539 - 1349 | 0.9% | 702 | 500 | 1858 | 529 - 1302 |
| GZ conversion useful for database update | 0.4% | 732 | 500 | 1973 | 557 - 1370 | 0.3% | 805 | 502 | 1825 | 587 - 1454 |

Table 2 - Assessment of changes in beads status between S and S-3M sera tested with SAFB assay (percent and MFI). Table 2A describes the percentage of positive beads at the S serum with the 2000 MFI threshold. Bead conversion occurred when its MFI crossed the 2000 cut-off between serum S and S-3M. Table 2B describes the percentage of beads classified in the grey zone at the S serum, i. e. beads with MFI between 500 and 2000. Beads in the grey zone define antigens neither acceptable nor unacceptable. Bead conversion occurred when its MFI crossed the 500 cut-off between serum S and S-3M. SAFB: single antigen flow beads; MFI: Mean Fluorescence Intensity.

| MFI≥1000 | Class I | MFI median | MFI min | MFI max | 10e - 90e P | Class II | MFI median | MFI min | MFI max | 10 th - 90 th P |
|--|---------|------------|---------|---------|--------------|----------|------------|---------|---------|---------------------------------------|
| Total beads compared | 34047 | | | | | 32681 | | | | |
| Positive beads after 3 months | 37.70% | 6607 | 1000 | 26880 | 1457 - 21121 | 35.1% | 8327 | 1000 | 25371 | 1463 - 21640 |
| Positive conversion after 3 months | 2.6% | 1440 | 1000 | 19184 | 1056 - 3031 | 2.2% | 1322 | 1000 | 20859 | 1048 - 2472 |
| Positive conversion <i>de novo</i> after 3 months | 0.7% | 1479 | 1000 | 9854 | 1051 - 3698 | 0.7% | 1308 | 1000 | 6334 | 1035 - 2585 |
| Positive conversion useful for database update | 0.5% | 1500 | 1000 | 9854 | 1052 - 3894 | 0.2% | 1608 | 1000 | 6334 | 1039 - 2782 |

Table S1 - Assessment of changes in beads status between S and S-3M sera tested with SAFB assay (percent and MFI). The table describes the percentage of positive beads at the S serum with the 1000 MFI threshold. Bead conversion occurred when its MFI crossed the 1000 cut-off between serum S and S-3M. SAFB: single antigen flow beads; MFI: Mean Fluorescence Intensity.

2.2 Evolution of acceptable antigens for 3 months periods

Only a few beads switched to the grey zone after 3 months of monitoring. Among all beads compared, 0.7% of Class I beads and 0.9% of Class 2 beads crossed for the first time the 500 MFI threshold with a MFI median of 723 (539 - 1349) and 702 (529 - 1302) respectively (Table 2C). It corresponded to 317 antigens of which 11% HLA-A, 32% HLA-B, 17% HLA-Cw, 22% HLA-DR, 2% HLA-DQ and 16% HLA-DP. The distribution of these positive antigens affected 38% of patients and was also heterogeneous (Figure 2B). An update of patients' antibody profile in the allocation database was required in only 15% of the quarters studied for class I and 8% for class II. Of note, among all patients with a change in immunological status during follow-up, almost half (49%) had changes in both acceptable and unacceptable antigens (Figure 2).

3 Changes in patient sensitization profiles have a limited impact on transplant access

The emergence of new anti-HLA specificities during follow-up increases the value of the cPRA and exposes the patient to a longer waiting period, as well as a higher immunological risk in case of transplantation with a preformed DSA. Using a MFI threshold of 2000, the mean increase of cPRA was 2%. More importantly, 90% of the newly unacceptable antigens were not part of the acceptable antigens list 3 months earlier (Figure 4B). This meant that only few antigens crossing the 2000 MFI threshold could have been proposed under a national priority in the meantime. Their median MFI was 2456 (2240 - 3506) with only 3 class I and 2 class II antigens likely to induce a positive flow cytometry XM (i.e. having a MFI >3000)(19). In fact, among the 166 patient included, if quarterly serological follow-up had not been performed, the risk of obtaining a positive XM contra-indicating the transplantation affected 2% of them and the risk of transplanting an organ in a positive DSA, negative XM situation were present for an another 2% of patient population.

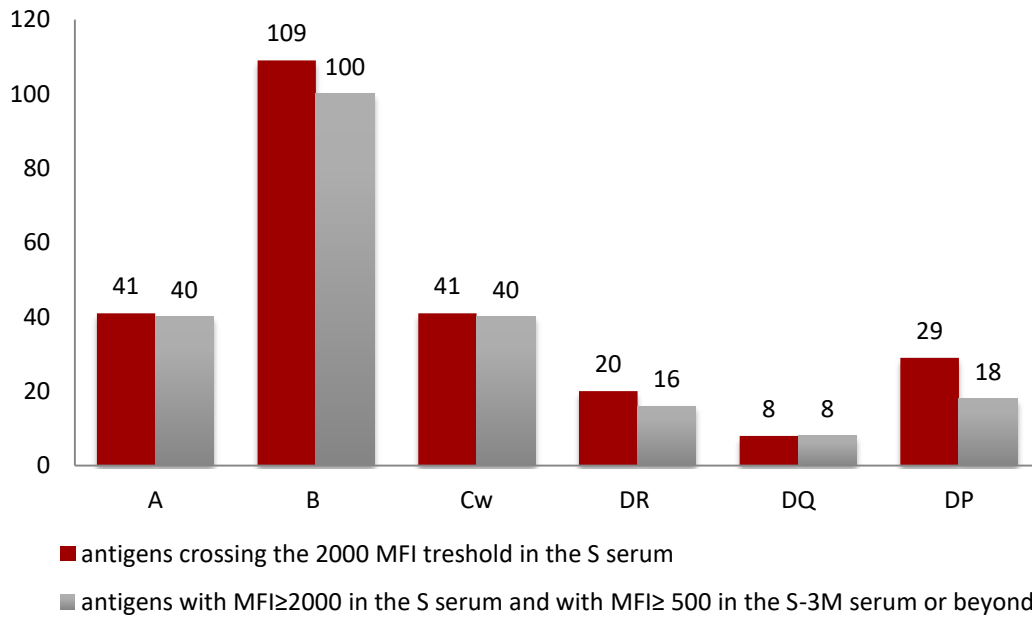


Figure 4 - Distribution of specificities above the unacceptable antigen threshold at the S serum and description of their previous immunological status. Red bars show the number of HLA-A, -B,-Cw,-DR,-DQ and -DP antigens crossing the 2000 MFI threshold in serum S. Among these antigens, are represented in grey bars those with a history of MFI ≥ 500, i.e. previously non acceptable.

Noteworthy, transplant access of HS patients is mostly conditioned by the definition of acceptable antigens that facilitate access to national and not local/regional transplants. The allelic frequency of antigens that crossed the acceptable antigens MFI threshold was low, 55% of them being represented in less than 1% of the Caucasian population (20).

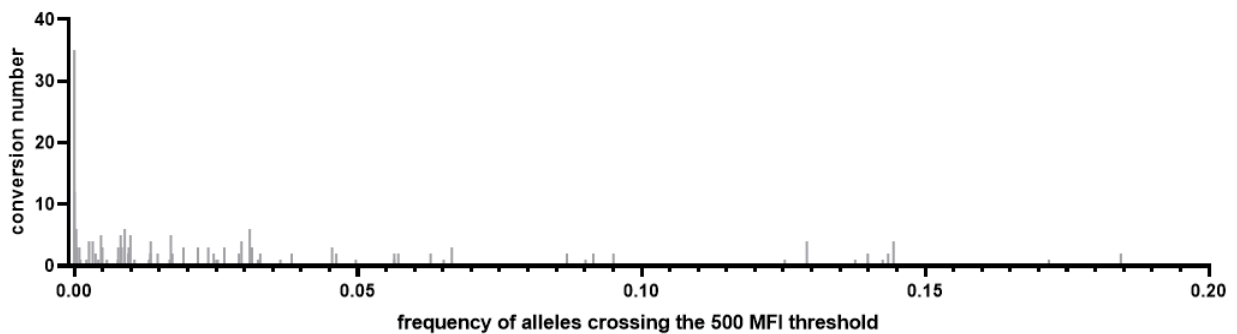


Figure 5 - Frequency distribution of the alleles reaching the grey zone between S and S-3M sera tested with SAFB assay. Grey bars depict the number of beads crossing the grey zone threshold according to the frequency of the allele concerned.

4 Alternative method to single antigen assay

Given the low frequency of anti-HLA profile modifications among HS patients, one could consider that performing a quarterly follow-up with SAFB assays is not cost effective. We then sought to determine if Luminex screening assay could be used alternately with SAFB to detect profile changes, in order to reduce follow-up cost. The sensitization profile variations of the 15 sera pairs selected and the corresponding de novo positive specificities are detailed in Table 3. Despite the definition of a robust CV, screening results were not able to predict satisfactorily the SAFB profile variations for class 1 or 2 ($p=0.56$ and $p=0.09$ respectively). Screening assay results evidenced changes in antigenic status for 13% of stable sensitization profiles, 60% of moderately changing sensitization profiles, 60% of significantly changing sensitization profiles and 80% of sensitization outbreaks. Variations were mostly detected with screening assay in case of sensitization outbreak ($p=0.03$).

| Serum pair | Class 1 SAFB evolution | <i>De novo</i> positive antigenic specificities with SAFB | Class 1 screening assay evolution | Class 2 SAFB evolution | <i>De novo</i> positive antigenic specificities with SAFB | Class 2 screening assay evolution |
|------------|------------------------|--|-----------------------------------|------------------------|--|-----------------------------------|
| 1 | low change | C15 | change | significant change | DR1 DR95 DR15 DR16 DQ8 DQ9 | no change |
| 2 | low change | B7 B27 | change | no change | | no change |
| 3 | low change | A3 | no change | no change | | no change |
| 4 | significant change | A1 A32 B72 B53 B54 B57 B58 B81 C5 C12 C16 | change | low change | DP2 | no change |
| 5 | significant change | B62 B72 B71 B76 B77 B37 B48 | change | no change | | no change |
| 6 | significant change | A32 A36 B13 B18 B38 B39 B47 B48 B56 B59 B64 B65 B78 C1 C10 C9 C6 C14 C15 | no change | no change | | no change |
| 7 | significant change | A1 A31 B42 B54 B67 B81 B82 | no change | no change | | no change |
| 8 | sensitization outbreak | B7 B13 B62 B71 B35 B41 B48 B52 B53 C2 C9 C6 C8 C14 C15 C16 C17 | change | sensitization outbreak | DR8 DR11 DR12 DR13 DR15 DR16 DR51 DP2 DP3 DP4 DP10 DP18 DP28 | change |
| 9 | sensitization outbreak | A28 A68 A69 B17 B57 B58 | change | sensitization outbreak | DP1 DP3 DP5 DP6 DP9 DP10 DP11 DP13 DP14 DP17 DP19 DP20 | no change |
| 10 | no change | | no change | low change | DP14 | no change |
| 11 | no change | | change | sensitization outbreak | DP1 DP3 DP13 DP15 DP19 DP20 DQ4 DR17 DR95 | change |
| 12 | no change | | change | no change | | no change |
| 13 | no change | | no change | no change | | no change |
| 14 | no change | | no change | no change | | no change |
| 15 | no change | | no change | no change | | no change |

Table 3 - Detection of anti-HLA antibody profile modifications with Luminex screening assay. For each pair of sera tested, changes in the sensitization profile observed at 3 months interval with the SAFB test are described semi-quantitatively as well as details of specificities crossing the unacceptable antigen threshold (MFI \geq 2000). Changes in sensitization profile with screening assay were defined by a raw fluorescence data or a NBG ratio of at least one bead of the panel on the S serum varying by more than two standard deviations with the S serum.

5 Clinico-biological correlation

Only few changes were observed in patient sensitization profiles over the serological monitoring period. However, some patients showed more variability than others at given time points, sometimes with the simultaneous appearance of a dozen new antigenic specificities. In order to understand why some patients were more exposed than others to variation of their immunological status, we first investigated whether the allogeneic events originating their broad sensitization could impact the variability of their anti-HLA antibody profile.

5.1 Allogeneic history on HS patient is not correlated to long term sensitization profile variations

Clinical data were retrieved for 75 patients of which 56% of women. The main cause for high sensitization was a previous transplantation (43%) followed by pregnancy (15%). Transfusions alone were involved in only 3% of cases. Of note, 29% of patients had multiple allogeneic events (Figure 6). Over the entire pre-transplant follow-up, we did not observe any association between anti-HLA sensitization profile variability and the type of allogeneic event from which the highly sensitized status originated or the occurrence of several allogeneic events ($p=0.8$).

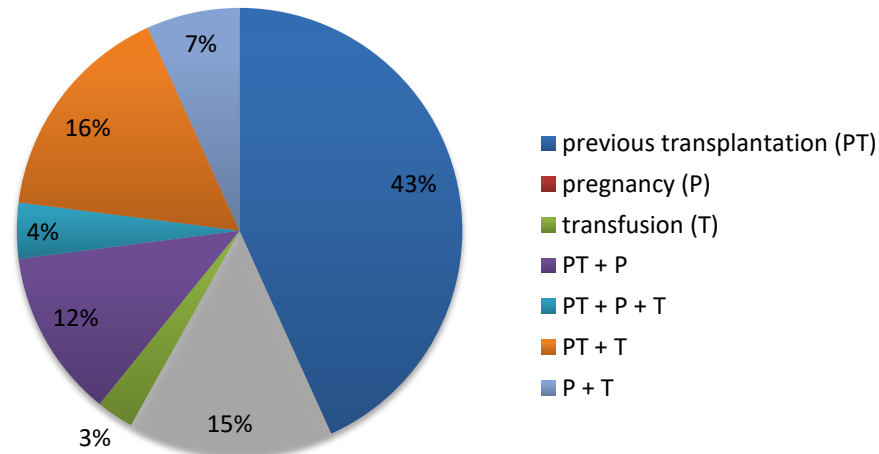


Figure 6 - Allogeneic history of HS patients. History of allogeneic events including pregnancies, transfusions, previous transplantation, alone or in combination, for the HS patients with clinical data available ($n=75$). HS: highly sensitized.

5.2 Impact of immunological events on short term anti-HLA antibody profile evolution

A total of 224 clinical events, from allogeneic events (pregnancy, transfusion, stopping immunosuppressive therapy/ transplantectomy) to “inflammatory” events (vaccines, inflammatory

state) were collected over a total of 218 years of pre-transplant follow-up, with a median of 2.5 years per patient. Among all the events collected, 86% were isolated and 14% were associated with at least another event (Figure 7). Changes in anti-HLA antibody profile were detected in the sera following the event which were tested within 3 to 6 months after 100% of the pregnancies, 88% of the immunosuppression withdrawal and/or transplantectomy, 71% of the transfusions, 58% of the inflammatory states and 49% of the vaccines.

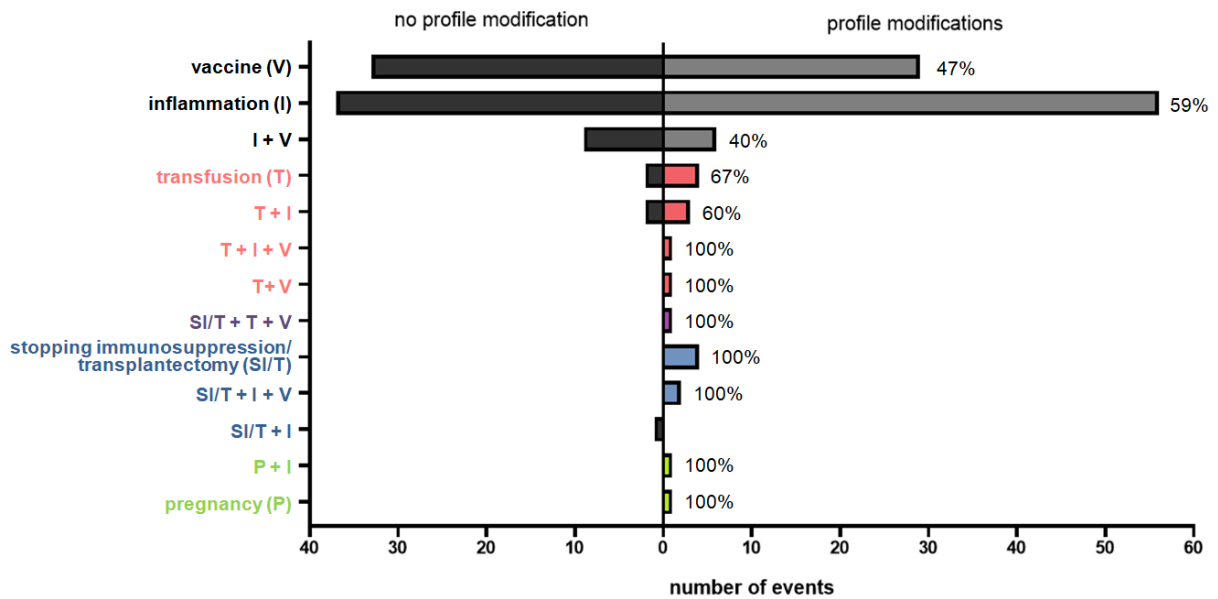


Figure 7 - Short-term influence of immunological events on anti-HLA antibody profile. Number of immunological events recorded whether they were related to sensitization profile variation (right side) on post-event sera (3 to 6 months) or not (left side). Associated events are shown separately.

All of the reported pregnancies were spontaneous miscarriages. Among vaccines, if we considered only the most frequently observed, injected alone, a change in anti-HLA profile occurred after 54% of hepatitis B vaccines, 46% of influenza vaccines and 24% of pneumococcal vaccines (Tableau 3). The C-reactive protein value at the time of the “inflammatory” events was recorded if measured. Values were available for 82% of events leading to a change in sensitization profile with a median of 40 mg/l and for 88% of events with no change in profile with a median of 52 mg/l (Figure 8). Allogeneic events were more highly associated with an increase in the breadth of HS patient sensitization than other immunological events ($p=0.03$). The occurrence of several events did not confer a greater risk for profile changes [Odds Ratio 0.98, 95% CI (0.40; 2.45)]. Finally, 35% of all observed profile changes were not related to any clinical event.

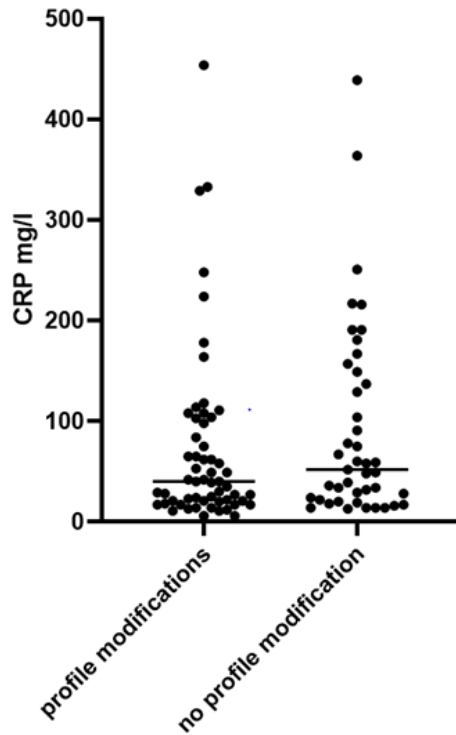


Figure 8 Value of CRP at the time of the inflammatory state and its impact on sensitization profile modifications. The horizontal lines depict the median. CRP: C reactive protein.

| Vaccines | No profile modification | Profile modifications |
|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| HPV + I + HAV + CZV | 1 | 0 |
| HI + M + P | 1 | 0 |
| HI + M | 1 | 0 |
| M | 1 | 0 |
| DTP | 1 | 0 |
| DTP + I + P + HAV | 0 | 1 |
| T | 0 | 1 |
| I + P | 1 | 1 |
| DTP + P | 1 | 2 |
| DTP + I + HBV | 0 | 1 |
| I + VHA + HBV | 0 | 1 |
| I + HBV | 0 | 1 |
| T + HBV | 0 | 1 |
| I + P + HBV | 0 | 2 |
| P + HBV | 2 | 4 |
| P | 14 | 5 |
| I | 8 | 7 |
| HBV | 11 | 13 |

Table 4 - Impact of vaccine types and combinations on HS patient's sensitization profiles. HPV: human papilloma virus, I: influenza virus, HAV: hepatitis A virus, CZV: chickenpox-zoster virus, HI: Haemophilus influenzae b, M: Nesseria meningitidis, DTP: diphtheria/tetanus/poliomyelitis, P: Streptococcus pneumoniae, T: tetanus, HBV hepatitis B virus.

5.3 Anti-HLA antibodies kinetics after an allogeneic event

Allogeneic events leading to the highly sensitized status or occurring in HS patients were observed during the pre-transplant follow-up of 38 patients. Given their proven involvement in the development of new antigenic specificities, we were interested in studying the kinetics of anti-HLA antibodies following these events in order to propose an efficient post-event follow-up. Fourteen interruption of immunosuppressive drugs, 19 transplantectomies, 10 transfusions and 2 pregnancies were monitored over 2 years (Figures 10 and 11).

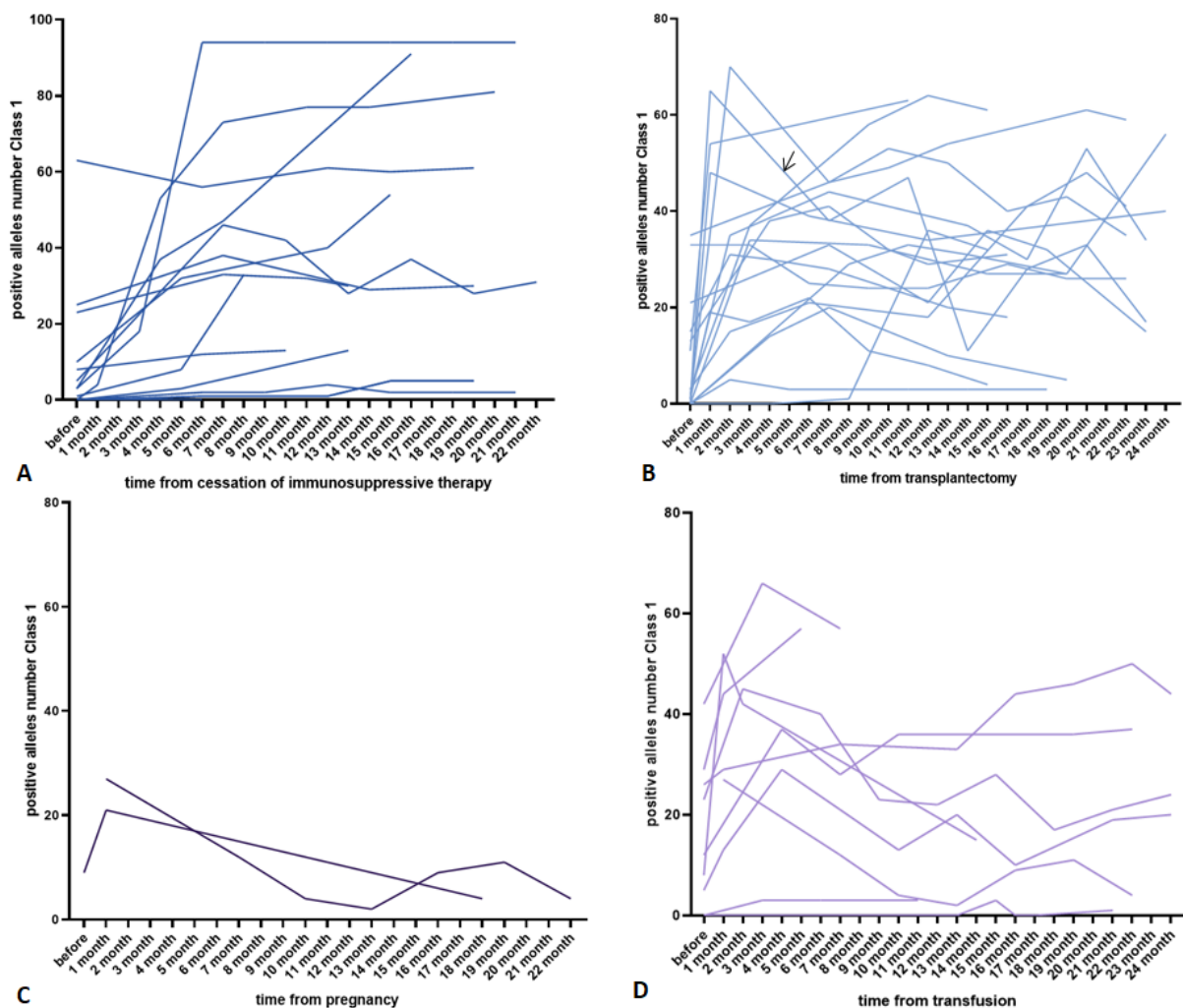


Figure 9 - Progression of class I anti-HLA antibody profile over time after allogeneic event. The lines depict the number of alleles above the 2000 MFI threshold depending on the time elapsed after the immunological event: interruption of immunosuppressive treatment (A), transplantectomy (B), pregnancy (C) and transfusion (D). The black arrow in Figure 8B represents the interruption of immunosuppression after a transplantectomy. MFI: mean fluorescence intensity.

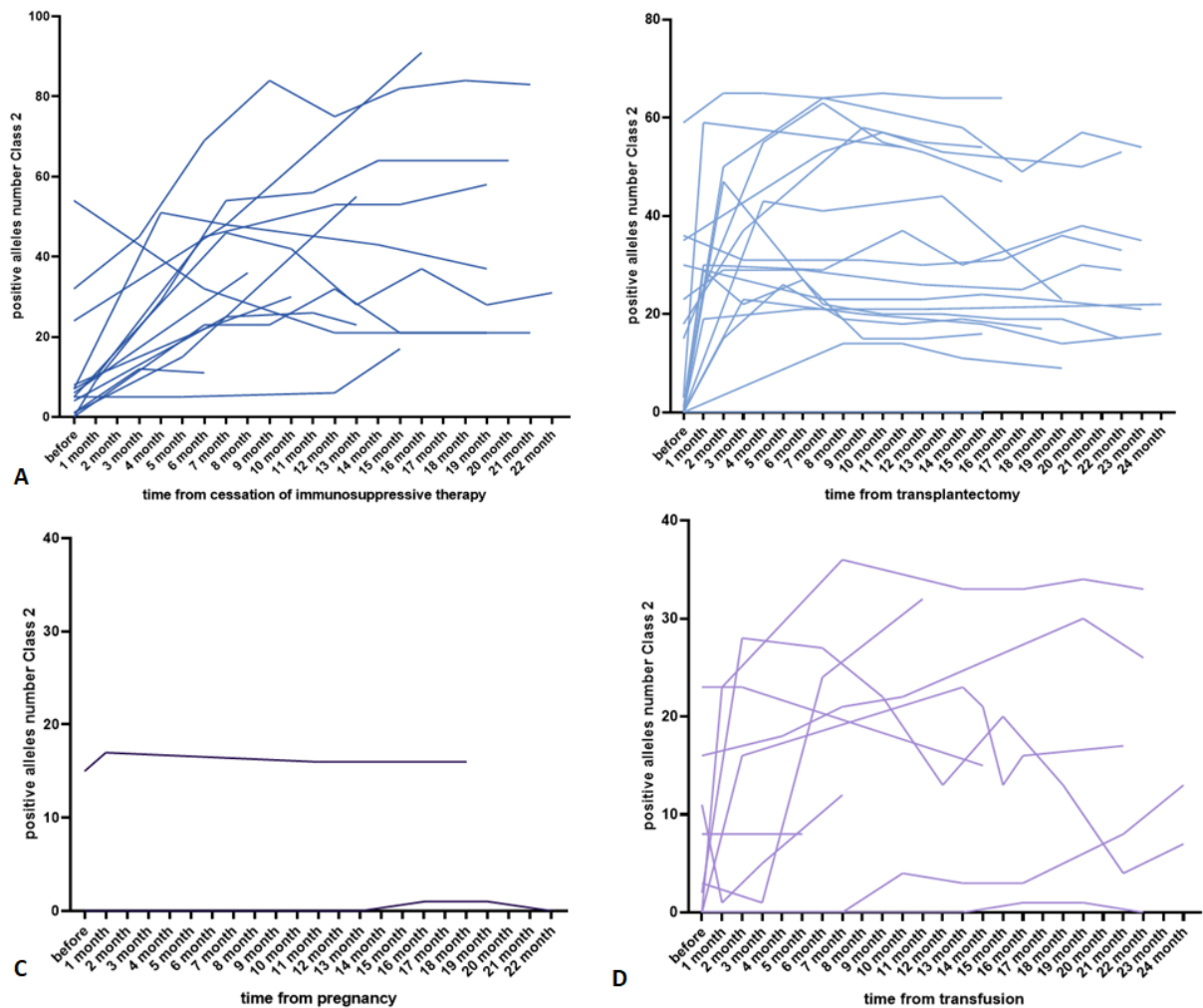


Figure 10 – Progression of class II anti-HLA antibody profile over time after allogeneic event. The lines depict the number of alleles above the 2000 MFI threshold depending on the time elapsed after the immunological event: interruption of immunosuppressive treatment (A), transplantectomy (B), pregnancy (C) and transfusion (D). The black arrow in Figure 9B represents the interruption of immunosuppression after a transplantectomy. MFI: mean fluorescence intensity.

Of the 38 patients, 66% had undergone transplantectomy and immunosuppressive drugs withdrawals occurred concomitantly in 24% of cases, before or after in 36% of cases and never happened in 4% of cases. The median delays required for sensitization profile stabilization after immunosuppressive drug withdrawals was 9 months (10th - 90th percentile: 6-16), after transplantectomy was 7 months (2-17), after transfusion was 4 months (1-16) and after pregnancy was 1 month (1-1) for class 1. It was 12 months (7-17), 5 months (2-9), 11 months (1-16) and 9 months (3-5) respectively for class 2 (Figure 11). HLA class 2 profiles, based on the 2000 MFI threshold, stabilized faster after transplantectomy than after immunosuppressive drugs withdrawal ($p=0.007$). Noteworthy, the antibody profile seemed unstable during a longer period in class 1 than in class 2 after transfusion or pregnancy.

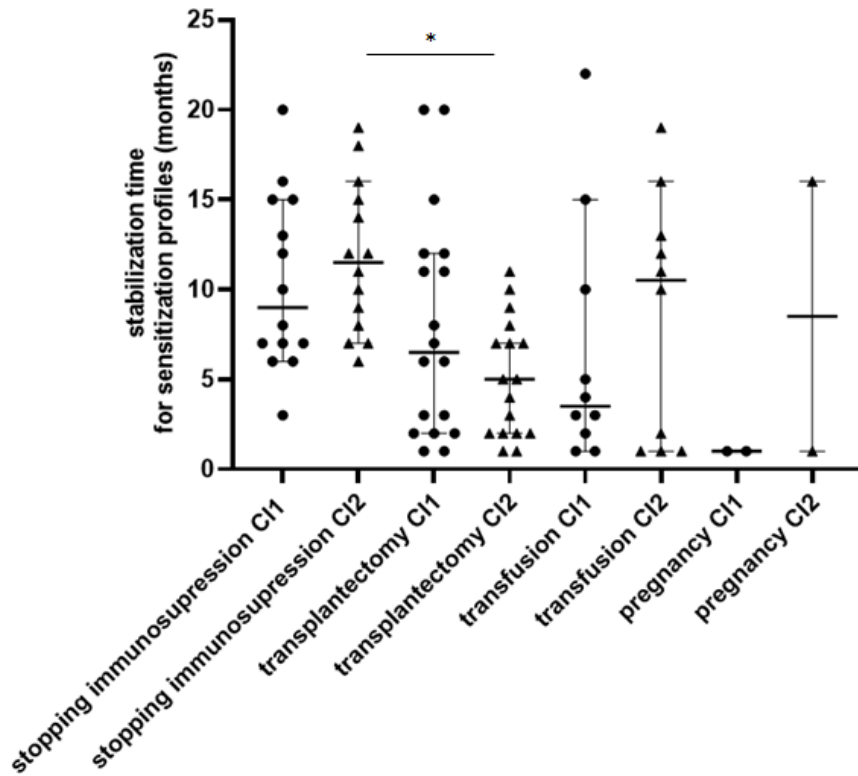


Figure 11- Stabilization delay of anti-HLA antibody profiles according to the type of allogeneic event. The horizontal lines depict the median and errors bars the 5th – 95th percentiles.*p=0.03

Discussion

In France, HS patients must benefit from a quarterly serological follow-up to maintain their priority for access to national kidney transplants. This follow-up is also recommended by EFI standards for all patients. It seemed a little stringent to us, given the apparent stability of the antibody profiles of the HS patients observed daily in our routine histocompatibility laboratory. In line with this, the recent study from Togninalli et al. (12) showed that anti-HLA antibody kinetics in patients on a kidney transplant waiting list do not appear to be related to the interval between measurements.

In our study, the systematic evaluation of the sensitization profiles of HS patients evidenced a very low conversion rate according to two critical thresholds: either the unacceptable antigen threshold ($MFI \geq 2000$) or the grey zone threshold ($MFI \geq 500$). Noteworthy, this rate rises to 5% when we considered beads already positive or in the grey zone for respective thresholds in profile history beyond 3 months. This implies that a significant number of anti-HLA antibodies fluctuate around the threshold values, which complicates the use of strict thresholds. These fluctuations may be inherent to individual biological variability or technical issues such as inter-operator variability, difference in reagent lot and analytic interferences. It clearly justifies doing several measurement during the pre-transplant period. On the basis of the quarterly monitoring, changes in overall antigenic status occurred in 37% of the quarters studied and an update of the graft allocation database was required in only 29% of the quarters studied. Interestingly, most of the antigens that crossed the unacceptable antigens threshold had a previous MFI close to this threshold and were not considered as acceptable antigens. As a consequence they could not induce a national transplant proposal and then could not alter the efficacy of the program specific to the HS patients. In parallel, the reduction in the number of acceptable antigens may affect access to a transplant. Although a high proportion of the specificities that reached the grey zone seemed to have a low frequency in the Caucasian population, evaluating the real impact of these variations requires epidemiological data on the French donor population available at the French Biomedicine Agency. For now, we did not get access to these data.

Most of the changes in anti-HLA antibody profiles of HS patients took place progressively rather than being sensitization outbreaks (78%). In addition, almost half of patients with variable sensitization profiles have an apparent upward shift in some specificities MFIs modifying both acceptable and unacceptable antigens. The progressive or intermittent emergence of anti-HLA antibodies could be due to specific or non-specific activation of pre-existing alloreactive B cells in this peculiar patient population who have undergone, for the large majority, at least one allogeneic event. Lucia et al., using a B cell ELISpot assay, highlighted the presence of both class I and II HLA-specific memory B cell

in sensitized patients awaiting for kidney transplant, even many years after the allogeneic event. Their frequencies were correlated with the MFI of the anti-HLA antibodies detected in the serum yet, interestingly, not all memory B cells produced allo-antibodies and some of them seemed to be “silent”(10). This pool of B cell could represent a concealed source for de novo anti-HLA antibodies appearing without recent allogeneic event. Noteworthy, we observed that 74% of sensitization profiles modifications were preceded by a non-allogeneic immune event such as an inflammatory state or a vaccine. These results were consistent with previous studies (13, 14, 21–23). Immunological events could thus stimulate memory B cells through pattern recognition receptors (24) and close monitoring after these events would give us a chance to observe cryptic sensitizations. However, not all of these events were associated with changes in HLA antibody profiles, and a more detailed analysis was conducted to assess whether some of them were more relevant to monitor than others. It appears that the value of CRP was not predictive of profile changes during inflammatory states. Since our study was retrospective, data collected may not have been measured at the exact peaks of inflammatory processes. With regard to vaccines, hepatitis B and influenza vaccines were often associated with variations in sensitization profiles yet, given the low numbers of events studied, they need to be confirmed through larger and prospective studies.

Although inflammatory events appear to play a role in the detection of new anti-HLA specificities, it is the occurrence of allogeneic events that have the greatest influence on increasing the sensitization breadth during follow-up of HS patients. The link between allogeneic events and sensitization has been widely described (25,26). However, in our cohort, the variability of the anti-HLA antibody profile was not dependent on the type of allogeneic event related to the HS status. This was in contrast to the results from Togninalli et al. showing greater variations in patients with a previous transplantation in comparison with patients with previous transfusion or pregnancy. This difference could be explained by the fact that we studied HS patients only where Togninalli et al. studied their entire waiting list cohort. Since only immunological events occurring prospectively impacted the immunization profile, we considered interesting to assess the kinetics of anti-HLA antibodies after events with the higher impact i.e. allogeneic events. A previous study on patients with transplant failure and immunosuppression withdrawal has shown that the proportion of patient with anti-HLA antibodies could increase up to 9 months after an allograft nephrectomy, indicating that the appearance of anti-HLA antibodies can last until 9 months. In our cohort, patients who had undergone transplantectomy, had not systematically ended their immunosuppressive therapy while we observed that anti-HLA antibodies emerged quicker after transplantectomy than after immunosuppression withdrawal (median of 6 months vs. 11 months respectively for both class I and II). Antibodies intragraft adsorption and their release into blood circulation after transplantectomy

could have explained this rapid onset and stabilization but this hypothesis has been recently invalidated by two studies (27, 28). Related inflammation to surgical procedure may also represent an important trigger (29). The median stabilization profiles after transfusion and pregnancies were 10 and 1 month respectively, but very few events were studied. All these delays contrast with the serological follow-up after allogeneic event recommended by the French Biomedicine Agency, which is 15 and 30 days post-event. Given the moderate rate of quarterly change in antigenic status and the impact of immunological events on patient sensitization profile, an evolution in serological monitoring from one based on a systematic rhythm to one modulated according to the occurrence of immunological events should be considered. Based on our results, close follow-up could be indicated for at least one year following an allogeneic event and then spaced out if no inflammatory event is observed. More investigations are needed to define secondary follow-up tightening based on the occurrence of inflammatory events, including the type and timing of post-event follow-up to be considered.

Therefore, the anti-HLA antibody profile of HS patients changes marginally every 3 months while the changes observed have a little impact on access to transplantation. No link could be established between profile variability and allogeneic event history related to HS status. However, sensitization profile changes are conditioned by occurrence of inflammatory events and especially additional allogeneic events. The systematic monitoring of these HS patients has to be optimized towards a dynamic monitoring, with closer monitoring after allogeneic and other immunological events and more spaced monitoring during the quiet periods. Additional prospective studies would be necessary to identify more precisely the inflammatory events to be taken into account and the optimal rhythm of serological assessments to be proposed.

References

1. Heneghan J, Charlton R. Wait time deconstructed. *Human Immunology*. oct 2015;76:47.
2. Keith DS, Vranic GM. Approach to the Highly Sensitized Kidney Transplant Candidate. *CJASN*. 7 avr 2016;11(4):684-93.
3. Gayo LR, Lopez Oliva MO, Alvarez L, Gonzalez E, Selgas R, Jimenez C. Acute Rejection and Short-Term Outcomes in Highly Sensitized Kidney Transplant Recipients: Transplantation. *Transplantation*. juill 2018;102:S480.
4. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*. août 2010;21(8):1398-406.
5. Ziemann M, Altermann W, Angert K, Arns W, Bachmann A, Bakchoul T, et al. Preformed Donor-Specific HLA Antibodies in Living and Deceased Donor Transplantation: A Multicenter Study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 5 juill 2019;14(7):1056-66.
6. Pérez-Flores I, Santiago JL, Calvo-Romero N, Barrientos-Guzmán A, Sánchez-Fructuoso AI. Different Impact of Pretransplant Anti-HLA Antibodies Detected by Luminex in Highly Sensitized Renal Transplanted Patients. *BioMed Research International*. 2013;2013:1-5.
7. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-Mediated Microcirculation Injury Is the Major Cause of Late Kidney Transplant Failure. *American Journal of Transplantation*. nov 2009;9(11):2520-31.
8. Claas FHJ, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis IIN. The Acceptable Mismatch Program as a Fast Tool for Highly Sensitized Patients Awaiting a Cadaveric Kidney Transplantation: Short Waiting Time and Excellent Graft Outcome: *Transplantation Journal*. juill 2004;78(2):190-3.
9. Jackson AM. The Virtual Crossmatch: An Essential Tool for Transplanting Sensitized Patients. *Clin Transpl*. 2014;131-6.
10. van Kampen CA, Versteeg-vd Voort Maarschalk MFJ, Langerak-Langerak J, Roelen DL, Claas FHJ. Kinetics of the pregnancy-induced humoral and cellular immune response against the paternal HLA class I antigens of the child. *Human Immunology*. juin 2002;63(6):452-8.
11. Murphy MF, Metcalfe P, Ord J, Lister TA, Waters AH. Disappearance of HLA and platelet-specific antibodies in acute leukaemia patients alloimmunized by multiple transfusions. *Br J Haematol*. nov 1987;67(3):255-60.
12. Togninalli M, Yoneoka D, Kolios AGA, Borgwardt K, Nilsson J. Pretransplant Kinetics of Anti-HLA Antibodies in Patients on the Waiting List for Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*. nov 2019;30(11):2262-74.
13. Marino L, Alberú J, Morales-Buenrostro LE. Influenza Immunization and the Generation of Anti-HLA and Anti-MICA Antibodies in Patients with Renal Failure and in Kidney Transplant Recipients. *Clin Transpl*. 2016;32:161-71.

14. Locke JE, Zachary AA, Warren DS, Segev DL, Houp JA, Montgomery RA, et al. Proinflammatory Events Are Associated with Significant Increases in Breadth and Strength of HLA-Specific Antibody. *American Journal of Transplantation*. sept 2009;9(9):2136-9.
15. Tambur AR, Campbell P, Claas FH, Feng S, Gebel HM, Jackson AM, et al. Sensitization in Transplantation: Assessment of Risk (STAR) 2017 Working Group Meeting Report. *American Journal of Transplantation*. juill 2018;18(7):1604-14.
16. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect: *Transplantation*. sept 2011 (5):510-5.
17. Guidicelli G, Visentin J, Franchini N, Borg C, Merville P, Couzi L, et al. Prevalence, distribution and amplitude of the complement interference phenomenon in single antigen flow beads assays. *HLA*. juin 2018;91(6):507-13.
18. Visentin J, Vigata M, Daburon S, Contin-Bordes C, Fremeaux-Bacchi V, Dromer C, et al. Deciphering Complement Interference in Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody Detection With Flow Beads Assays: *Transplantation*. sept 2014;98(6):625-31.
19. Visentin J, Bachelet T, Borg C, Franchini N, Nong T, Lee J-H, et al. Reassessment of T Lymphocytes Crossmatches Results Prediction With Luminex Class I Single Antigen Flow Beads Assay: *Transplantation*. mars 2017;101(3):624-30.
20. Maiers M, Gragert L, Klitz W. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Human Immunology*. sept 2007;68(9):779-88.
21. Lindemann, Oesterreich, Wilde, Eisenberger, Muelling, Horn, et al. Sex-Specific Differences in HLA Antibodies after Pneumococcal Vaccination in Kidney Transplant Recipients. *Vaccines*. 6 août 2019;7(3):84.
22. Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R, Ferrari-Lacraz S, Meier S, van Delden C, et al. De Novo Anti-HLA Antibody After Pandemic H1N1 and Seasonal Influenza Immunization in Kidney Transplant Recipients: H1N1 Immunization and Anti-HLA Antibody. *American Journal of Transplantation*. août 2011;11(8):1727-33.
23. Alberú J, Morales-Buenrostro LE, de Leo C, Vargas-Rojas MI, Marino-Vázquez LA, Crispín JC. A non-allogeneic stimulus triggers the production of de novo HLA antibodies in healthy adults. *Transplant Immunology*. nov 2007;18(2):166-71.
24. D'Orsogna L, van den Heuvel H, van Kooten C, Heidt S, Claas FHJ. Infectious pathogens may trigger specific allo-HLA reactivity via multiple mechanisms. *Immunogenetics*. août 2017;69(8-9):631-41.
25. Lachmann N, Schönemann C, El-Awar N, Everly M, Budde K, Terasaki PI, et al. Dynamics and epitope specificity of anti-human leukocyte antibodies following renal allograft nephrectomy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. août 2016;31(8):1351-9.
26. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Sallusto F, Guilbeau-Frugier C, Cardeau-Desangles I, Fort M, et al. Donor-Specific Antibodies after Ceasing Immunosuppressive Therapy, with or without an Allograft Nephrectomy. *CJASN*. août 2012;7(8):1310-9.

27. Bachelet T, Couzi L, Lepreux S, Legeret M, Pariscoat G, Guidicelli G, et al. Kidney Intragraft Donor-Specific Antibodies as Determinant of Antibody-Mediated Lesions and Poor Graft Outcome: Intragraft DSA Detection and AML. *American Journal of Transplantation*. nov 2013;13(11):2855-64.
28. Milongo D, Kamar N, Del Bello A, Guilbeau-Frugier C, Sallusto F, Esposito L, et al. Allelic and Epitopic Characterization of Intra-Kidney Allograft Anti-HLA Antibodies at Allograft Nephrectomy. *American Journal of Transplantation*. févr 2017;17(2):420-31.
29. Chong AS, Alegre M-L. The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. *Nat Rev Immunol*. juin 2012;12(6):459-71.

DISCUSSION et CONCLUSION

Les patients hyperimmunisés ont la particularité d'avoir un accès limité à la transplantation rénale associé à un risque plus important de rejet du greffon après transplantation. Le programme HAP a été mis en place afin d'améliorer l'accès à la transplantation de ces patients d'une part en leur offrant un plus vaste répertoire de greffons proposés (échelle nationale au lieu de régionale) et d'autre part en acceptant un moindre appariement HLA, sous réserve que les antigènes du greffon non compatibles fassent partie des antigènes permis. Ils bénéficient par ailleurs d'une priorité sur l'accès à la greffe sous réserve qu'ils soient suivis trimestriellement de façon à maîtriser le risque immunologique. Le but de notre travail était d'évaluer la pertinence du suivi trimestriel systématique des patients hyperimmunisés en attente de greffe rénale en Aquitaine, chez qui il semblait y avoir peu de modifications de leur profil d'anticorps anti-HLA au cours du temps.

Plusieurs différences ont été observées entre la cohorte régionale des patients hyperimmunisés et les données nationales. Une des explications éventuelles à ces différences est la pratique d'une politique locale souple en matière de réinscription notamment pour les re-transplantations. On constate par ailleurs que les patients les plus difficiles à greffer (évalués par un TGI très élevé) restent pénalisés et ont une durée d'attente plus longue. En effet, pour les patients avec un TGI > 95% le nombre de propositions nécessaires pour avoir une chance de trouver un donneur compatible augmente de façon exponentielle. Sur la base de données américaines, il faut par exemple qu'un patient avec un TGI de 99% bénéficie de 300 propositions pour avoir une probabilité de 95% de trouver un donneur compatible, cela passe à 600, puis 3000 puis 30 000 pour les patients avec un TGI de 99.5%, 99.9% ou 99.99% respectivement (117). Depuis 2017, le seuil de MFI à partir duquel une spécificité est considérée comme interdite chez les patients hyperimmunisés a été augmenté à 2000 afin de réduire le pool de patients et n'aider que les patients les plus démunis.

L'étude sérologique menée sur les patients inclus a révélé que, comme suspecté, les modifications trimestrielles du profil d'immunisation étaient minimes. L'impact sur l'accès à la greffe semblait limité mais l'analyse n'a été réalisée que de façon parcellaire. En effet, lorsqu'un antigène est interdit ou retiré de la liste des permis, ce sont par extension les antigènes composant l'haplotype le plus fréquent contenant l'antigène non permis ou interdit qui ne seront pas proposés. Les données sur la fréquence des haplotypes dans la population de donneurs sont donc nécessaires afin d'apprécier le plus justement cet impact, une collaboration avec l'Agence de la Biomédecine est nécessaire pour cela. L'impact immunologique était également modéré. De manière intéressante, la population de patients hyperimmunisés étudiée était marquée par une immunisation anti-DQ de forte intensité. Une précédente étude a montré que ce type d'immunisation était caractéristique des patients avec antécédent de transplantation (118), patients qui constituaient majoritairement notre population. Il est d'ailleurs probable qu'une proportion de ces anticorps soit en fait des DSA historiques. Une étude américaine a par ailleurs souligné que l'existence de mismatches HLA-DQ lors d'une greffe était associée à un risque augmenté de devenir hyperimmunisé après arrêt fonctionnel du greffon (119). Le type et la force de ces anticorps sont en outre connus pour avoir un impact négatif sur le résultat de transplantation ultérieure s'ils correspondent à des DSA (44,120). Dans cette cohorte, tous les antigènes HLA-DQ qui ont franchi le seuil de MFI de 2000 se trouvaient dans la zone grise dans l'historique du profil de sensibilisation et n'étaient donc pas proposés en cas de greffe. Ces données sont donc rassurantes dans l'hypothèse où un espacement du suivi pourrait être envisagé.

L'étude clinico-biologique a montré que les événements immunologiques ayant lieu au cours du suivi, tels que les vaccins, les états inflammatoires ou les événements allo-immunisants pouvaient être reliés à des modifications du profil d'immunisation. Les événements allo-immunisants étaient ceux qui jouaient le rôle le plus marqué. Outre le fait de pouvoir induire une nouvelle réponse allo-immune, ces événements auraient également la possibilité de stimuler directement une allo-

immunisation ancienne à travers les réactions croisées entre antigènes HLA, liées aux épitopes publics (121). Par des moyens différents, les événements inflammatoires pourraient participer à la révélation de réponses allo-immunes cryptiques. L'étude du délai de stabilité post événement allo-immunisant révèle que la quasi-totalité des profils se stabilise dans un délai inférieur à 18 mois voire 12 mois. Or, pour tous les nouveaux patients hyperimmunisés et pouvant bénéficier du programme HAP, un embargo de 18 mois à partir de la date d'inscription est systématiquement mis en place afin de réguler le flux d'accès à la greffe. En l'absence de nouvel événement allo-immunisant ou d'événement inflammatoire, le profil devrait donc apparaître stable à la levée de l'embargo et ne nécessiterait pas forcément un suivi rapproché immédiat. La situation deviendrait plus compliquée dans le cas d'un patient devenant hyperimmunisé sur la liste d'attente, car il pourrait bénéficier du programme HAP après moins de 18 mois.

Cette étude semble donc indiquer qu'il serait plus efficient de suivre les patients hyperimmunisés selon un schéma dynamique plus qu'un schéma de suivi fixe. L'objectif serait de réaliser les tests SAG de façon rapprochée après un événement immunologique afin de capter les réponses humorales allo-immunes « cryptiques » ou nouvellement formées, ces premières étant difficilement objectivables par des techniques de biologie de routine en d'autres circonstances. Le suivi pourrait être à l'inverse espacé si aucun événement n'est objectivé. Des études supplémentaires notamment prospectives sont requises afin de déterminer avec plus de précisions les délais après événement pendant lesquels un suivi rapproché serait licite ainsi qu'une définition plus précise des événements dits « inflammatoires » à prendre en considération afin de pouvoir proposer un algorithme de suivi. Une fois la stratégie optimale de suivi établie, il sera également opportun d'évaluer son impact économique en comparaison à celle actuellement en vigueur.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* 1958;20(1-4):156-66.
2. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte Antibodies in Sera from Pregnant Women. *Nature.* juin 1958;181(4625):1735-6.
3. Terasaki PI, McCLELLAND JD. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature.* déc 1964;204(4962):998-1000.
4. Bain B, Vas MR, Lowenstein L. THE DEVELOPMENT OF LARGE IMMATURE MONONUCLEAR CELLS IN MIXED LEUKOCYTE CULTURES. *Blood.* janv 1964;23:108-16.
5. Amos DB, Seigler HF, Southworth JG, Ward FE. Skin graft rejection between subjects genotyped for HL-A. *Transplant Proc.* mars 1969;1(1):342-6.
6. Terasaki PI, Vredevoe DL, Porter KA, Mickey MR, Marchioro TL, Faris TD, et al. Serotyping for homotransplantation. V. Evaluation of a matching scheme. *Transplantation.* nov 1966;4(6):688-99.
7. Klein J. George Snell's first foray into the unexplored territory of the major histocompatibility complex. *Genetics.* oct 2001;159(2):435-9.
8. †The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* déc 2003;426(6968):789-96.
9. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* déc 2004;5(12):889-99.
10. Raval A, Puri N, Rath PC, Saxena RK. Cytokine regulation of expression of class I MHC antigens. *Exp Mol Med.* mars 1998;30(1):1-13.
11. Meyer D, C. Aguiar VR, Bitarello BD, C. Brandt DY, Nunes K. A genomic perspective on HLA evolution. *Immunogenetics.* janv 2018;70(1):5-27.
12. van Oosterhout C. A new theory of MHC evolution: beyond selection on the immune genes. *Proc R Soc B.* 22 févr 2009;276(1657):657-65.
13. Sorokowska A, Pietrowski D, Schäfer L, Kromer J, Schmidt AH, Sauter J, et al. Human Leukocyte Antigen similarity decreases partners' and strangers' body odor attractiveness for women not using hormonal contraception. *Hormones and Behavior.* nov 2018;106:144-9.
14. Riley E, Olerup O. HLA polymorphisms and evolution. *Immunology Today.* sept 1992;13(9):333-5.
15. Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, Motallebzadeh R, Qureshi MS, Rehakova S, et al. Germinal Center Alloantibody Responses Are Mediated Exclusively by Indirect-Pathway CD4 T Follicular Helper Cells. *Jl.* 15 mars 2012;188(6):2643-52.

16. Fuller AA, Trevithick JE, Rodey GE, Parham P, Fuller TC. Topographic map of the HLA-A2 CREG epitopes using human alloantibody probes. *Human Immunology*. juill 1990;28(3):284-305.
17. Schwartz BD, Luehrman LK, Rodey GE. HLA public determinants are target antigens of cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med*. 1 août 1980;152(2 Pt 2):340s-50s.
18. Wujciak T, Opelz G. EVALUATION OF HLA MATCHING FOR CREG ANTIGENS IN EUROPE1: Transplantation. oct 1999;68(8):1097-9.
19. El-Awar N, Jucaud V, Nguyen A. HLA Epitopes: The Targets of Monoclonal and Alloantibodies Defined. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:1-16.
20. Duquesnoy RJ. HLA epitope based matching for transplantation. *Transplant Immunology*. juin 2014;31(1):1-6.
21. Duquesnoy RJ, Takemoto S, de Lange P, Doxiadis IIN, Schreuder GMTh, Persijn GG, et al. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival1: Transplantation. mars 2003;75(6):884-9.
22. Claas FHJ, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis IIN. The Acceptable Mismatch Program as a Fast Tool for Highly Sensitized Patients Awaiting a Cadaveric Kidney Transplantation: Short Waiting Time and Excellent Graft Outcome: Transplantation Journal. juill 2004;78(2):190-3.
23. Duquesnoy RJ, Marrari M. Correlations between Terasaki's HLA class I epitopes and HLAMatchmaker-defined eplets on HLA-A, -B and -C antigens. *Tissue Antigens*. août 2009;74(2):117-33.
24. Tambur AR, Claas FHJ. HLA Epitopes as Viewed by Antibodies: What Is it All About?: HLA Epitopes as Viewed by Antibodies. *American Journal of Transplantation*. mai 2015;15(5):1148-54.
25. Clatworthy M, Espeli M, Torpey N, Smith K. The generation and maintenance of serum alloantibody. *Current Opinion in Immunology*. oct 2010;22(5):669-81.
26. Kerjaschki D. Lymphatic Neovascularization in Human Kidney Transplants Is Associated with Immunologically Active Lymphocytic Infiltrates. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1 mars 2004;15(3):603-12.
27. Wehner JR, Fox-Talbot K, Halushka MK, Ellis C, Zachary AA, Baldwin WM. B Cells and Plasma Cells in Coronaries of Chronically Rejected Cardiac Transplants: Transplantation. mai 2010;89(9):1141-8.
28. Hammer A, Hutter H, Dohr G. HLA Class I Expression on the Materno-Fetal Interface. *American Journal of Reproductive Immunology*. sept 1997;38(3):150-7.
29. Singh M, Rajak J, Kadam S, B. Rajadhyaksha S. Alloimmunization and Role of HLA in Pregnancy. In: Abduljabbar H, éditeur. *Complications of Pregnancy [Internet]*. IntechOpen; 2019 [cité 9 janv 2020]. Disponible sur:

<https://www.intechopen.com/books/complications-of-pregnancy/alloimmunization-and-role-of-hla-in-pregnancy>

30. Cerci Gurbuz B, Soyoz M, Ozkale Okyay D, Kilicaslan Ayna T, Pirim I. Comparison of Anti-HLA Antibody Production According to Gestational Periods in Pregnant Women. *Transplantation Proceedings*. avr 2017;49(3):464-6.
31. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MichaelP, Norris PJ, Steele WR, 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: HLA ANTIBODIES IN BLOOD DONORS. *Transfusion*. sept 2009;49(9):1825-35.
32. Küssel L, Herkner H, Wahrmann M, Eskandary F, Doberer K, Binder J, et al. Longitudinal assessment of HLA and MIC-A antibodies in uneventful pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia or gestational diabetes. *Sci Rep*. déc 2017;7(1):13524.
33. Lee J, Romero R, Xu Y, Miranda J, Yoo W, Chaemsaitong P, et al. Detection of Anti-HLA Antibodies in Maternal Blood in the Second Trimester to Identify Patients at Risk of Antibody-Mediated Maternal Anti-Fetal Rejection and Spontaneous Preterm Delivery. *Am J Reprod Immunol*. août 2013;70(2):162-75.
34. Balasubramaniam GS, Morris M, Gupta A, Mesa IR, Thuraisingham R, Ashman N. Allosensitization Rate of Male Patients Awaiting First Kidney Grafts After Leuko-Depleted Blood Transfusion: *Transplantation*. févr 2012;93(4):418-22.
35. Hyun J, Park KD, Yoo Y, Lee B, Han BY, Song EY, et al. Effects of Different Sensitization Events on HLA Alloimmunization in Solid Organ Transplantation Patients. *Transplantation Proceedings*. janv 2012;44(1):222-5.
36. Kao KJ, Cook DJ, Scornik JC. Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood*. sept 1986;68(3):627-32.
37. Everett ET, Kao K-J, Scornik JC. CLASS I HLA MOLECULES ON HUMAN ERYTHROCYTES QUANTITATION AND TRANSFUSION EFFECTS: *Transplantation*. juill 1987;44(1):123-8.
38. Scornik JC, Pfaff WW, Howard RJ, Fennell RS, Ramos E, Peterson JC, et al. Increased antibody responsiveness to blood transfusions in pediatric patients. *Transplantation*. 27 déc 1994;58(12):1361-5.
39. Reisner EG, Kostyu DD, Phillips G, Walker C, Dawson DV. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens*. 11 déc 2008;30(4):161-6.
40. Bajpai M, Kaura B, Marwaha N, Kumari S, Sharma RR, Agnihotri SK. Platelet alloimmunization in multitransfused patients with haemato-oncological disorders. *Natl Med J India*. juin 2005;18(3):134-6.
41. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Pochinco D, Birk PE, Ho J, et al. Rates and Determinants of Progression to Graft Failure in Kidney Allograft Recipients With *De Novo* Donor-Specific Antibody: Post- *dn* DSA Clinical Histologic Progression. *American Journal of Transplantation*. nov 2015;15(11):2921-30.

42. Berga JK, Mateu LMP, Catalan SB, Alcaraz NP, Calabuig AS, Martinez EG, et al. Donor-Specific HLA Antibodies: Risk Factors and Outcomes After Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*. juill 2011;43(6):2154-6.
43. O'Leary JG, Samaniego M, Crespo Barrio M, Potena L, Zeevi A, Djamali A, et al. The Influence of Immunosuppressive Agents on the Risk of De Novo Donor-Specific HLA Antibody Production in Solid Organ Transplant Recipients: *Transplantation*. janv 2016;100(1):39-53.
44. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, Santos-Nunez E, Steggar C, Galliford J, et al. De Novo DQ Donor-Specific Antibodies Are Associated With a Significant Risk of Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy: *Transplantation Journal*. juill 2012;94(2):172-7.
45. Fidler SJ, Irish AB, Lim W, Ferrari P, Witt CS, Christiansen FT. Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death. *Transplant Immunology*. juin 2013;28(4):148-53.
46. Sawinski D, Forde KA, Trofe-Clark J, Patel P, Olivera B, Goral S, et al. Persistent BK Viremia Does Not Increase Intermediate-Term Graft Loss but Is Associated with *De Novo* Donor-Specific Antibodies. *JASN*. avr 2015;26(4):966-75.
47. Del Bello A, Congy N, Sallusto F, Cardeau-Desangles I, Fort M, Esposito L, et al. Anti-Human Leukocyte Antigen Immunization After Early Allograft Nephrectomy: *Transplantation Journal*. mai 2012;93(9):936-41.
48. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Sallusto F, Guilbeau-Frugier C, Cardeau-Desangles I, Fort M, et al. Donor-Specific Antibodies after Ceasing Immunosuppressive Therapy, with or without an Allograft Nephrectomy. *CJASN*. août 2012;7(8):1310-9.
49. Marrari M, Duquesnoy RJ. Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of a rejected kidney transplant. *Transplant Immunology*. févr 2010;22(3-4):105-9.
50. Scornik JC, Kriesche H-UM. Human leukocyte antigen sensitization after transplant loss: timing of antibody detection and implications for prevention. *Human Immunology*. mai 2011;72(5):398-401.
51. Meier-Kriesche H-U, Scornik JC, Susskind B, Rehman S, Schold JD. A Lifetime Versus a Graft Life Approach Redefines the Importance of HLA Matching in Kidney Transplant Patients: *Transplantation*. juill 2009;88(1):23-9.
52. Fuller TC, Fuller A. THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE AGAINST AN HLA CLASS I ALLODETERMINANT CORRELATES WITH THE HLA-DR PHENOTYPE OF THE RESPONDER1: *Transplantation*. juill 1999;68(2):173-82.
53. Gralla J, Tong S, Wiseman AC. The impact of human leukocyte antigen mismatching on sensitization rates and subsequent retransplantation after first graft failure in pediatric renal transplant recipients. *Transplantation*. 27 mai 2013;95(10):1218-24.

54. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J. “Natural” Human Leukocyte Antigen Antibodies Found in Nonalloimmunized Healthy Males: Transplantation. oct 2008;86(8):1111-5.
55. El Aggan HA, Sidkey F, El Gezery DA, Ghoneim E. Circulating anti-HLA antibodies in patients with chronic hepatitis C: relation to disease activity. Egypt J Immunol. 2004;11(2):71-9.
56. Heidt S, Feltkamp MC, Karahan GE, de Brouwer CS, Langerak-Langerak J, Mulder A, et al. No Evidence for Cross-reactivity of Virus-specific Antibodies With HLA Alloantigens: Transplantation. nov 2018;102(11):1844-9.
57. Hirata AA, Terasaki PI. Cross-Reactions between Streptococcal M Proteins and Human Transplantation Antigens. Science. 29 mai 1970;168(3935):1095-6.
58. Hirata AA, McIntire FC, Terasaki PI, Mittal KK. Cross reactions between human transplantation antigens and bacterial lipopolysaccharides. Transplantation. mai 1973;15(5):441-5.
59. Ravindranath MH, Kaneku H, El-Awar N, Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI. Antibodies to HLA-E in Nonalloimmunized Males: Pattern of HLA-Ia Reactivity of Anti-HLA-E-Positive Sera. JI. 1 août 2010;185(3):1935-48.
60. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, Jacquelinet C, Audry B, Nong T, et al. Denatured Class I Human Leukocyte Antigen Antibodies in Sensitized Kidney Recipients: Prevalence, Relevance, and Impact on Organ Allocation. Transplantation. oct 2014;98(7):738-44.
61. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect: Transplantation. sept 2011;92(5):510-5.
62. Guidicelli G, Visentin J, Franchini N, Borg C, Merville P, Couzi L, et al. Prevalence, distribution and amplitude of the complement interference phenomenon in single antigen flow beads assays. HLA. juin 2018;91(6):507-13.
63. Otten HG, Verhaar MC, Borst HPE, van Eck M, van Ginkel WGJ, Hené RJ, et al. The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation: Antibodies against denatured or intact HLA. Clin Exp Immunol. sept 2013;173(3):536-43.
64. Griffiths EJ, Nelson RE, Dupont PJ, Warrens AN. SKEWING OF PRETRANSPLANT ANTI-HLA CLASS I ANTIBODIES OF IMMUNOGLOBULIN G ISOTYPE SOLELY TOWARD IMMUNOGLOBULIN G1 SUBCLASS IS ASSOCIATED WITH POORER RENAL ALLOGRAFT SURVIVAL: Transplantation. juin 2004;77(11):1771-3.
65. Kushihata F, Watanabe J, Mulder A, Claas F, Scornik JC. Human Leukocyte Antigen Antibodies and Human Complement Activation: Role of IgG Subclass, Specificity, and Cytotoxic Potential: Transplantation. oct 2004;78(7):995-1001.

66. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C, Duong van Huyen J-P, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *JASN*. janv 2016;27(1):293-304.
67. Lowe D, Higgins R, Zehnder D, Briggs DC. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: Implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Human Immunology*. mai 2013;74(5):666-72.
68. Babu A, Andreou A, Briggs D, Krishnan N, Higgins R, Mitchell D, et al. Clinical Relevance of Donor-Specific IgM Antibodies in HLA Incompatible Renal Transplantation: A Retrospective Single-Center Study. *Clin Transpl*. 2016;32:173-9.
69. Arnold M-L, Bach C, Heinemann FM, Horn PA, Ziemann M, Lachmann N, et al. Anti-HLA alloantibodies of the IgA isotype in re-transplant candidates part II: Correlation with graft survival. *Int J Immunogenet*. juin 2018;45(3):95-101.
70. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney International*. janv 2016;89(1):209-16.
71. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. janv 2013;32(1):98-105.
72. Bartel G, Brown K, Phillips R, Peng Q, Zhou W, Sacks SH, et al. Donor specific transplant tolerance is dependent on complement receptors. *Transplant International*. janv 2013;26(1):99-108.
73. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thaunat O, Dubois V, et al. Non-Complement-Binding *De Novo* Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. *JASN*. févr 2016;27(2):615-25.
74. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q Binding Activity of *De Novo* Donor-specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-mediated Rejection: *Transplantation*. juin 2015;99(6):1151-5.
75. Jackson AM. The Virtual Crossmatch: An Essential Tool for Transplanting Sensitized Patients. *Clin Transpl*. 2014;131-6.
76. Li F, Wei J, Valenzuela NM, Lai C, Zhang Q, Gjertson D, et al. Phosphorylated S6 kinase and S6 ribosomal protein are diagnostic markers of antibody-mediated rejection in heart allografts. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. avr 2015;34(4):580-7.
77. Ziegler ME, Jin Y-P, Young SH, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I-mediated stress fiber formation requires ERK1/2 activation in the absence of an increase in intracellular Ca²⁺ in human aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 15 oct 2012;303(8):C872-82.

78. Jin Y-P, Valenzuela NM, Zhang X, Rozengurt E, Reed EF. HLA Class II–Triggered Signaling Cascades Cause Endothelial Cell Proliferation and Migration: Relevance to Antibody-Mediated Transplant Rejection. *Jl.* 1 avr 2018;200(7):2372-90.
79. Naemi FMA, Carter V, Kirby JA, Ali S. Anti-Donor HLA Class I Antibodies: Pathways to Endothelial Cell Activation and Cell-Mediated Allograft Rejection. *Transplantation Journal.* août 2013;96(3):258-66.
80. Narayanan K, Jaramillo A, Phelan DL, Mohanakumar T. Pre-exposure to sub-saturating concentrations of HLA class I antibodies confers resistance to endothelial cells against antibody complement-mediated lysis by regulating Bad through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur J Immunol.* août 2004;34(8):2303-12.
81. Yamakuchi M, Kirkiles-Smith NC, Ferlito M, Cameron SJ, Bao C, Fox-Talbot K, et al. Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 23 janv 2007;104(4):1301-6.
82. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Sarma JV, et al. C5a-Induced Gene Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *The American Journal of Pathology.* mars 2004;164(3):849-59.
83. Markiewski MM, Nilsson B, Nilsson Ekdahl K, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends in Immunology.* avr 2007;28(4):184-92.
84. Bay JT, Schejbel L, Madsen HO, Sørensen SS, Hansen JM, Garred P. Low C4 gene copy numbers are associated with superior graft survival in patients transplanted with a deceased donor kidney. *Kidney International.* sept 2013;84(3):562-9.
85. Kojc N, Večerić Haler Ž. Antibody Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients. In: Vitin A, éditeur. *Perioperative Care for Organ Transplant Recipient* [Internet]. IntechOpen; 2019 [cité 9 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/perioperative-care-for-organ-transplant-recipient/antibody-mediated-rejection-in-kidney-transplant-recipients>
86. Yazdani S, Callemeyn J, Gazut S, Lerut E, de Loor H, Wevers M, et al. Natural killer cell infiltration is discriminative for antibody-mediated rejection and predicts outcome after kidney transplantation. *Kidney International.* janv 2019;95(1):188-98.
87. Rosales C. Fcγ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Front Immunol* [Internet]. 20 mars 2017 [cité 9 janv 2020];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00280/full>
88. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology.* août 2010;21(8):1398-406.
89. Adebiyi OO, Gralla J, Klem P, Freed B, Davis S, Wiseman AC, et al. Clinical Significance of Pretransplant Donor-Specific Antibodies in the Setting of Negative Cell-Based Flow Cytometry Crossmatching in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation.* déc 2016;16(12):3458-67.

90. Ziemann M, Altermann W, Angert K, Arns W, Bachmann A, Bakchoul T, et al. Preformed Donor-Specific HLA Antibodies in Living and Deceased Donor Transplantation: A Multicenter Study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 5 juill 2019;14(7):1056-66.
91. Bailly E, Anglicheau D, Blancho G, Gatault P, Vuiblet V, Chatelet V, et al. Prognostic Value of the Persistence of C1q-Binding Anti-HLA Antibodies in Acute Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(4):688-98.
92. Jordan SC, Lorant T, Choi J, Kjellman C, Winstedt L, Bengtsson M, et al. IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation. *N Engl J Med*. 3 août 2017;377(5):442-53.
93. Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive Crossmatch Kidney Transplant Recipients Treated With Eculizumab: Outcomes Beyond 1 Year: Late Outcomes After Eculizumab. *American Journal of Transplantation*. mai 2015;15(5):1293-302.
94. Everly MJ, Terasaki PI, Trivedi HL. Durability of Antibody Removal Following Proteasome Inhibitor-Based Therapy: Transplantation. *Transplantation*. janv 2012;1.
95. Vo AA, Zeevi A, Choi J, Cisneros K, Toyoda M, Kahwaji J, et al. A Phase I/II Placebo-Controlled Trial of C1-Inhibitor for Prevention of Antibody-Mediated Rejection in HLA Sensitized Patients: Transplantation. *Transplantation*. févr 2015;99(2):299-308.
96. Choi J, Aubert O, Vo A, Loupy A, Haas M, Puliyananda D, et al. Assessment of Tocilizumab (Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal) as a Potential Treatment for Chronic Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy in HLA-Sensitized Renal Allograft Recipients. *Am J Transplant*. sept 2017;17(9):2381-9.
97. Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, Sicard A, Rabeyrin M, Morelon E, et al. Recent advances in renal transplantation: antibody-mediated rejection takes center stage. *F1000Prime Rep*. 2015;7:51.
98. Wan SS, Ying TD, Wyburn K, Roberts DM, Wyld M, Chadban SJ. The Treatment of Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Transplantation*. avr 2018;102(4):557-68.
99. Maruyama M, Lam K-P, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*. oct 2000;407(6804):636-42.
100. Lúcia M, Luque S, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Martorell J, et al. Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney International*. oct 2015;88(4):874-87.
101. Snanoudj R, Claas FHJ, Heidt S, Legendre C, Chatenoud L, Candon S. Restricted specificity of peripheral alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant. *Kidney International*. juin 2015;87(6):1230-40.
102. Alberú J, Morales-Buenrostro LE, de Leo C, Vargas-Rojas MI, Marino-Vázquez LA, Crispín JC. A non-allogeneic stimulus triggers the production of de novo HLA antibodies in healthy adults. *Transplant Immunology*. nov 2007;18(2):166-71.

103. Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R, Ferrari-Lacraz S, Meier S, van Delden C, et al. De Novo Anti-HLA Antibody After Pandemic H1N1 and Seasonal Influenza Immunization in Kidney Transplant Recipients: H1N1 Immunization and Anti-HLA Antibody. *American Journal of Transplantation*. août 2011;11(8):1727-33.
104. Lindemann, Oesterreich, Wilde, Eisenberger, Muelling, Horn, et al. Sex-Specific Differences in HLA Antibodies after Pneumococcal Vaccination in Kidney Transplant Recipients. *Vaccines*. 6 août 2019;7(3):84.
105. Marino L, Alberú J, Morales-Buenrostro LE. Influenza Immunization and the Generation of Anti-HLA and Anti-MICA Antibodies in Patients with Renal Failure and in Kidney Transplant Recipients. *Clin Transpl*. 2016;32:161-71.
106. Chong AS, Alegre M-L. The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. *Nat Rev Immunol*. juin 2012;12(6):459-71.
107. Locke JE, Zachary AA, Warren DS, Segev DL, Houp JA, Montgomery RA, et al. Proinflammatory Events Are Associated with Significant Increases in Breadth and Strength of HLA-Specific Antibody. *American Journal of Transplantation*. sept 2009;9(9):2136-9.
108. Candon S, Thervet E, Lebon P, Suberbielle C, Zuber J, Lima C, et al. Humoral and Cellular Immune Responses after Influenza Vaccination in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. oct 2009;9(10):2346-54.
109. Fairhead T, Hendren E, Tinckam K, Rose C, Sherlock CH, Shi L, et al. Poor seroprotection but allosensitization after adjuvanted pandemic influenza H1N1 vaccine in kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. déc 2012;14(6):575-83.
110. Mulley WR, Dendle C, Ling JEH, Knight SR. Does vaccination in solid-organ transplant recipients result in adverse immunologic sequelae? A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. juill 2018;37(7):844-52.
111. D'Orsogna L, van den Heuvel H, van Kooten C, Heidt S, Claas FHJ. Infectious pathogens may trigger specific allo-HLA reactivity via multiple mechanisms. *Immunogenetics*. août 2017;69(8-9):631-41.
112. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 23 janv 1996;93(2):705-8.
113. Friedewald JJ, Turgeon N. Early Experience with the New Kidney Allocation System: A Perspective from a Transplant Center. *CJASN*. 7 déc 2017;12(12):2060-2.
114. Research Department, United Network for Organ Sharing, USA, E. Stewart D, R. Wilk A, Research Department, United Network for Organ Sharing, USA, K. Klassen D, Office of the Chief Medical Officer, United Network for Organ Sharing, USA. KAS Turns Four: The State of Deceased Donor Kidney Allocation in the U.S. *obm transplant*. 28 oct 2018;3(1):1-1.

115. Montgomery RA, Lonze BE, King KE, Kraus ES, Kucirka LM, Locke JE, et al. Desensitization in HLA-Incompatible Kidney Recipients and Survival. *N Engl J Med*. 28 juill 2011;365(4):318-26.
116. Vo AA, Sinha A, Haas M, Choi J, Mirocha J, Kahwaji J, et al. Factors Predicting Risk for Antibody-mediated Rejection and Graft Loss in Highly Human Leukocyte Antigen Sensitized Patients Transplanted After Desensitization: Transplantation. *Transplantation*. juill 2015;99(7):1423-30.
117. Keith DS, Vranic GM. Approach to the Highly Sensitized Kidney Transplant Candidate. *CJASN*. 7 avr 2016;11(4):684-93.
118. Akgul SU, Ciftci HS, Temurhan S, Caliskan Y, Bayraktar A, Tefik T, et al. Association Between HLA Antibodies and Different Sensitization Events in Renal Transplant Candidates. *Transplantation Proceedings*. avr 2017;49(3):425-9.
119. Singh P, Filippone EJ, Colombe BW, Shah AP, Zhan T, Harach M, et al. Sensitization trends after renal allograft failure: the role of DQ eplet mismatches in becoming highly sensitized. *Clin Transplant*. janv 2016;30(1):71-80.
120. Lee H, Min JW, Kim J-I, Moon I-S, Park K-H, Yang CW, et al. Clinical Significance of HLA-DQ Antibodies in the Development of Chronic Antibody-Mediated Rejection and Allograft Failure in Kidney Transplant Recipients: *Medicine*. mars 2016;95(11):e3094.
121. Opelz G, Graver B, Mickey MR, Terasaki PI. LYMPHOCYTOXIC ANTIBODY RESPONSES TO TRANSFUSIONS IN POTENTIAL KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS: *Transplantation*. sept 1981;32(3):177-83.

Serment d'Hippocrate

“Au moment d’être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d’être fidèle aux lois de l’honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J’interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l’humanité.

J’informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n’exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l’indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l’intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l’intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l’indépendance nécessaire à l’accomplissement de ma mission. Je n’entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J’apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu’à leurs familles dans l’adversité.

Que les hommes et mes confrères m’accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j’y manque.”

Evolution du profil d'immunisation des patients hyperimmunisés en attente de transplantation rénale.

Les patients hyperimmunisés anti-HLA en attente de transplantation rénale bénéficient d'une priorité nationale via le programme « HAP » (Hyperimmunisés à Antigènes Permis). Le maintien de cette priorité requiert que ces patients aient un sérum testé en Single Antigen (SAG) au minimum tous les 105 jours afin de détecter d'éventuels nouveaux anticorps anti-HLA, et ainsi éviter la survenue inattendue d'un crossmatch positif. Il semble pourtant exister un déséquilibre entre ce rythme de surveillance élevé et la stabilité de leur immunisation. Notre objectif principal a été d'évaluer la pertinence du suivi trimestriel des patients HAP.

Nous avons inclus 166 patients HAP ayant au moins 2 sérums testés en SAG à 3 mois d'intervalle (S, le plus récent, et S-3M) durant leur période d'attente, avec une médiane de 3 sérums étudiés par patient. Un recueil des événements allogéniques et non allogéniques survenus au cours du suivi a été réalisé pour 75 patients.

Sur 357 paires de sérums comparées, seules 0,7% des billes classe I et 0,5% des billes classe II sont devenues positives [*mean fluorescence intensity* (MFI) ≥ 2000] au sérum S, avec une MFI médiane respective de 2963 et 2607. Ces billes correspondaient à 248 antigènes. Parmi eux, 90% étaient au-delà du seuil des antigènes permis à S-3M ($500 < \text{MFI} < 2000$). L'augmentation moyenne du taux de greffon incompatible était de 2%. Les variations des profils d'immunisations n'étaient pas liées aux antécédents d'événements allo-immunisants mais dépendaient de la survenue d'événements immunologiques non allogéniques (vaccin, état inflammatoire) ou allogéniques (arrêt de l'immunosuppression/transplantectomie, transfusion ou grossesse) au cours du suivi.

Les modifications de profil des patients HAP par trimestre sont marginales et ont un impact limité. La plupart sont liées à la survenue d'événements immunologiques. Par conséquent, le suivi des patients HAP pourrait être optimisé à travers une stratégie dynamique personnalisée remplaçant le suivi trimestriel systématique.

Mots clés : Patients hyperimmunisés, anticorps anti-HLA, technique single antigen, événements immunologiques du suivi pré-greffe.

Evolution of anti-HLA sensitization of highly sensitized patients awaiting kidney transplantation

Anti-HLA highly sensitized (HS) patients awaiting kidney transplantation benefit from national priority through the "HAP" program (HS with acceptable antigens). Maintaining this priority requires these patients have a serum tested with Single Antigen Flow Beads (SAFB) assays every 105 days in order to detect potential anti-HLA antibodies emergence and then prevent unexpected positive crossmatches. However, it seems that there is an imbalance between this high surveillance rate and the apparent stability of patient sensitization profiles. We aimed to assess the relevance of the quarterly biological follow-up of HS patients.

We included 166 HS patients displaying at least 2 sera tested at 3-month intervals during their waiting period (S, the most recent, and S-3M). A median of 3 sera per patient were tested with SAFB. We also retrieved the occurrence of allogeneic and non-allogeneic immunological events for 75 patients.

From the 357 serum pairs studied, only 0.7% of class I beads and 0.5% of class II beads crossed the unacceptable antigen threshold at the S serum [*mean fluorescence intensity* (MFI) ≥ 2000] with a median MFI of 2963 and 2607, respectively. These beads corresponded to 248 antigens. Among them, 90% were above the threshold of the acceptable antigens ($500 < \text{MFI} < 2000$) at S-3M. The mean increase of calculated panel reactive antibodies was 2%. Variations in HS patient profiles were not related to patient history of allogeneic events but depended on the occurrence of non-allogeneic events such as vaccines, inflammatory states and even more of allogeneic events such as immunosuppression withdrawal/transplantectomy, transfusion or pregnancy.

Changes in HS patient anti-HLA profiles are marginal within 3-months periods and had a limited immunological impact. Most of them are related to the occurrence of immunological events. Therefore, the monitoring of these HS patients could be optimized towards a dynamic monitoring rather than a systematic quarterly monitoring.

Key words: Highly sensitized patients, HLA antibodies, single antigen flow beads, pre-transplant follow-up Immunological events.