



HAL
open science

HLA Graph : modèle d'analyse épitopique des anticorps antiHLA

Cédric Usureau

► **To cite this version:**

Cédric Usureau. HLA Graph : modèle d'analyse épitopique des anticorps antiHLA. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03587228

HAL Id: dumas-03587228

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03587228v1>

Submitted on 24 Feb 2022

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.



UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

U.F.R de Médecine

Année Universitaire 2020/2021 - Thèse N° 2021-234

MEMOIRE

**POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenue publiquement le 29/10/2021, par :

Cédric Usureau

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
MEDECINE**

**HLA Graph : modèle d'analyse épitopique des
anticorps anti-HLA**

Devant le jury composé de :

Professeur Gabriel Choukroun	Président, CHU Amiens
Professeur Jean-Luc Taupin	Rapporteur, AP-HP
Professeur Romuald Mentaverri	Rapporteur, CHU Amiens
Docteur Nicolas Guillaume	Directeur de thèse, CHU Amiens
Docteur Macha Nikolski	Invitée Centre de Bio-informatique de Bordeaux

Remerciements

Au président du Jury :

Monsieur le Professeur Gabriel CHOUKROUN

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Néphrologie)

Doyen, Directeur de l'Unité de Formation et de Recherche de Médecine d'AMIENS

Chef du service de Néphrologie, Médecine interne, Dialyse, Transplantation (Pôle D.R.I.M.E)

Pour avoir accepté la présidence de mon jury de thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Aux assesseurs :

Monsieur le Professeur Jean-Luc Taupin

Professeur des Universités-Patricien Hospitalier (Immunologie)

Chef de Service Adjoint du laboratoire d'immunologie et histocompatibilité,

Hôpital Saint-Louis

Président de la Société Francophone d'histocompatibilité et d'Immunogénétique.

Je te remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse, et de l'intérêt que tu as porté à ce travail dès sa première ébauche il y a déjà deux ans. Merci pour la confiance que tu m'accordes dans l'élaboration des passionnants projets actuels et futurs.

Monsieur le Professeur Romuald MENTAVERRI

Professeur des Universités (Pharmacie)

Service de Biochimie, CHU Amiens

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens également à souligner que vous faites partie des enseignants qui, dès la PACES, m'ont donné envie de faire de la biologie.

Madame le Docteur Macha NIKOLSKI

Directrice de Recherche, CNRS

Directrice du Centre de Bioinformatique de Bordeaux.

Merci beaucoup d'avoir accepté mon invitation et d'apporter ton expertise dans l'évaluation de ce travail. J'ai beaucoup appris au CBiB, et de nombreux aspects de ce projet n'auraient pas pu exister sans cette expérience.

Au Directeur de Thèse :

Monsieur le Docteur Nicolas GUILLAUME

Maître de conférence Université-Patricien Hospitalier

Responsable du service d'Histocompatibilité, CHU Amiens.

Merci de m'avoir transmis ta passion du HLA, cette science obscure et pleine de défis à surmonter. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de ce travail, de m'avoir laissé explorer pendant des mois toutes ces interactions complexes mais fascinantes. Merci d'avoir encadré toutes les étapes de ce projet, des balbutiements aux publications, en passant par l'écriture de ce manuscrit.

Aux collaborateurs du projet HLA Graph :

Merci au Docteur **Judith Desoutter** pour ton aide précieuse dans l'écriture de ce manuscrit et publications associées. Merci de m'avoir aidé à corriger les très nombreuses fautes d'orthographe, et surtout d'avoir toléré plusieurs mois de nuisances sonores dans ton bureau (avec des crayons qui tombent tous les 5 minutes).

Merci aux **Docteur Isabelle TOP** (CHU Lille), **Valérie DUBOIS** (EFS Lyon), et **Dominique MASSON** (EFS Grenoble) pour le partage des données de "Single Antigen" m'ayant permis de mener à bien ce projet.

Merci au Docteur **Marilyn MARRARI** (Université de Pittsburgh) de m'avoir transmis les autorisations d'utilisation de la base de données Epitope Registry.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Edgar LEFEVRE**, qui m'a appris à construire un projet informatique digne de ce nom. Merci pour les conseils sur la gestion d'un Git et au sujet des librairies à utiliser. Et surtout, un grand merci pour les quelques lignes de JavaScript (quel langage étrange).

Aux équipes du CBH :

Merci à toutes les techniciennes du service - **Véronique, Anne, Sylvie, Carole, Ségolène et Cécilia** - pour leur bienveillance et leur bonne humeur au quotidien. Je ne sais pas comment j'aurais pu écrire cette thèse sans tous ces bons moments passés en pause café. Finalement, peut-être qu'après ça je vous confierai mes secrets. Merci aux dinosaures qui dégagent les équivalents sérologiques et les splits d'antigènes plus vite que Google.

Je tiens également à remercier tous les biologistes et techniciens qui ont investi du temps et de l'énergie dans notre formation tout au long de l'internat.

A mes amis,

L'ordre d'apparition est arbitraire et ne représente en aucun cas l'ordre de mes préférences personnelles

A **Samy**, sans qui j'aurais sans doute jamais tapé une ligne de code. Merci pour nos discussions spirituelo-existentielles captivantes.

A **Valentine**, qui m'a supporté en tant que collègue, colocataire et ami. Belle prouesse.

A **Elodie**, pour sa beauté pas tout à fait préraphaélite mais presque. Présente depuis le jour d'accueil des nouveaux internes, tu auras été un véritable mentor, je dirais même plus, un phare dans la nuit.

A **Valentin**, pour notre complicité évidente en terme de choix professionnel (from PACES to doctor). Tu n'étais quand même pas obligé de tout copier.

A **Mathilde**, qui réussit l'exploit d'être à la fois la personne la plus sérieuse et la plus drôle de mon entourage.

A **Julie**, pour notre complicité évidente en terme capillaire. La boucle est bouclée.

A **Arthur** et **Ben**, pour notre complicité évidente en terme de pratique récréative. Tel le Rohan qui répond aux appels à l'aide du Gondor, merci de toujours répondre présent.

A **Romain**, le seul qui parle à la fois le Python et le HLA. Nos discussions sont une grande source d'inspiration pour les algorithmes du futur.

A **Claire-Lise**, pour ta relecture attentive du manuscrit, les fous rires quotidiens, et tes consultations gratuites.

A **Baptiste**, mon co-interne préféré toutes catégories confondues.

A **Mathieu Sage** (le nom et le prénom sont indissociables), mon co-interne clinicien préféré toutes catégories confondues.

A **Laurine, Sophie et Manon**, mes co-internes préférées toutes catégories confondues (ex-aequo).

A **Ornella**, pour toutes les touches de poésie que tu as subtilement distillées dans ma vie, en dépit de circonstances parfois peu ragoûtantes.

A **Krakinou**, pour ton soutien et ta tendresse.

Merci à tous les copains du Master et du Cbib, **Thomas, Riwan, Pierre, Lilian, Victor, Claire, Manu**, et **Elodie** sans qui mon initiation à la bio-informatique eût été bien plus fastidieuse.

Merci à tous les autres collègues qui ont accompagné ces quatre années d'internat : **Dorian, Alan, Alexis, Claire, Geoffrey, Julien, Justine, Brahim, Camille, Quentin, Arnaud et Sarah, les pious, Thomas, Morgane, Mehdi, Stacy**, et j'en oublie certainement. L'ambiance a toujours été excellente au CBH, et ça a toujours été un plaisir de venir y travailler. Merci pour les grandes tablées à l'internat le midi, les soirées, et pour l'entraide bienveillante au quotidien. J'aurais aimé écrire un mot pour chacun d'entre vous, mais il est évident que j'en ai déjà beaucoup trop fait.

Et bien sûr, merci aux amis qui me sortent de l'hôpital depuis des années : **David, Théo, JB et Jolan** pour les voyages épiques (et vidéo-ludique) aux quatre coins des contrées les plus fantastiques.

A ma famille,

A mes parents, qui m'ont apporté tout ce dont un sale gosse pouvait avoir besoin pour s'épanouir. A mon père qui m'a transmis la passion des sciences et à ma mère, qui m'a de toute évidence transmis sa rigueur en matière de grammaire et d'orthographe.

A mon frère Benjamin, qui en dépit des apparences, est sans aucun doute le plus grand génie de la famille. A ma soeur Laurine, que je n'aurais malheureusement pas réussi à convertir

à cette noble discipline qu'est la biologie médicale, mais grâce à qui nous aurons finalement un vrai médecin dans la famille.

A mes grand-parents, qui alors même que j'étais déjà pourri-gâté, n'ont jamais hésité à en rajouter une couche. Merci pour ces repas, voyages, cadeaux, et repas.

A tous mes oncles, tantes, cousins, cousines, parrain et marraine, qui se reconnaîtront, pour toutes leurs attentions depuis bientôt trente ans.

Table des matières

Remerciements	i
1 Introduction	1
1.1 Généralités	1
1.1.1 Découverte du Complexe Majeur d’Histocompatibilité	1
1.1.2 Génétique et structure	2
Les molécules de classe I	2
Les molécules de classe II	3
1.1.3 Fonctions biologiques	3
La voie de la présentation endogène	4
La voie de la présentation exogène	5
Autres modes de présentation	6
En oncologie	7
Rôle du CMH dans la maturation thymique des lymphocytes T	7
1.1.4 Variabilité et polymorphisme	8
1.1.5 Nomenclature	10
Nomenclature actuelle	10
Notion de groupes sérologiques	11
1.2 HLA et transplantation	12
1.2.1 Anticorps anti-HLA	12
1.2.2 Dépistage et identification des anticorps anti-HLA.	14
Avant transplantation	14
Après transplantation	15
Identification des anticorps anti-HLA par technique de cytométrie sur microbilles fluorescentes.	15

1.3	Epitopes partagés et réaction croisée.	16
1.3.1	Notion de groupe sérologique	16
1.3.2	Notion de groupe de réactivités croisées (CREG)	17
1.3.3	Notion d'Eplet	18
1.3.4	Appariement donneur-receveur : de l'antigène à l'épitope	19
1.4	Interprétation des profils d'anticorps anti-HLA	20
1.4.1	Généralités	20
1.4.2	HLA Matchmaker	21
1.4.3	Objectif de l'étude : Analyse des réactivités croisées et développement d'HLA Graph	22
2	Matériel et méthode	24
2.1	Recueil de données des tests Luminex™ LABScreen™	24
2.2	Analyse statistique	25
2.3	Conception des graphes de corrélations	25
2.4	Conception des figures	25
2.5	Bases des données "Epitope Registry"	25
2.6	Conception de l'outil HLA Graph	26
2.6.1	Architecture du projet HLA Graph	26
2.6.2	Développement d'une version adaptée au kit LifeCode™ (Immucor™)	26
3	Résultats	28
3.1	Graphes de corrélations	28
3.1.1	Graphe de corrélation HLA-A	29
3.1.2	Graphe de corrélation HLA-B	30
3.1.3	Graphe de corrélation HLA-C	30
3.1.4	Corrélation de Spearman et épitopes publics Bw4/Bw6	32
	Les épitopes Bw4 et Bw6 au sein du réseau HLA-A	32
	Les épitopes Bw4 et Bw6 au sein du réseau HLA-B	33
	Les épitopes Bw4 et Bw6 et le groupe HLA-B15	33
3.1.5	Réseaux de corrélation des anticorps de classe II	34
	Réseaux de corrélation HLA-DR	34
	Réseaux de corrélation HLA-DQ et HLA-DP	35

3.2	Spearman ρ et épitopes partagés	36
3.3	HLA Graph : un nouvel outil de matching épitopique	37
3.3.1	Utilisation et interprétation des résultats	37
	Format d'entrée	38
	Génération des graphes	38
	Analyse épitopique	38
	Réactivité dirigée contre la chaîne alpha ou bêta	39
	Tableaux résumés	39
3.3.2	HLA Graph : exemples d'utilisations	40
	HLA-DR et épitope 96HK	40
	HLA-DQ et épitopes 74EL-67VT	41
	HLA-DR et épitopes 70DA, 71A	42
4	Discussion	46
4.1	La corrélation des fluorescences reflète les réactions croisées des anticorps anti-HLA	46
4.2	HLA Graph : un nouvel outil de matching épitopique	48
4.3	Perspectives du modèle	49
5	Conclusion	51
6	Annexes	57
6.1	Publication originale - « Antibodies against HLA cross-reactivity groups : From single antigen bead assay to immunoinformatics interpretation of epitopes »	57
	Résumé et Abstract	67

Chapitre 1

Introduction

1.1 Généralités

1.1.1 Découverte du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

C'est dans un article publié en 1958 que Jean Dausset confirme l'existence de « groupes leucocytaires ». Alors que les groupes ABO et Rhésus sont déjà décrits, il identifie chez les patients polytransfusés des anticorps agglutinant les leucocytes, mais pas les érythrocytes. Tentant d'établir un premier système de groupe leucocytaire, il ne parvient pas à identifier d'antigène « très nettement plus antigénique que les autres », et comprend alors que la formule antigénique des leucocytes humains est héréditaire et « d'une extrême complexité ». Afin d'éviter de nombreux chocs transfusionnels, il propose l'utilisation de sang appauvri en leucocytes. Il suggère en fin d'article que « dans un avenir plus lointain », l'étude des antigènes leucocytaires pourrait avoir une grande importance pour les greffes tissulaires. [1]

En effet, la notion d'antigène responsable de rejet avait déjà été décrite en 1936 par Gorer lors d'expériences de transplantation chez la souris. Il collabora avec Snell pour décrire l'antigène II, contrôlé par un seul gène autosomal dominant. Ce gène fut appelé gène d'histocompatibilité 2 ou H2, puis se révéla être un système de gènes plus complexe, comportant plusieurs loci, dont la description fut largement étoffée dans les décennies qui suivirent. [2][3][4].

Jean Dausset dut alors prouver que, comme le système H2, les antigènes leucocytaires humains déterminaient l'avenir des greffes. Étudiant les patients greffés rénaux, il démontra que la survie des greffon était corrélée au nombre d'incompatibilités dans ce système, renommé entre-temps HLA (Human Leucocyte Antigen); les meilleures survies étaient obtenues lorsque le donneur et le receveur étaient apparentés. [5][6].

La description détaillée du système HLA a des conséquences importantes en biologie fondamentale et en thérapeutique qui seront détaillées dans la suite de ce chapitre.

1.1.2 Génétique et structure

Le système HLA, ou complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) en français, est un complexe de gènes présent sur une portion du bras court du chromosome 6 chez l'être humain, codant pour un ensemble de protéines s'exprimant à la surface des cellules et impliqué dans la régulation du système immunitaire.

Les gènes et protéines du CMH sont réparties en deux classes principales, I et II, qui diffèrent par leurs propriétés biochimiques et leurs fonctions :

- Les protéines de classe I sont des glycoprotéines retrouvées à la surface de la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme.
- Les protéines de classe II sont principalement exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes.

On parle de HLA de classe III pour désigner l'ensemble des autres gènes localisé sur cette même région du bras court du chromosome 6. Ces gènes codent notamment pour des facteurs de signalisation ou des protéines du complément.

Les molécules de classe I

Les molécules de classe I sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une chaîne lourde associée à une chaîne légère, la β 2-microglobuline (β 2m, Fig 1.1). Les gènes de classe I comportent 8 exons et 7 introns. Les exons 2, 3 et 4 codent les 3 domaines extramembranaires de la chaîne lourde. Ces derniers appartiennent à la partie fonctionnelle de la protéine que nous étudierons tout particulièrement. Le gène de la β 2m (6,7 Kb) comporte 4 exons et 3 introns. La majorité du domaine unique de la β 2m correspond au deuxième exon. Chez l'homme, ce gène est situé en dehors du système HLA, sur le chromosome 15.

Il existe trois principaux gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C dits "classiques". De nombreux autres gènes de classe I ont été identifiés, exprimés en plus faible quantité et/ou seulement dans certains tissus.

L'expression de ces gènes est importante pour les cellules lymphoïdes, macrophagiques, dendritiques et épithéliales. Ils ne sont pas ou très faiblement exprimés par les érythrocytes, les hépatocytes et les spermatozoïdes. Ils sont également exprimés par les plaquettes.

Les molécules de classe II

La molécule de classe II est un hétérodimère composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Chaque chaîne comporte deux domaines extra-membranaires et est codée par 5 ou 6 exons. Les exons 2 et 3 correspondent aux 2 domaines extra-membranaires des chaînes polypeptidiques. Le HLA de classe II est représenté par trois complexes protéiques principaux : HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP.

Leurs chaînes α et β respectives sont codées par des gènes distincts. Ainsi les gènes DRA et DRB1 codent pour les chaînes α et β de la molécule HLA-DR. Il en est de même pour les gènes DQA1 et DQB1, codant pour l'association α/β de la molécule DQ, et pour les gènes DPA1 et DPB1 codant pour l'association α/β du DP.

Trois autres gènes peuvent coder pour la chaîne β du HLA-DR : DRB3, DRB4 et DRB5. Ces gènes ne sont présents qu'au sein de certains haplotypes et ne sont donc pas systématiquement exprimés par tous les individus. Ces gènes DR dit associés (ou "second DR") sont quantitativement moins représentés à la surface des cellules que le DRB1.

Le CMH II est exprimé par les lymphocytes B, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales thymiques et certaines cellules épithéliales. Son expression peut également être induite par des cytokines pro-inflammatoires à la surface des lymphocytes T.

1.1.3 Fonctions biologiques

La fonction première de l'ensemble des molécules du HLA I et II est la présentation de peptides aux lymphocytes T CD4+ et T CD8+. En effet, les domaines extra-membranaires

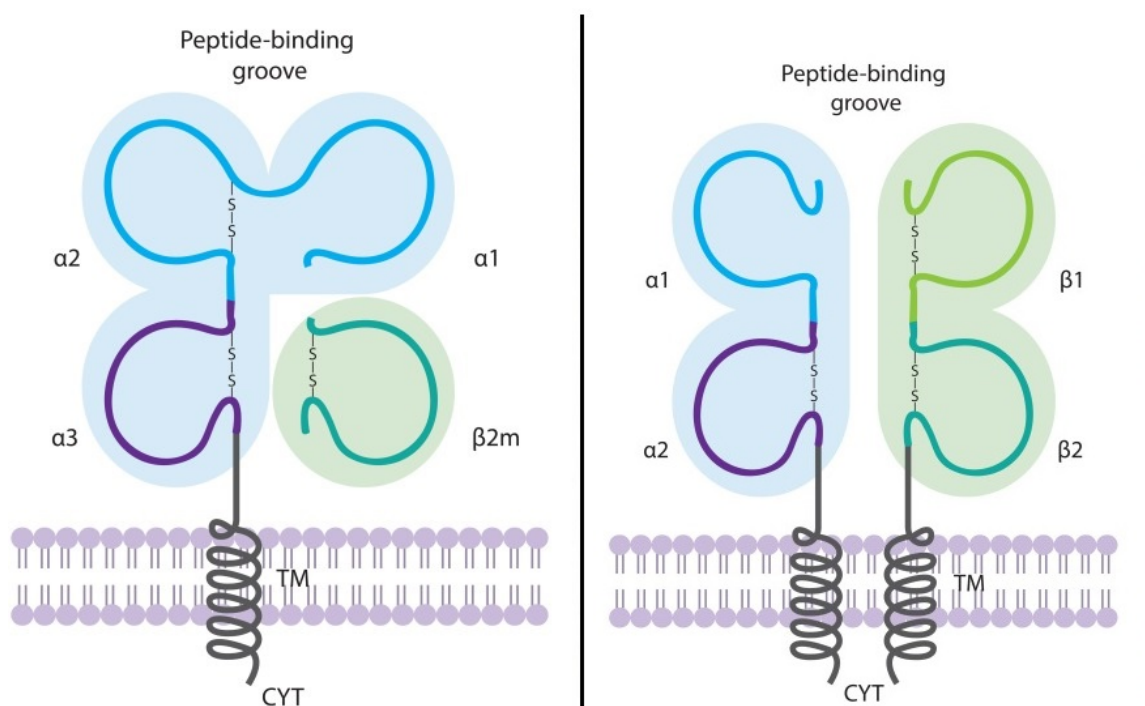


Figure 1.1: Structure schématique des CMH de classe I et II [7]

distaux délimitent un sillon médian dans lequel peut s'enchaîner un peptide. Ce sillon représente la partie fonctionnelle de la protéine. Les modalités de cette présentation varient entre la classe I et la classe II. Nous allons ici détailler les mécanismes classiquement décrits.

La voie de la présentation endogène

Les molécules de classe I interagissent avec les lymphocytes T CD8⁺ en présentant aux récepteurs T (TCR) des peptides dérivés de protéines synthétisées dans la cellule et dégradées en peptides dans le cytosol. Ces peptides sont le plus souvent dégradés par le protéasome et sont conduits dans la lumière du réticulum endoplasmique par des transporteurs membranaires (TAP1, TAP2). Ils s'associent aux CMH I en cours de maturation au sein du sillon formé de l'espace entre ses deux domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, ou site de liaison peptidique. Le complexe CMH-peptide est ensuite exporté et exposé à la surface de la cellule.

Des expériences d'éluions des peptides révèlent que les peptides liés au CMH I sont presque toujours des nonamères associés par des liaisons hydrogènes aux extrémités du sillon. L'immense majorité des peptides exposés est représentée par des peptides du soi, c'est à dire dérivés du propre génome de la cellule. En cas d'infection de la cellule (virale ou parasitaire par exemple), des peptides dérivés de l'agent infectieux sont exposés à sa surface (Fig. 1.2).

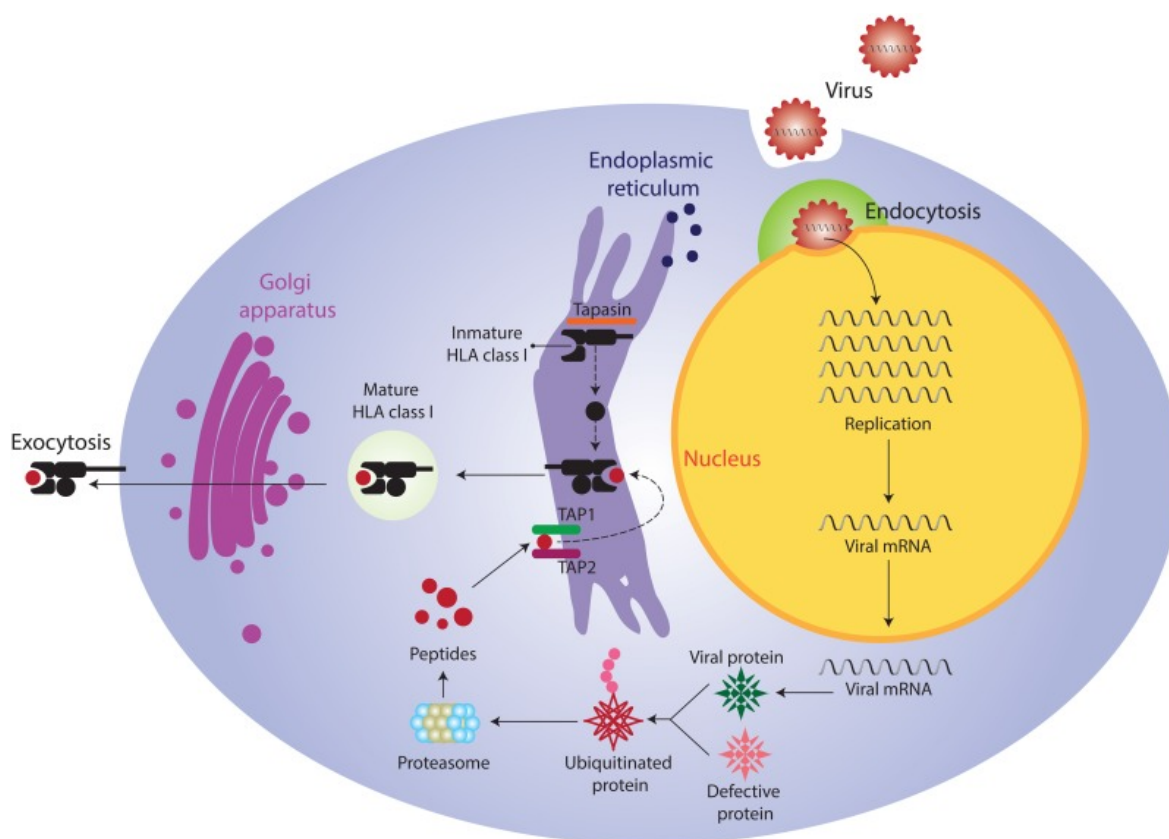


Figure 1.2: Voie de présentation endogène du CMH [7]

La reconnaissance spécifique du complexe CMH-peptide par un lymphocyte T CD8⁺ circulant provoque son activation. La molécule CD8 reconnaît un site spécifique du domaine $\alpha 3$ du CMH I. Des signaux de co-stimulation sont nécessaires à l'activation complète du lymphocyte qui devient cytotoxique (liaisons CD28/CD80, CD40/CD40L ou OX40/OX40L). L'ensemble de ces interactions conduit à la destruction de la cellule infectée par l'induction de signaux apoptotiques et la libération de perforines.

La voie de la présentation exogène

Les molécules du CMH II présentent majoritairement des peptides dérivés de protéines extra-cellulaires introduites dans la cellule présentatrice d'antigène par voie endosomale. Classiquement, les protéines extracellulaires sont endocytées par phagocytose et digérées en peptides dans le lysosome par un arsenal d'hydrolases. En parallèle, les molécules de classe II, assemblées par le réticulum endoplasmique, sont conduites aux vésicules d'endocytose via l'appareil de Golgi. Les peptides exogènes s'enchâssent au sein du site de liaison peptidique du CMH, constitué du sillon à cheval entre les domaines distaux des chaînes α et β .

Les peptides liés sont généralement constitués de 13 à 17 résidus (Fig. 1.3).

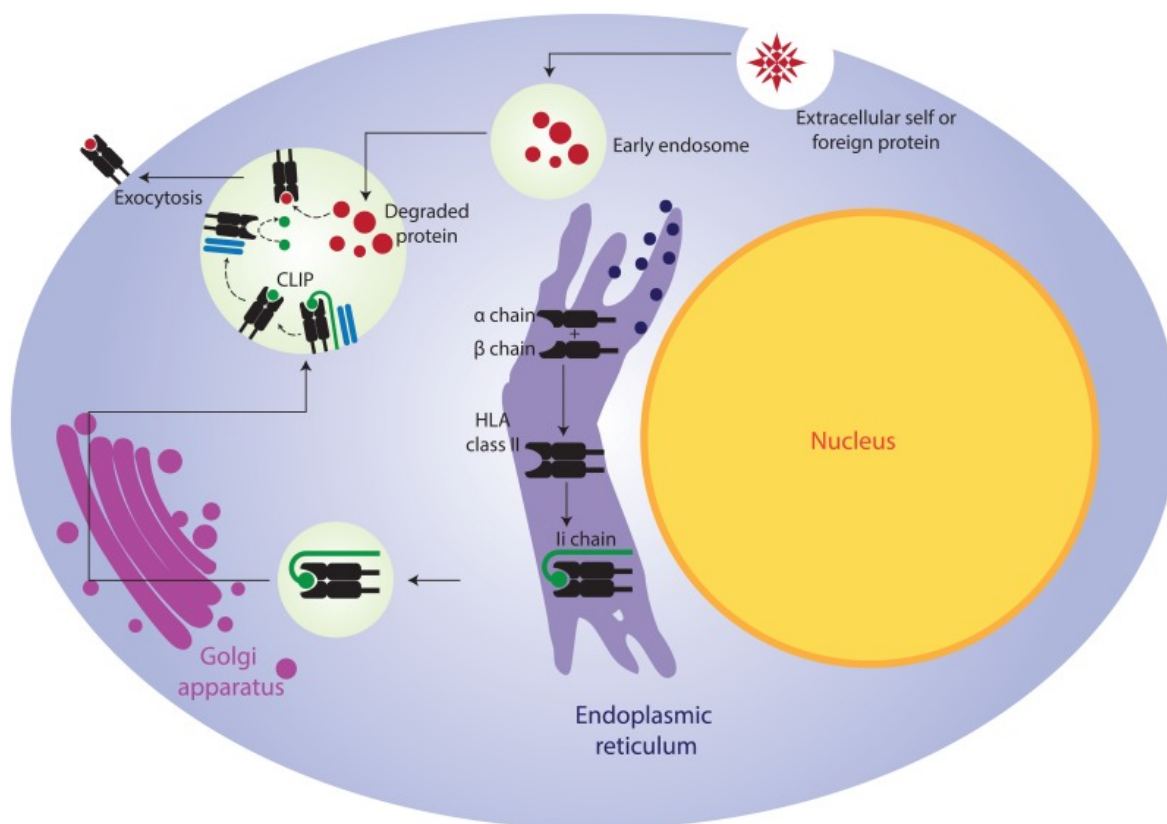


Figure 1.3: Voie de présentation exogène du CMH [7]

Le complexe CMH-II-peptide est ensuite conduit à la surface de la cellule. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont scannées par les lymphocytes T CD4⁺ naïfs jusqu'à reconnaissance spécifique du fragment antigénique par le TCR. La formation d'un complexe CMH-II-peptide-TCR entraînera la formation d'une synapse immunologique activatrice :

- Liaison entre le CD4 et le domaine $\beta 2$ du CMH-II
- Signaux de co-stimulation : liaison CD28/CD80, CD40/CD40-ligand

L'activation du lymphocyte T CD4⁺ provoque sa prolifération et sa différenciation, dépendant des interleukines produites par la CPA (lymphocytes T auxiliaires Th1, Th2 ou Th17).

Autres modes de présentation

Les deux modes de présentation antigénique décrits ci-dessus sont les plus classiquement décrits, constituant des piliers fondamentaux de l'immunologie. Toutefois, d'autres modes de présentation ont été mis en évidence. Notamment, il est aujourd'hui bien établi que les cellules

dendritiques peuvent présenter des antigènes exogènes via le CMH I (voie de la présentation croisée) [8].

En oncologie

Les mutations développées par les tumeurs entraînent la synthèse de peptides mutés potentiellement reconnus par les lymphocytes T qui participent à la lutte anti-tumorale. L'étude de l'affinité entre le CMH et ces néo-peptides constitue un sujet de recherche actif en onco-immunologie. Les dysrégulations de l'expression du CMH par les cellules cancéreuses constituent l'un des principaux mécanismes d'échappement au système immunitaire [9]. L'injection de peptides HLA spécifiques en tant que vaccin anti-cancéreux fait l'objet de nombreux essais cliniques [10][11][12].

Rôle du CMH dans la maturation thymique des lymphocytes T

Les molécules du CMH jouent un rôle très important dans la constitution du répertoire de lymphocytes T d'un individu. Les progéniteurs lymphoïdes colonisent le thymus dès l'embryogénèse pour y amorcer leur maturation. Les cellules T se multiplient et génèrent par ré-arrangement aléatoire de leurs gènes une très grande variété de TCR. Les cellules sont alors sélectionnées en fonction de la spécificité du TCR [13].

Tout au long de leur maturation, les lymphocytes traversent le thymus de la zone corticale vers la médullaire. Au cours de ce transit, ils interagissent avec les cellules épithéliales thymiques qui expriment fortement des molécules du CMH I et II porteurs des peptides du soi.

Au niveau du cortex thymique, les lymphocytes reçoivent un signal de survie s'ils lient le complexe CMH-peptide. On parle de sélection positive. Les cellules capables de se lier au CMH I se différencieront préférentiellement en CD8+, alors que les cellules se liant au CMH II se différencieront en CD4+.

Au niveau médullaire, en revanche, les cellules survivantes vont recevoir des signaux d'apoptose en cas d'interaction forte avec le complexe CMH-peptide. On parle de sélection négative.

Les lymphocytes conservés sont donc capables de se lier au complexe CMH-peptide mais présentent une faible affinité pour les peptides du soi. Cette double sélection permet d'acquies un répertoire de lymphocyte T circulant fonctionnel mais tolérant vis-à-vis du soi.

Au total, une réponse immunitaire n'est possible que lorsque qu'un peptide immunogène est présenté par l'une des protéines du CMH, et que le répertoire T comporte un TCR capable de reconnaître le complexe CMH-peptide ainsi formé.

1.1.4 Variabilité et polymorphisme

Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines du CMH forment le socle de la présentation des peptides au système immunitaire. Toutefois, chaque protéine du CMH ne peut lier qu'un répertoire restreint de peptides à un répertoire T lui même restreint. Afin de permettre la réponse immunitaire la plus complète possible, le CMH doit être capable de présenter la collection de peptides la plus hétérogène possible.

La très grande diversité du répertoire présentable est déterminé par l'émergence, au cours de l'évolution, d'un très grand polymorphisme des gènes du CMH. En effet, on compte chez l'Homme des centaines d'allèles de classe I et de classe II. Cette variabilité n'est pas homogène tout au long de la séquence. Les domaines transmembranaire, intracellulaire et le troisième domaine extra-cellulaire en classe I (qui lie le CD8) sont très conservés et ne diffèrent que par un nombre restreint de substitutions ponctuelles. L'essentiel du polymorphisme se situe au niveau des domaines extra-membranaires distaux constituant le site de liaison peptidique. Le nombre de variations entre les séquences peut être très élevé et, pour une position donnée, on peut trouver plus de 10 acides aminés alternatifs. La table 1.1 récapitule l'ensemble des allèles aujourd'hui déclarés en septembre 2021 (Immuno-polymorphism database IMGT/HLA [14]).

Pour les CMH du DQ et du DP, ce polymorphisme est décuplé par la combinatoire des associations α/β . En effet, on parle de recombinaison *cis* lorsque les chaînes α et β sont transcrites par le même chromosome, et de recombinaison *trans* lorsque les chaînes α/β sont issues de deux chromosomes différents.

Ce phénomène n'est pas observé pour le HLA-DR car le gène DRA codant pour la chaîne α du DR est monomorphe au sein de l'espèce humaine. Toutefois, la chaîne β du HLA-DR peut être transcrite par les gènes DRB associés (DRB3, DRB4, DRB5) s'exprimant par

certains haplotypes, et permettant d'étendre le répertoire de peptides présentés.

Gènes	A	B	C	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
Allèles	6921	8181	6779	3801	343	2033	988	1862
Protéines	4156	5090	3927	2620	172	1324	135	1180

Table 1.1: Polymorphisme des allèles du CMH de classe I et de classe II

Cette base de données est régulièrement mise à jour. En effet, l'apparition constante de nouvelles techniques de génotypage au cours des trente dernières années a permis l'accélération du nombre d'allèles découverts. Aujourd'hui, les techniques de séquençage à haut débit largement utilisées par les laboratoires d'histocompatibilité permettent le séquençage rapide de l'ensemble des gènes du CMH d'un même individu. Ainsi, la cadence de découverte de nouveaux allèles n'a jamais été aussi importante au cours de l'histoire du HLA 1.4.

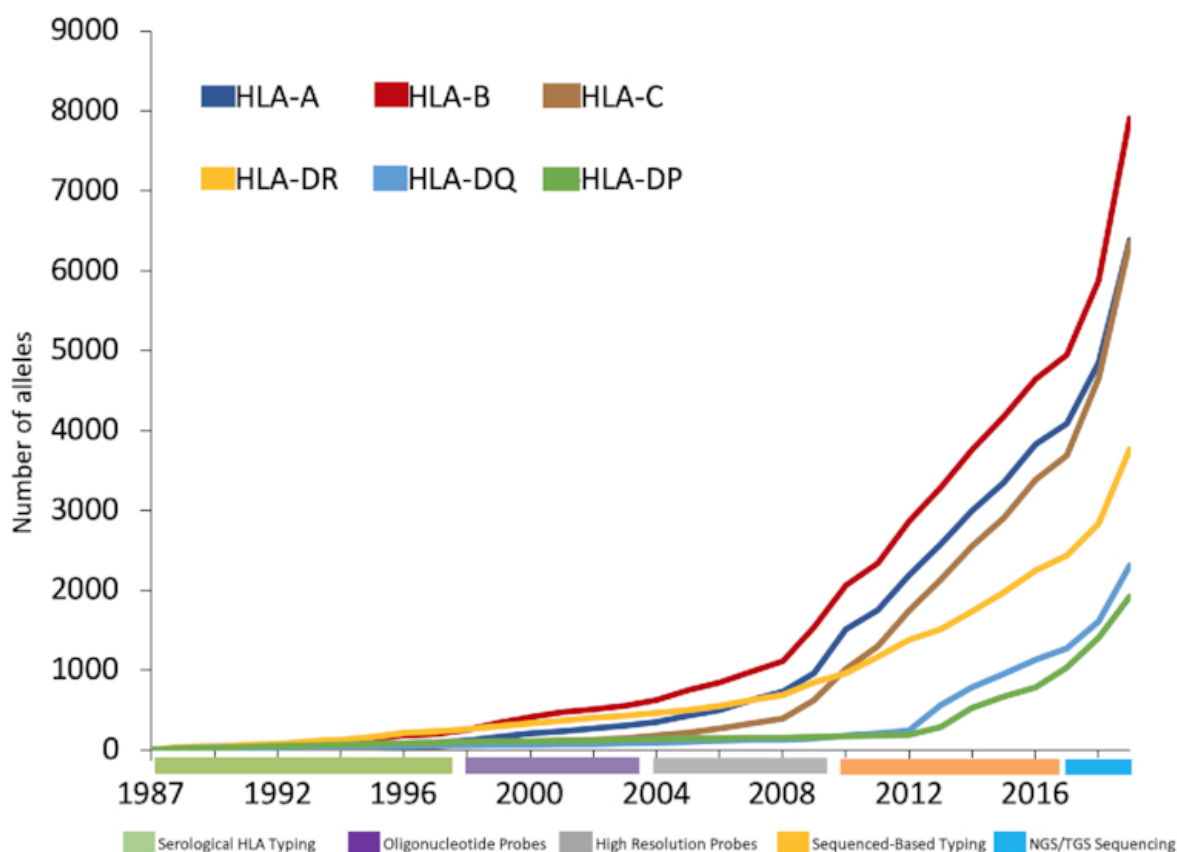


Figure 1.4: Nombre total d'allèles découverts par locus en fonction du temps. L'évolution des nouvelles techniques de génotypage est exposée en abscisse.

[14]

Au total, un humain hétérozygote peut synthétiser jusqu'à 18 CMH différents :

— 2 molécules HLA-A, 2 HLA-B, 2 HLA-C

- 4 molécules HLA-DQ et 4 molécules HLA-DP, correspondant aux associations α/β cis et trans.
- 4 molécules HLA-DR dont les chaînes bêta peuvent être codées par les allèles du DRB1, auxquelles on peut ajouter les chaînes codées par les gènes DRB3, DRB4 ou DRB5.

D'une part, la multiplication des molécules présentatrices permet une réponse immunitaire très complète à l'échelle d'un individu. D'autre part, le très grand polymorphisme du HLA induit une variabilité importante des réponses immunitaires des individus d'une même espèce. Cette diversité génétique facilite la survie des espèces à l'échelle de l'évolution, en permettant aux populations de répondre et de s'adapter à la présence des agents infectieux. En effet, l'émergence d'un allèle HLA procurant un avantage évolutif contre une infection donnée a déjà été décrite. C'est le cas par exemple du HLA-B*46:01, qui aurait émergé en Asie du Sud-Est il y a 50 000 ans: cet allèle liant un grand nombre de peptides dérivés de *Mycobacterium leprae* procure un avantage évolutif contre la lèpre. [15]. Aujourd'hui, cet allèle est particulièrement fréquent dans cette région où la lèpre est endémique.

La répartition des allèles n'est pas géographiquement homogène, et dépend de processus de sélection Darwinienne complexes. La base de données "Allele Frequency Database" recense les typages d'un grand nombre d'individus par origine géographique. Malgré le polymorphisme précédemment décrit, certains allèles peuvent être portés par plus de 20% des individus d'une même population (Ex : A*02:01 en Europe, A*11:01 au Vietnam) [16].

1.1.5 Nomenclature

Nomenclature actuelle

Afin de pouvoir désigner la grande variabilité des allèles du HLA, des règles de nomenclature ont été établies. On utilise d'abord le préfixe "HLA", suivie du locus désigné. Chaque nom d'allèle consiste en un numéro unique correspondant à quatre séries de chiffres (ou "digits") séparés par deux points. Les deux premiers digits correspondent au groupe allélique, qui est le plus souvent lié à la réactivité sérologique (à propos de laquelle nous reviendrons ultérieurement). Les deux digits suivants correspondent à une protéine spécifique au sein d'un même sous-groupe allélique, les numéros étant attribués par ordre de découverte. Le

troisième digit concerne les variants synonymes des régions codantes et le dernier correspond à des mutations des régions non traduites (5'UTR, 3'UTR et intronique). Un suffixe facultatif peut être ajouté pour indiquer son niveau d'expression. Ainsi, les allèles dont il a été démontré qu'ils ne sont pas exprimés reçoivent le suffixe "N", alors que le suffixe "L" indique un niveau d'expression faible (fig. 1.5).

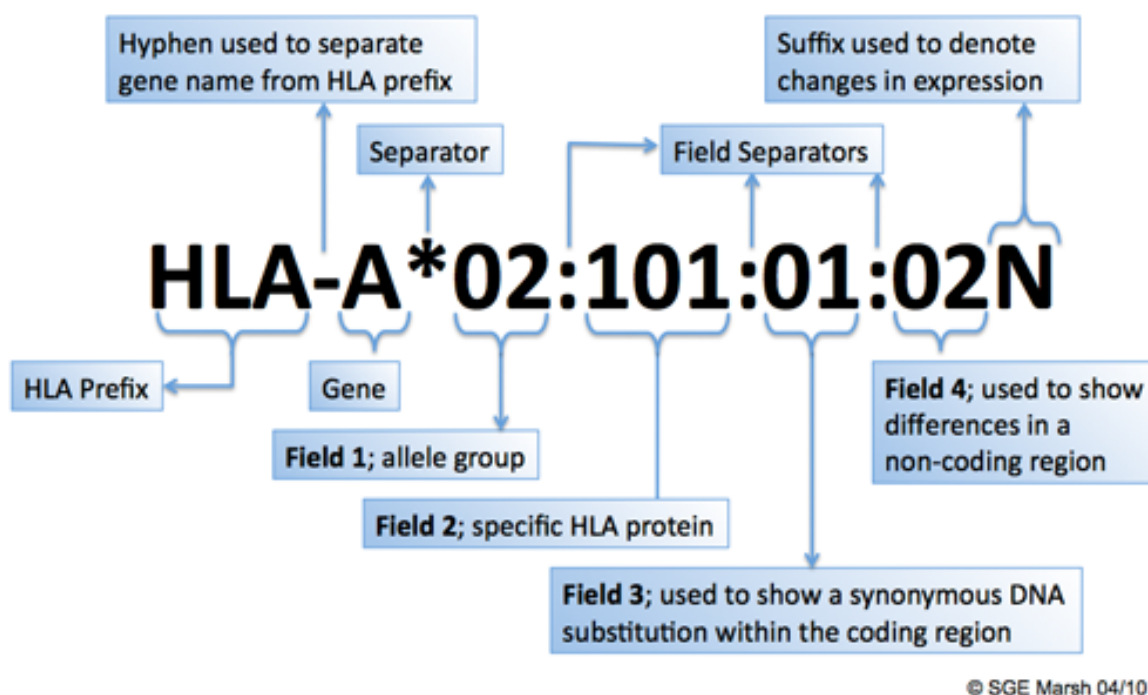


Figure 1.5: Nomenclature du HLA

Notion de groupes sérologiques

Afin de mieux comprendre la notion de réactions croisées dans le système HLA que nous avons développée au cours de ce travail, nous devons aborder les notions de groupe de réaction croisée (Cross-reactivity group ou CREG) et de groupe sérologique.

Avant l'avènement des techniques de biologie moléculaire, l'identification des différentes molécules du CMH était indirecte, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les cellules à typer. Historiquement, la discrimination de certaines molécules était peu résolutive ; un même anticorps pouvant se fixer sur deux molécules dont les séquences d'acides aminés sont proches mais pas strictement identiques. De tels typages, dits "sérologiques", ont admis des antigènes différents au sein d'un même sous-groupe. Deux molécules de CMH différentes mais admises dans un même groupe sérologique partagent donc un ou plusieurs épitopes en

commun : c'est à dire une cible commune au paratope de l'anticorps utilisé lors de l'identification.

Avec l'amélioration de la spécificité des anticorps utilisés, différents antigènes ont pu être identifiés au sein d'un même "super-groupe" sérologique, également appelé antigène public ou "broad antigen" en anglais. Les premiers groupes sérologiques ont ainsi été divisés en différents sous-groupes d'antigènes. Par exemple, les premiers anticorps anti-HLA-DR2 reconnaissent le produit des gènes DRB1*15 et DRB1*16, qui furent identifiés par la suite avec l'utilisation d'anticorps plus spécifiques. HLA-DR15 et HLA-DR16 appartiennent aujourd'hui au même "super-groupe" HLA-DR2. On peut également citer l'exemple du HLA-DQ3, qui comporte les antigènes HLA-DQ7, -DQ8 et -DQ9 (Fig. 1.6).

A partir de la fin des années 90, les premiers typages par techniques de biologie moléculaire ont permis d'affiner la classification du HLA, et de distinguer les différents allèles à l'échelle nucléotidique. Des sous groupes d'allèles ont été identifiés au sein d'un même groupe sérologique. Enfin, le séquençage complet des gènes, rendu accessible en routine, a permis l'identification des variants introniques et permet l'utilisation de la nomenclature "8 digits".

Cette hiérarchisation en sous-groupe, étroitement liée à l'histoire du HLA et de l'optimisation de ses techniques, complexifie la nomenclature. Toutefois, elle permet de rassembler sous une même entité antigénique des protéines affiliées phylogénétiquement. Nous le verrons, ces descriptions sérologiques sont largement utilisées en pratique courante pour décrire des profils d'immunisation anti-HLA.

1.2 HLA et transplantation

1.2.1 Anticorps anti-HLA

Le développement d'anticorps dirigés contre des molécules HLA allogéniques (d'un individu différent), peut se produire dans plusieurs circonstances. Lors d'une grossesse, les femmes sont exposées aux antigènes transmis par l'haplotype du père et peuvent développer des anticorps anti-HLA [17]. Des anticorps peuvent également être développés au cours de transfusions sanguines non HLA identiques, en particulier lors des transfusions de plaquettes qui expriment le CMH I [18].

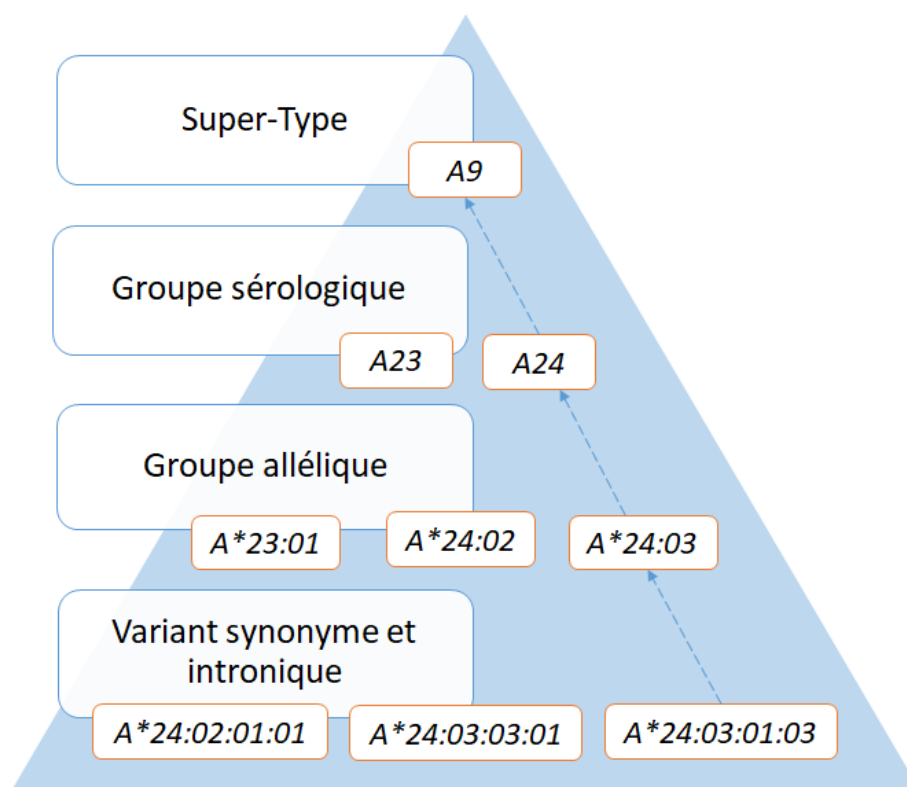


Figure 1.6: Représentation pyramidale de la nomenclature du HLA. Les premiers typages sérologiques regroupent un ensemble de protéines affiliées, identifiables en améliorant la résolution des typages HLA. Ainsi, l'allèle A*24:02:01:03 code pour un antigène du groupe sérologique A24 (A9).

Bien que jouant un rôle central au coeur du système immunitaire, la complexité du système HLA constitue un obstacle important en transplantation d'organe. Son extrême polymorphisme, ainsi que son expression quantitativement élevée sur de nombreux tissus provoquent chez le receveur la reconnaissance des molécules HLA exprimées par le greffon et entraînent l'activation du système immunitaire.

Avant la greffe, la présence chez le receveur de l'organe d'anticorps dirigés contre des épitopes présents sur les cellules endothéliales de l'organe greffé conduit au rejet hyperaigu pouvant se manifester très rapidement, au cours même de l'intervention chirurgicale [19]. Après la greffe, les lymphocytes T du receveur reconnaissent les antigènes du donneur. Ils s'activent, prolifèrent et infiltrent le greffon, conduisant systématiquement au rejet cellulaire aigu en l'absence de traitements immunosuppresseurs.

Plus tardivement, le rejet chronique humoral (Antibody Mediated Rejection, AMR) est médié par l'apparition d'anticorps anti-HLA dirigés spécifiquement contre le donneur (Donor

Specific Antibody, DSA) [20]. Évoluant le plus souvent à bas bruit, la fixation des anticorps sur les cellules endothéliales, notamment, induit le recrutement de cellules inflammatoires et cytotoxiques, ainsi que l'activation du complément. Les lésions endothéliales conduisent peu à peu à des dommages ischémiques de l'organe transplanté et à sa perte de fonction.

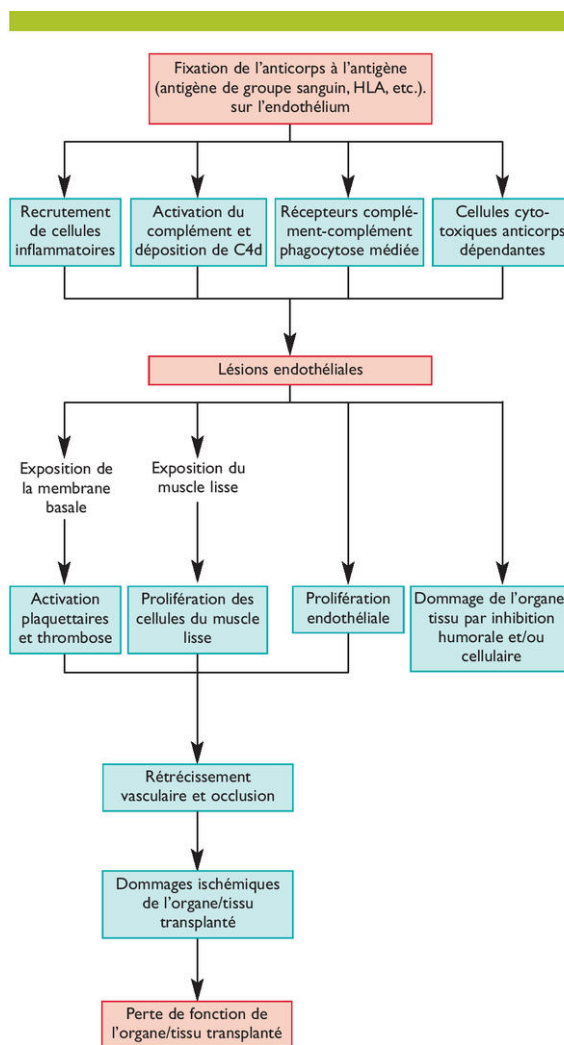


Figure 1.7: Mécanisme du rejet médié par les anticorps (AMR) [20]

1.2.2 Dépistage et identification des anticorps anti-HLA.

Avant transplantation

L'identification des anticorps dirigés contre les différentes molécules du HLA est essentielle en transplantation [21]. En premier lieu, on réalise ainsi chez les patients en attente de greffe une identification des anticorps anti-HLA afin d'interdire l'ensemble des antigènes

contre lesquels ces derniers ont développé des anticorps. Cette recherche sera répétée tous les 3 à 6 mois ou après tout évènement immunisant afin d'anticiper l'apparition de nouveaux anticorps. Les antigènes permis et interdits sont enregistrés pour chaque patient en attente dans une base de données nationale (CRISTAL) afin d'optimiser l'attribution des nouveaux greffons. On s'assure, avant transplantation, que l'ensemble des anticorps anti-HLA du receveur n'est pas dirigé contre un donneur potentiel. On parle de crossmatch virtuel. Cette analyse est essentielle pour prévenir le rejet hyperaigu.

Après transplantation

Après transplantation, la recherche d'anticorps anti-HLA permet de suivre l'apparition de DSA et prévenir les rejets. Cette recherche sera réalisée à des temps définis (J0 de la greffe, M+3 ou M+4, M+12 puis annuellement) et en cas de suspicion de rejet. Le biologiste doit confronter le typage HLA du donneur et la spécificité des anticorps identifiés. En cas d'apparition de DSA, on pourra adapter les traitements immunosuppresseurs ou réaliser des échanges plasmatiques. Le titre des DSA identifiés peut alors faire l'objet d'un suivi rapproché afin d'en établir la cinétique.

Identification des anticorps anti-HLA par technique de cytométrie sur microbilles fluorescentes.

Historiquement, la première méthode de dépistage des anticorps anti-HLA était la lymphocytotoxicité dépendante du complément (LCT), qui testait directement la réactivité du sérum d'un patient contre un panel large de cellules exprimant des protéines du CMH connues. A partir du début des années 2000, l'identification et l'interprétation des anticorps anti-HLA ont été révolutionnées par les techniques de cytométrie sur microbilles fluorescentes (Luminex®).

Cette technique consiste en la mise en contact d'un sérum de patient avec des microsphères sur lesquelles sont fixés des antigènes HLA connus. Une solution d'anticorps anti-IgG humains fluorescents secondaire permettra la mesure de la concentration relative de complexe antigène-anticorps à la surface de chaque bille. Par détection laser, on attribue ainsi pour chaque antigène une valeur de fluorescence moyenne (Mean Fluorescence intensity, MFI). Ce test est semi-quantitatif : la MFI est relativement proportionnelle à la concentration des anticorps dans le sérum (Fig. 1.8). Un anticorps est considéré comme positif pour une MFI

supérieure à 500 ou 1000 selon les centres. Un antigène est considéré comme interdit en pré-greffe lorsque sa MFI est supérieure à 2000.

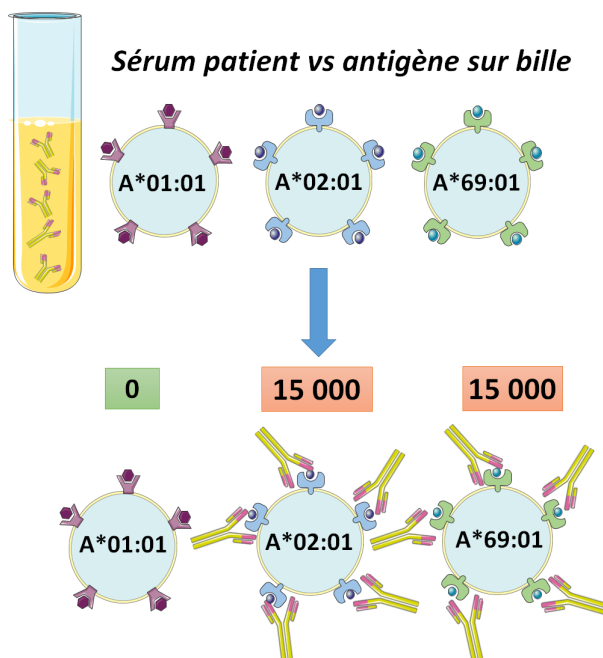


Figure 1.8: Mise en contact de microbilles fluorescentes fixées par des antigènes spécifiques avec le sérum à analyser. La fluorescence moyenne émise par l'anticorps secondaire permet de quantifier la concentration relative de chaque anticorps (MFI).

Au total, les tests Luminex™ "Single Antigen" (SA) comprennent près de 200 billes fixées par des antigènes différents, représentant les allèles du HLA les plus fréquents. Cette technique permet un monitoring sensible et spécifique et est la technique de référence utilisée par l'ensemble des laboratoires d'histocompatibilité depuis plus de 15 ans. Elle a considérablement amélioré l'attribution des greffons et la prise en charge de patients transplantés. Il existe deux kits "Single Antigen" principalement utilisés en France : les kits Labscreen™ (OneLambda™) et Lifecodes™ (Immucor™).

1.3 Epitopes partagés et réaction croisée.

1.3.1 Notion de groupe sérologique

Alors même que la structure tridimensionnelle n'est pas encore établie, on constate dès les années 70 que les molécules HLA sont proches en séquence et en conformation spatiale.

Bien étroitement liée à l'histoire du HLA et de l'optimisation de ses techniques, la classification en antigènes publics et en groupes sérologiques n'est pas obsolète. En effet, l'attribution de différents antigènes au sein d'un même sous-groupe sérologique est la conséquence directe des réactions croisées permettant leur identification. Ainsi, ces groupes sérologiques rassemblent sous une même entité différents antigènes pouvant être ciblés par un même anticorps anti-HLA car partageant des épitopes en commun. Ces groupes sérologiques permettent de comprendre dans un certain nombre de cas les co-positivités observées pour un profil d'immunisation donné.

Par exemple : un patient dont le typage sur le locus A est A*01:01/A*24:02 a été greffé avec un rein dont le typage est A*01:01/A*02:01. Ce patient peut développer des anticorps anti-A*02:01. Lors de l'identification des anticorps du patient, on pourra retrouver des fluorescences positives pour les antigènes suivants : A*02:01, A*02:03 et A*02:06. Ainsi, les anticorps développés *in vivo* contre l'antigène A*02:01 ciblent également les antigènes A*02:03 et A*02:06 *in vitro*, car ces trois molécules partagent le ou les même(s) épitope(s) cible(s).

1.3.2 Notion de groupe de réactivités croisées (CREG)

Dès les années 70, l'utilisation des techniques de LCT pour identifier la présence d'anticorps anti-HLA démontre qu'un seul et même anticorps peut être capable de cibler un large panel de molécules différentes [22][23][24]. De cette observation naît la notion d'épitope public : il existe des motifs partagés par un grand nombre d'antigènes, y compris au travers de groupes sérologiques différents. On identifie notamment un anticorps dirigé contre un épitope nommé Bw4, capable de se fixer sur 86% des cellules utilisées en LCT. Cet épitope dépend du groupe d'acides aminés en position 77 et 80 à 83 sur l'hélice α -1 des antigènes HLA-B. Il est établi que la majorité des allèles HLA-B ne portant pas cet épitope Bw4 partagent à l'inverse l'épitope Bw6 correspondant à une sérine en position 77 et une asparagine en position 80 [25].

D'autres épitopes partagés par plusieurs antigènes ont permis de définir des groupes de réactivités croisées (Cross-REactivity Groupe, CREG). Huit groupes CREG ont notamment été décrits pour la classe I [26][27] (1C, 2C, 5C, 6C, 7C, 8C et 12C), partageant chacun un ou plusieurs épitopes. Des cartes ont été établies résumant les réactions croisées fréquentes entre

les différents groupes sérologiques 1.9. Par exemple, il apparaît fréquemment des anticorps ciblant à la fois les antigènes A11 et A3 ou encore B5 et B35.

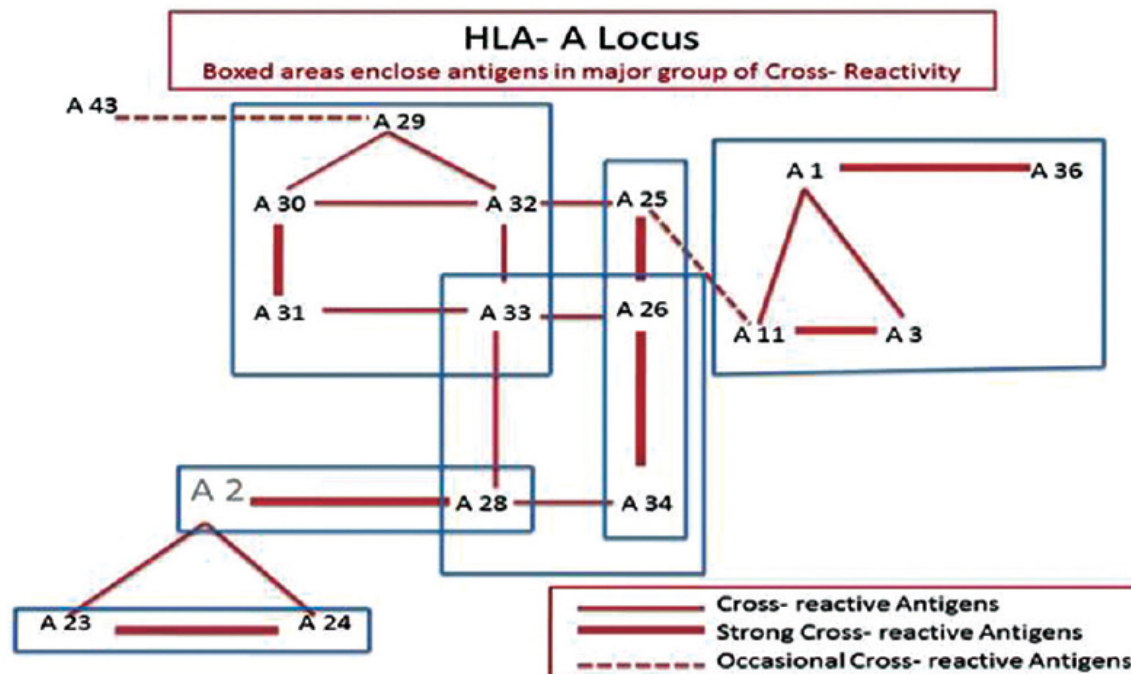


Figure 1.9: Groupe de réactivité croisée entre les différents antigènes du HLA-A [28].

1.3.3 Notion d'Eplet

Les progrès concomitants de la biologie moléculaire et de la modélisation moléculaire ont permis d'identifier avec beaucoup plus de précision l'ensemble des épitopes constituant les molécules du CMH. En 2002, Duquesnoy et son équipe publient un premier algorithme considérant que les épitopes immunogènes sont composés de triplets d'acides aminés à la surface de la molécule et accessibles aux allo-anticorps [29]. Il élabore une première version d'HLA-Matchmaker, un outil informatique permettant de comparer ces séquences de triplets d'acides aminés pour les molécules de classe I afin de comparer leur structure à l'échelle moléculaire. Dans les années qui suivirent, les modélisations de la stéréochimie et la cristallographie ont permis de préciser la structure des molécules et d'identifier avec plus de précision les acides aminés accessibles aux paratopes des anticorps. En 2006, le terme "eplet" est alors utilisé pour définir des groupes de 2 à 5 acides aminés proches de 3 Angström et potentiellement

immunogènes [30]. Ces eplets intègrent la conformation tridimensionnelle de la protéine et ses repliements, et représentent des séquences d'acides aminés linéaires ou discontinues 1.10.

En 2013, la base de données "Epitope Registry", décrivant l'ensemble des associations CMH-eplet est publiée et accessible à la communauté scientifique [31]. Des expériences *in vitro* de confirmation du caractère immunogène de certains épitopes, confrontées à la réalité épidémiologique des profils d'anticorps observés, ont permis de confirmer l'importance d'un certain nombre d'eplets. Les eplets ayant fait la preuve de leur caractère immunogène *in vivo* sont désignés en tant que "eplet anticorps vérifiés" ou "antibody verified eplet".

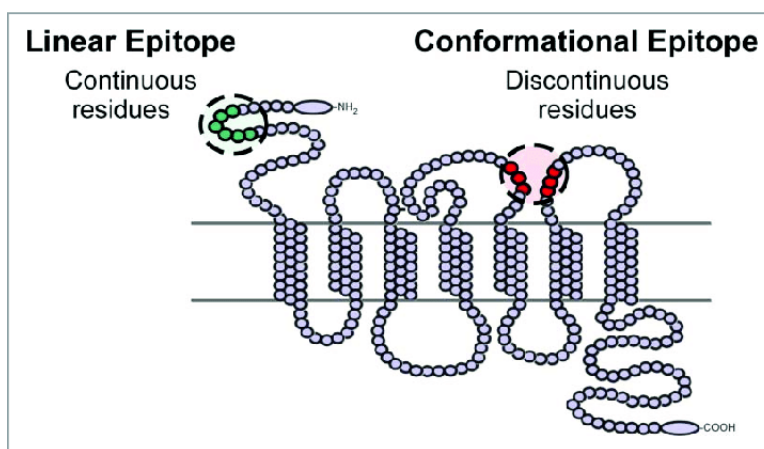


Figure 1.10: Notion d'épitope linéaire ou discontinu en immunologie [32]

1.3.4 Appariement donneur-receveur : de l'antigène à l'épitope

Comme nous l'avons précédemment évoqué avec les études cliniques publiées dès le début des années 70[5][6], la survie des greffons en transplantation d'organe solide est directement corrélée aux nombres d'incompatibilités du système HLA entre le donneur et le receveur, ou mismatch. Certaines études démontrent que les mismatches sur les locus DR et B sont plus défavorables que sur les mismatches HLA-A [33]. En pratique courante, la majorité des organes greffés proviennent de donneurs décédés (rapport de l'agence de biomédecine 2019), et la compatibilité HLA parfaite n'est quasiment jamais atteinte. Idéalement, on cherchera à former des couples donneur/receveur présentant "le plus petit degré d'incompatibilité possible".

Cette attribution s'appuie, en France, sur un algorithme qui tient en partie compte de l'appariement HLA donneur-receveur. Toutefois, cet appariement est effectué à l'échelle antigénique, et est donc peu résolutive. Le développement des techniques de typage en urgence et l'identification des épitopes immunogènes en HLA pourrait permettre une amélioration importante du système d'attribution donneur-receveur. En décomposant les antigènes du donneur et du receveur en séquences d'épitopes potentiellement responsables d'une immunisation, il est théoriquement possible de comparer avec beaucoup plus de précision le degré d'incompatibilité entre deux antigènes et de stratifier les mismatches.

L'algorithme HLAMatchmaker permet de quantifier le nombre d'eplets mismatchés pour un couple donneur-receveur. Il a été démontré que le nombre d'épitopes mismatchés était corrélé à l'apparition des DSA [34][35][36]. Il n'est pas encore clairement démontré que l'approche épitopique permet de meilleures prédictions que le décompte du nombre de mismatch antigénique, mais l'impact de chaque épitope n'est pas encore élucidé. Des études sont en cours afin d'évaluer l'importance de la gravité de chaque mismatch épitopique pour un couple donneur-receveur donné, mais une telle analyse est extrêmement complexe et nécessite de très grosses cohortes de patients.

1.4 Interprétation des profils d'anticorps anti-HLA

1.4.1 Généralités

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le partage de nombreux épitopes communs entre les antigènes du HLA (Fig. 1.11) conduit à l'observation de réactions croisées complexes au moment de l'identification des anticorps anti-HLA. Au moment de la validation de ces examens, le biologiste peut être amené à définir si les co-positivités observées sont secondaires à une immunisation croisée unique, ou à plusieurs immunisations concomitantes secondaires à différents épisodes immunogènes. Concernant l'analyse des locus DQ et DP, il est souvent nécessaire de recouper les positivités pour déterminer si un anticorps cible les chaînes α ou β . Regrouper les antigènes en groupes CREG et en groupes sérologiques permet une première approche de cette problématique. La décomposition complète des antigènes en succession d'eplets permet une analyse plus fine des interactions observées. Toutefois, l'approche épitopique nécessite l'utilisation d'outils d'aide à l'interprétation exploitables en

routine. Historiquement, le principal outil ayant accompagné le développement de la notion d'éplet est HLA Matchmaker, développé par Duquesnoy et ses équipes.

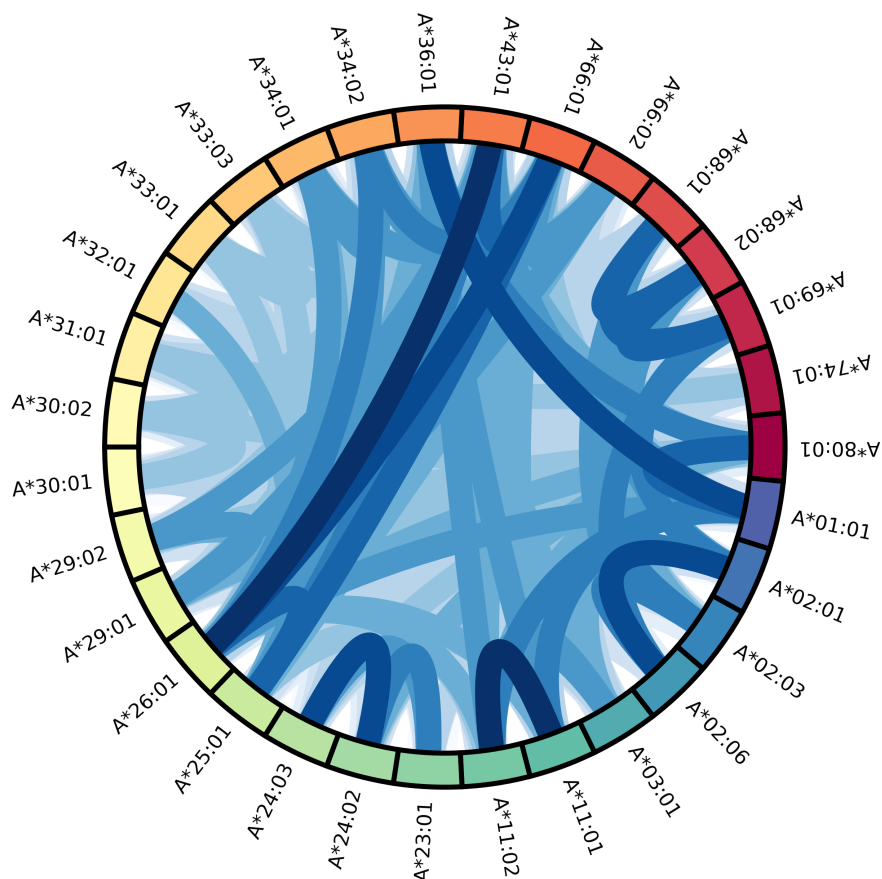


Figure 1.11: Diagramme Chord représentant, en intensité de bleu, le nombre d'épitopes vérifiés communs entre les antigènes du HLA-A présents dans le kit "Single Antigen" Labscreen™.

1.4.2 HLA Matchmaker

HLAMatchmaker se présente en un ensemble de programmes Excel avec différentes fonctions. Les programmes "Eplet Matching" permettent de déterminer la charge épitopique d'un couple donneur-receveur. Après avoir saisi les typages donneur et receveur, le programme réalise un alignement des séquences permettant d'identifier les eplets présents chez le donneur mais pas chez le receveur, c'est à dire la charge épitopique. Jusqu'à 1000 couples donneur-receveur peuvent ainsi être analysés simultanément. Pour un donneur par exemple, ce programme permet d'identifier la plus petite charge épitopique entre différents receveurs potentiels (Fig. 1.12).

A.

RecInfo	Rec1stA	Rec2ndA	Rec1stB	Rec2ndB	Rec1stC	Rec2ndC	DonorInfo	Don1stA	Don2ndA	Don1stB	Don2ndB	Don1stC	Don2ndC
1	A*01:01	A*03:01	B*07:02	B*08:01	C*07:01	C*07:02	dn1	A*31:01	A*34:01	B*14:02	B*39:01	C*12:03	C*14:02
2	A*01:01	A*03:01	B*07:02	B*08:01	C*07:01	C*07:02	dn2	A*31:01	A*34:01	B*14:02	B*39:01	C*12:03	C*14:02
3	A*01:01	A*02:01	B*35:01	B*56:01	C*04:01	C*12:03	dn3	A*31:01	A*34:01	B*14:02	B*39:01	C*12:03	C*14:02

B.

All Eplets	Verified Eplets	Other Eplets	AbVer Eplets sequence	Other Eplet Sequence
17	9	8	56R62RR73TVS131S145RT149TAG158T219W193PV	73ID69RT156WA170RH184A184H193AV245AS
10	6	4	56R62RR73TVS145RT194TAH158T	73ID69RT170RH245AS
10	6	4	56R62RR73TVS145RT194TAH158T	73ID69RT170RH245AS

Figure 1.12: Exemple d'utilisation du programme HLA MatchMaker "ABC Eplet Matching Program V4" A. On insère dans le programme 3 typages receveur pour un même typage donneur (onglet "EnterData"). B. Le programme indique, pour chaque couple donneur-receveur, le nombre total d'eplets mismatchés, le nombre d'eplets vérifiés mismatchés et le nombre d'eplets non vérifiés mismatchés. Il indique également les séquences des ces eplets.

Les programmes HLA Matchmaker "ABC Antibody Analysis V3.1" permettent d'analyser les résultats des tests d'identification des anticorps anti-HLA. Le programme identifie les eplets communs aux billes positives, parmi lesquelles il retrouve ceux spécifiques à un donneur renseignés par l'utilisateur (ou "Immunizer") et non présents chez le receveur. Il distingue ensuite parmi cette sélection d'eplets candidats les "vérifiés" et les "non vérifiés". Au total, ce programme permet de réaliser un cross-match virtuel en confrontant un profil d'immunisation avec un donneur potentiel, ou encore d'identifier la cible ou les cibles exactes d'un DSA.

Les programmes dédiés à la classe I (ABC Eplet Matching Program V4) incluent 1890 allèles ABC (587 HLA-A, 971 HLA-B, 332 HLA-C) et les programmes dédiés à la classe II comportent 382 allèles HLA-DR, 125 DQB, 21 DQA, 160 DPB et 13 DPA. Les associations antigènes-épitopes sont directement issues de la base de données "Epitope Registry".

1.4.3 Objectif de l'étude : Analyse des réactivités croisées et développement d'HLA Graph

L'outil HLA Matchmaker constitue aujourd'hui l'outil de matching épitopique le plus populaire, et a nettement amélioré la compréhension des profils d'immunisation anti-HLA au cours de ces dernières années. Toutefois, l'utilisation de ces programmes est fastidieuse en pratique courante. Les programmes sont lourds, peu ergonomiques et leur utilisation nécessite une formation. Afin de mieux comprendre les profils d'immunisation, nous avons effectué une analyse fine des réactions croisées d'un grand nombre de profils d'anticorps

anti-HLA analysés par différentes techniques de SA. Nous avons émis l'hypothèse qu'une forte corrélation des fluorescences était un reflet objectif de la similarité des épitopes entre deux antigènes. Afin de valider cette hypothèse, nous avons élaboré un modèle permettant de comparer les corrélations des MFI avec les groupes CREGs, les groupes sérologiques et les sous-groupes alléliques décrits. En utilisant les principes de la théorie des graphes, nous avons construit des réseaux de corrélation constituant un nouveau support d'aide à l'interprétation des anticorps anti-HLA.

Afin de rendre plus accessible l'analyse épitopique des profils d'anticorps, nous avons développé un nouvel outil de matching épitopique utilisant ces réseaux de corrélation comme support visuel. Nous présenterons au cours de ce travail les différentes fonctions portées par cet outil au travers de plusieurs exemples d'utilisations.

Chapitre 2

Matériel et méthode

2.1 Recueil de données des tests Luminex™ LABScreen™

Nous avons analysé les données des tests Luminex™ LABScreen™ SAB de classe I (SA1) et de classe II (SA2) (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) réalisés sur des sérums pré-traités à l'acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA) afin de s'affranchir des interférences liées au complément [37][38], collectées au centre médical universitaire d'Amiens (Amiens, France) et au centre médical universitaire de Lille (Lille, France) entre janvier 2015 et juin 2019. Les échantillons analysés provenaient de patients inscrits sur liste d'attente en transplantation d'organes, de patients en attente de greffe de cellules souches hématopoïétiques, de suivi de patients greffés ou présentant des transfusions de plaquettes inefficaces. Les données de 5908 tests classe I (SA1) et 6103 tests de classe II (SA2) ont été inclus dans l'analyse. Le panel SA1 comprend 31 billes avec des antigènes HLA-A, 50 avec des antigènes HLA-B, et 16 avec des antigènes HLA-C. Le panel SA2 comprend 29 billes avec des antigènes HLA-DRB1, 28 avec des antigènes HLA-DQB1/-DQA1, et 31 avec des antigènes HLA-DPB1/-DPA1. Les équivalents sérologiques des allèles HLA-A, -B, -C, DRB1 ont été définis selon le dictionnaire HLA 2008 (Holdsworth et al., 2009). Nous avons extrait les valeurs de fluorescences (moyennes ajustées) des fichiers de données brutes (.csv) générés par le logiciel HLA-Fusion (One Lambda) qui fait l'interface entre le cytomètre Luminex et l'utilisateur. Les sérums présentant un bruit de fond trop élevé ont été retirés de l'analyse (Bille négative contrôle supérieure à 500).

2.2 Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du package Scipy développé en Python (version 3.6) [39]. Nous avons calculé les corrélations des fluorescences entre toutes les paires de billes deux à deux. La distribution des fluorescences ne suivant pas une loi normale (majorité de valeurs proches de 0 avec quelques valeurs extrêmes), nous avons utilisé le coefficient de corrélation de Spearman (noté ρ). Les distributions des valeurs de Spearman ρ par groupe de paires de billes ont été comparées à l'aide de test-t de Student.

2.3 Conception des graphes de corrélations

Pour chaque locus, nous avons construit un graphe de corrélation à l'aide du logiciel Gephi (version 0.9.2 [40]). Ces graphes sont composés de nœuds et de liens selon la répartition suivante :

- Chaque bille présente dans le kit est représentée par un nœud.
- Chaque lien relie deux billes ayant un coefficient de corrélation Spearman supérieur à 0.8. Il n'y a pas de sens entre les arêtes (graphe non orienté).

La structure des graphes a été traitée par l'algorithme de Yifan Hu [41] implémenté par Gephi. Cet algorithme permet d'isoler les clusters (groupes de Nœuds fortement interconnectés) et d'améliorer la visibilité des graphes.

2.4 Conception des figures

Nuages de points, droites de corrélations, matrices de distances et boxplot ont été générés avec le package Python matplotlib v3.4.3 [42].

2.5 Bases des données "Epitope Registry"

Afin d'attribuer à chaque protéine du CMH une séquence d'épitope, nous avons utilisé la base de données "Epitope Registry". Les autorisations d'utilisation ainsi que la base de données complète nous ont été transmises par le docteur Marilyn Marrari de l'université de Pittsburgh (équipe du professeur René Duquesnoy). Grâce à cette base de données, nous

avons pu attribuer à chaque allèle l'ensemble des épitopes le constituant. Chacun des ces épitopes est annoté du statut "Vérfié" ou "Non vérifié".

2.6 Conception de l'outil HLA Graph

2.6.1 Architecture du projet HLA Graph

HLA Graph est un outil développé pour être accessible par navigateur web. Cet outil est construit à partir du package Flask (framework open-source de développement web en python [43]). La partie dite "back-end" (partie serveur et traitement des données) est développée en Python. Les images de graphes sont générées à partir d'un schéma vierge au format SVG. La partie dite "front-end" (interface graphique) suit une architecture HTML/CSS et JavaScript. L'ensemble du code source, ainsi que l'ensemble des données utilisées sont hébergés et accessibles en open-source à l'adresse suivante : https://github.com/cedricusureau/HLA_graph.

Pour l'analyse épitopique, la base de données utilisée est la version 3.0 de Epitope Registry. L'adresse URL de cet outil est la suivante : <https://cusureau.pythonanywhere.com>

2.6.2 Développement d'une version adaptée au kit LifeCode™ (Immucor™)

Afin d'étendre l'utilisation d'HLA Graph à un plus grand nombre d'utilisateurs, nous avons souhaité l'adapter au kit d'identification des anticorps anti-HLA développé par le fournisseur Immucor™ (LifeCodes™). Toutefois, les antigènes présents à la surface des billes du kit Lifecodes ne sont pas strictement identiques au kit "One Lambda", et nous avons donc construit de nouveaux graphes dédiés à l'analyse de ce kit. Nous sommes entrés en collaboration avec les EFS de Lyon et de Grenoble qui utilisent ces kits en routine afin de récolter les données brutes des fluorescence obtenues sur un grand nombre d'échantillons analysés. Au total, nous avons récolté les données nettoyées et anonymisées de 9606 tests de sérums de classe I et 11812 tests de sérums de classe II. Le panel Lifecodes Classe I comprend 30 billes avec des antigènes HLA-A, 48 avec des antigènes HLA-B et 18 avec des antigènes HLA-C. Le panel Lifecodes Classe II comprend 38 antigènes HLA-DRB1, 31 antigènes HLA-DQA1/DQB1 et 27 antigènes HLA-DPA1/DPB1. En utilisant le même modèle que

celui précédemment décrit, nous avons construit de nouveaux graphes de corrélation spécifiques à ce kit. Une version de HLA Graph dédiée aux utilisateurs du kit Immucor est ainsi accessible à l'adresse suivante : <https://hlagraph.pythonanywhere.com>

Chapitre 3

Résultats

3.1 Graphes de corrélations

Nous avons calculé les coefficients de corrélations de Spearman ρ de chaque paire de billes au sein d'un même locus (Fig. 3.1). L'ensemble de ces résultats peut être représenté sous forme de matrice de distance (Fig. 3.2). Au total, nous avons identifié 574 paires de billes présentant un Spearman supérieur à 0.8 (47, 172, 39, 31, 33 et 54 corrélations pour HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQA1/DQB1, DPA1/DPB1 respectivement). A titre d'exemple, la corrélation la plus forte concerne deux allèles du HLA-B*57 (B*57:01 et B*57:03, $\rho = 0.969$). Par opposition, la corrélation la plus faible concerne les allèles DRB1*01:01 et DRB1*03:02 ($\rho = 0.356$).

Nous supposons que la distance ρ est un reflet objectif de la fréquence des co-positivités. Nous avons utilisé cette métrique ρ pour construire des réseaux de corrélation présentant visuellement les réactions croisées les plus importantes. Afin de valider nos hypothèses, nous allons dans un premier temps comparer les réseaux de corrélations construits aux classifications CREG ou sérologiques historiquement utilisées.

L'ensemble des interactions notables entre les groupes sérologiques et les groupes CREGs ont été listées de manière exhaustive dans l'article décrivant l'ensemble de notre modèle (Annexe 6).

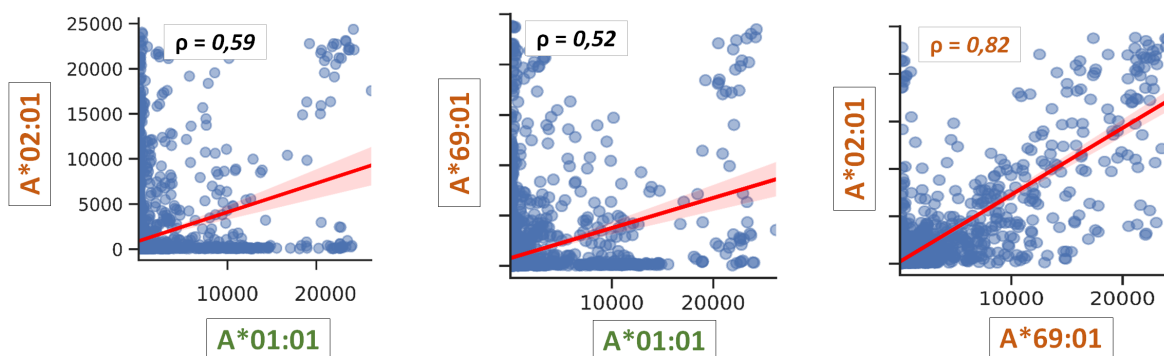


Figure 3.1: Chaque point représente les MFI de deux antigènes pour un même échantillon. La droite de corrélation apparaît en rouge.

3.1.1 Graphe de corrélation HLA-A

Dans l'ensemble, les billes représentant les groupes sérologiques classiquement décrits forment des clusters très bien individualisés. En effet, les ensembles de billes des groupes A2, A9, A10, A19 et A28 sont interconnectés, hormis deux exceptions :

- A*25:01 forme un noeud isolé, avec un ρ de Spearman juste en dessous du seuil de 0,8 avec les autres billes du groupe HLA-A10 (A*25:01 / A*66:01, $\rho = 0,749$).
- A*32:01 est également isolé de l'ensemble des billes du groupe A10 dont la plus forte corrélation retrouvée est A*32:01 / A*74:01 ($\rho = 0,757$).

Par ailleurs, les groupes sérologiques sont liés par les CREG, formant un graphe HLA-A très inter-connecté :

- CREG 1C (HLA-A1, -A3, -A9, -A11, -A29, -A30, -A31, -A36 et -A80) : corrélation forte entre les groupes -A1, -A3, -A11 et -A36 ainsi que pour -A30, -A31.
- CREG 2C (A2, A9, A28, B17) : corrélation forte entre -A2 et -A28 via A69
- CREG 10C : forme un réseaux inter-connecté entre A10, -A11, -A28, -A32, -A33, -A43 et -A74.

Seules les billes du groupe A9 (A23, A24), les billes A*25:01, A*32:01 et A*80:01 constituent des éléments isolés du reste du graphe. Nous reviendrons sur cette spécificité lors de l'analyse des interactions liées aux épitopes publics Bw4 et Bw6 (Fig. 3.3).

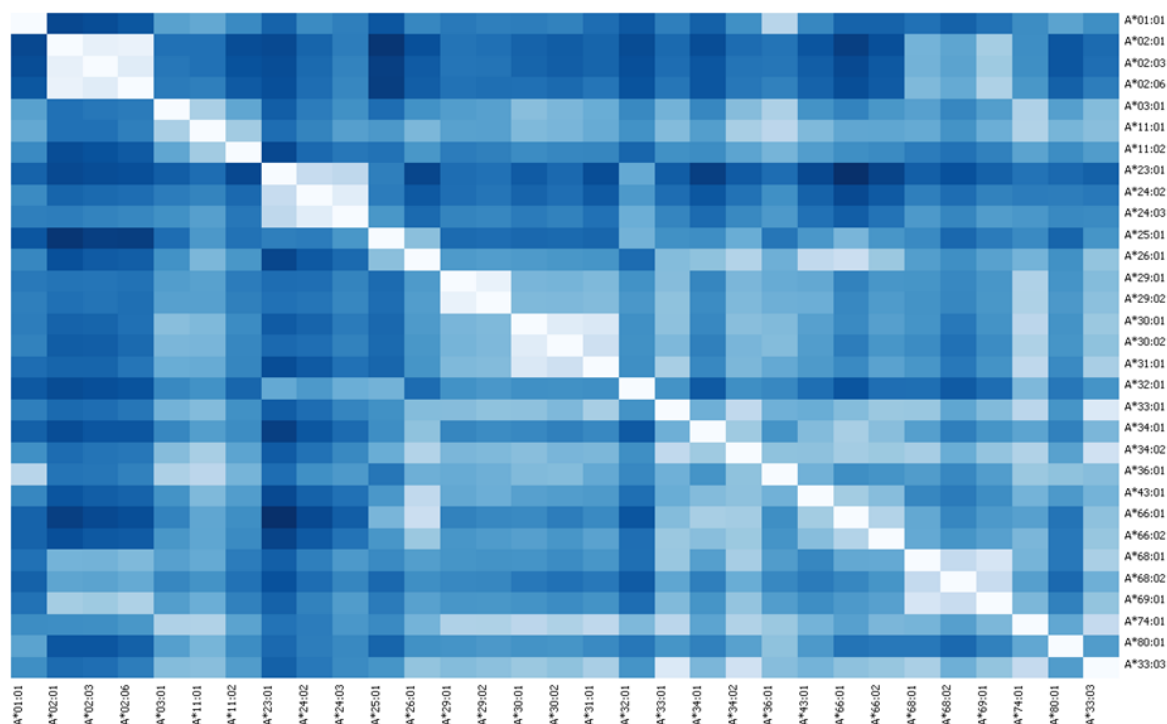


Figure 3.2: Matrice des distances de Spearman du locus HLA-A. A l'intersection de deux antigènes, l'intensité de bleu est proportionnelle à la distance de Spearman.

3.1.2 Graphe de corrélation HLA-B

Tout comme le réseau de corrélations HLA-A, les billes appartenant à un même sous-groupe sérologique sont fortement inter-connectées, à l'exception des sous-groupes HLA-B15 et -B21.

HLA-B21 n'est représenté que par deux allèles (B*49:01 et B*50:01), pour lesquels le ρ de Spearman est légèrement inférieur au seuil de 0,8 ($\rho = 0,797$). Le polymorphisme observé au sein des sous-groupes alléliques HLA-B*15 est déjà bien décrit, et est intimement lié aux épitopes publics Bw4/Bw6 que nous détaillons dans la section suivante.

3.1.3 Graphe de corrélation HLA-C

Les antigènes HLA-C sont connus pour être des ligands des récepteurs KIR, qui sont des régulateurs clés de l'activité des cellules NK. Le graphe de corrélation HLA-C identifie deux clusters principaux, correspondant à la classification des KIR ligands [44]. Le premier cluster (HLA-C1), qui fixe les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3, comprend HLA-C*01:02,

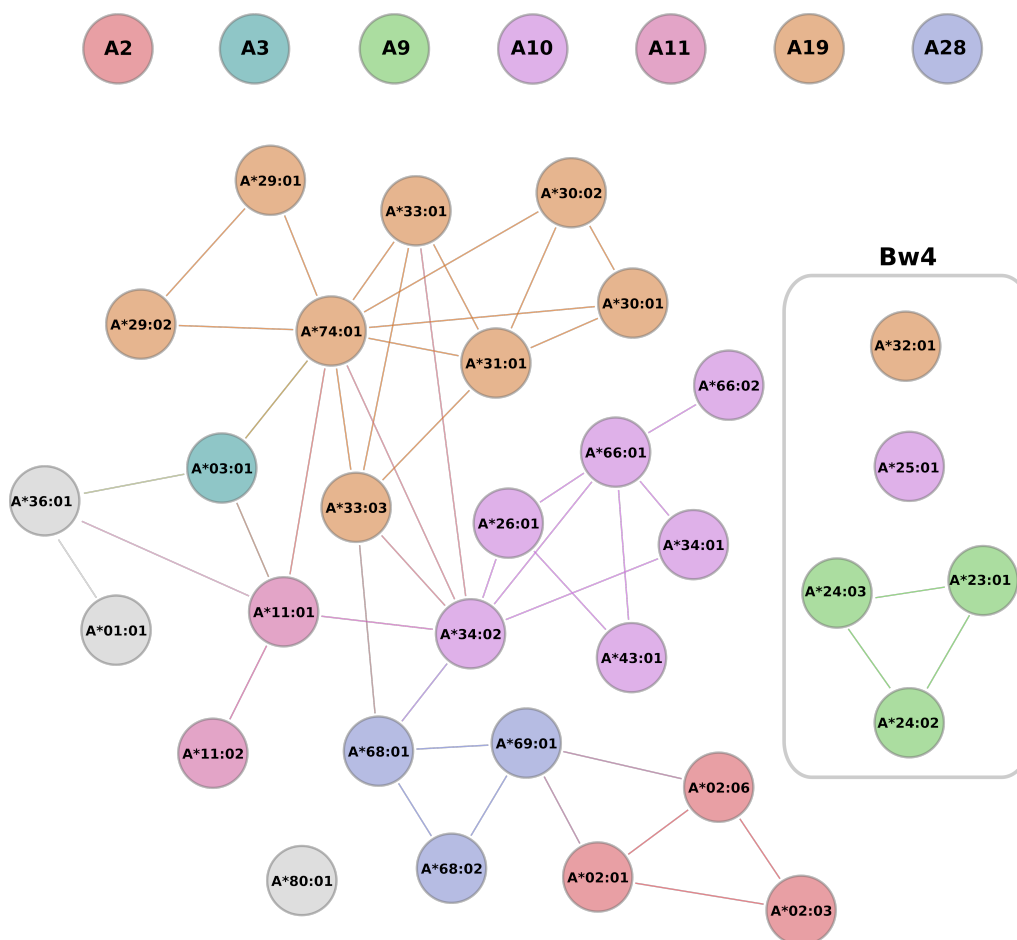


Figure 3.3: Graphe de corrélation des antigènes HLA-A. Les couleurs des noeuds respectent les classifications sérologiques. Les antigènes encadrés à droite du graphe correspondent aux billes portant l'épitope Bw4.

-C*03:02, -C*03:03, -C*03:04, -C*07:02, -C*08:01, -C*12:03, -C*14:02 et -C*16:01. Ce groupe d'allèles est phylogénétiquement plus ancien. Les allèles HLA-C du deuxième cluster (HLA-C2), qui fixent KIR2DL1 et KIR2DS1, comprennent HLA-C*02:02, -C*04:01, -C*05:01, -C*06:02, -C*15:02 et -C*17:01. De plus, ces deux groupes de ligands KIR sont interconnectés par deux allèles : HLA-C*14:02 (du groupe 1) et HLA-C*04:01 (du groupe 2), avec $\rho = 0,830$ (Fig. 3.4). Ces sites de liaisons définissent des épitopes immunogènes permettant d'expliquer la topologie du graphe HLA-C. En effet, les antigènes du groupe HLA-C1 partagent l'épitope 76VS76VRN alors que les antigènes du groupe HLA-C2 portent l'épitope 80K.

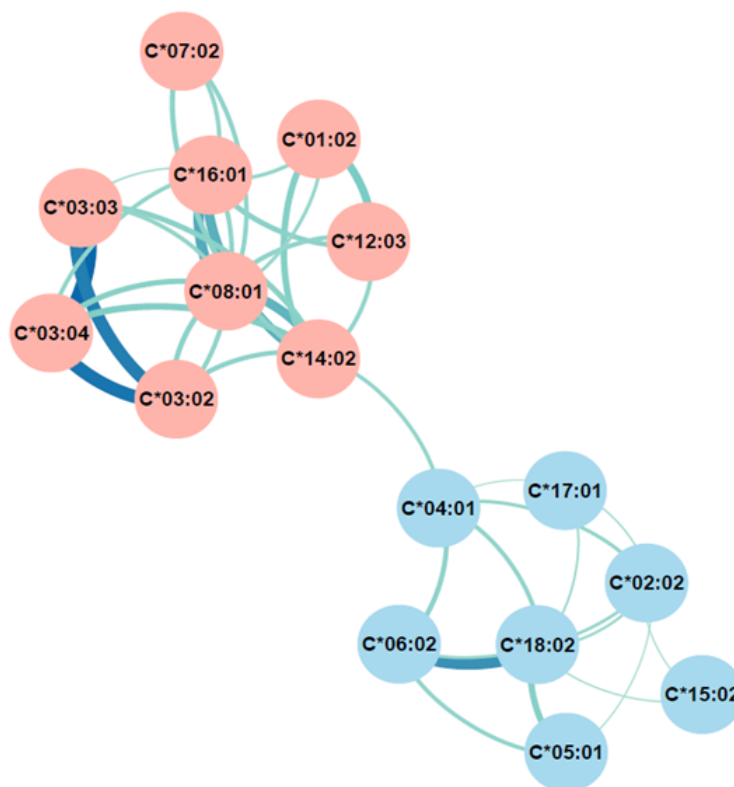


Figure 3.4: Graphe HLA-C. Les noeuds oranges forment le groupe HLA-C1 (épitope 76VS76VRN) et les noeuds bleus forment le groupe HLA-C2 (épitope 80K)

3.1.4 Corrélation de Spearman et épitopes publics Bw4/Bw6

Les épitopes Bw4 et Bw6 au sein du réseau HLA-A

Certains antigènes HLA-A portent l'épitope Bw4. Ces antigènes, représentés par A9, A25 et A32 forment des îlots isolés du reste du réseau HLA-A (Fig 3.3). La comparaison des ρ inter-locus retrouve une seule corrélation forte entre les antigènes A et B. En effet, HLA-A*32:01 et HLA-B*59:01, qui partagent l'antigène Bw4, présentent une corrélation $\rho = 0,802$.

La figure 3.5 montre que les allèles HLA-A portant l'épitope Bw4 sont en moyenne plus fortement corrélés avec les allèles du HLA-Bw4, alors qu'ils sont en moyenne moins corrélés avec les autres antigènes HLA-A ne portant pas cet antigène.

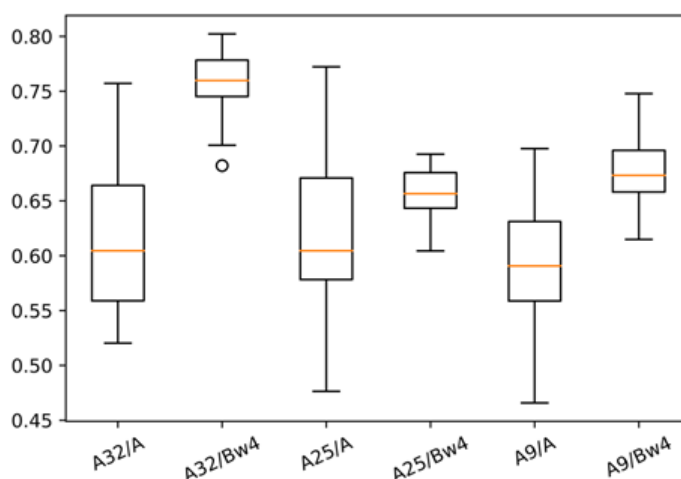


Figure 3.5: Coefficient de Spearman par paire de billes selon le partage ou le mismatch de l'antigène Bw4 pour les antigènes A32, A25 et A9 (A23 A24).

Les épitopes Bw4 et Bw6 au sein du réseau HLA-B

Au sein du réseau de corrélation HLA-B, il est important de noter que les spécificités Bw4 et Bw6 forment deux parties bien distinctes du graphe (Fig. 3.6). En effet, la répartition des billes portant l'un ou l'autre de ces antigènes est homogène. D'un côté, les billes Bw4 sont représentées par B13, 27, 37, 38, 44, 47, 49, 51, 52, 53, 57, 58, 59, 63 et 77. De l'autre côté, les billes Bw6 sont représentées par le groupe B7, 8, 18, 35, 39, 41, 42, 45, 46, 48, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 71, 72, 73, 75, 76, 78, 81 et 82. On retrouve des corrélations fortes entre des antigènes mismatchés Bw4/Bw6, mais dont les réactions croisées sont décrites :

- B*27:05 et B*27:08 partagent le même groupe sérologique B27
- B*38:01 et B*39:01 partagent le même groupe sérologique B16
- B13, B40, B41 et B47 sont inter-connectés et appartiennent aux CREG 12C.
- Les antigènes du B15, B21 (B*49:01, B*50:01), B35, B53 et B78 constituent une interface entre des billes Bw4 et Bw6, mais partagent le même CREG 5C. [27]

Les épitopes Bw4 et Bw6 et le groupe HLA-B15

Le kit SA1 comprend 8 billes HLA-B15 provenant de 7 sous-groupes sérologiques différents (les allèles B*15:02 et B*15:11 appartiennent au même sous-groupe B75). Les allèles HLA-B*15:01 (B62), -B*15:02 (B75), -B*15:03 (B72), -B*15:10 (B71) et -B*15:11 (B75) partagent les spécificités antigéniques Bw6 et sont totalement inter-connectés. Cependant, HLA-B*15:12 (équivalent sérologique B76 Bw6) était faiblement corrélé avec tous les autres

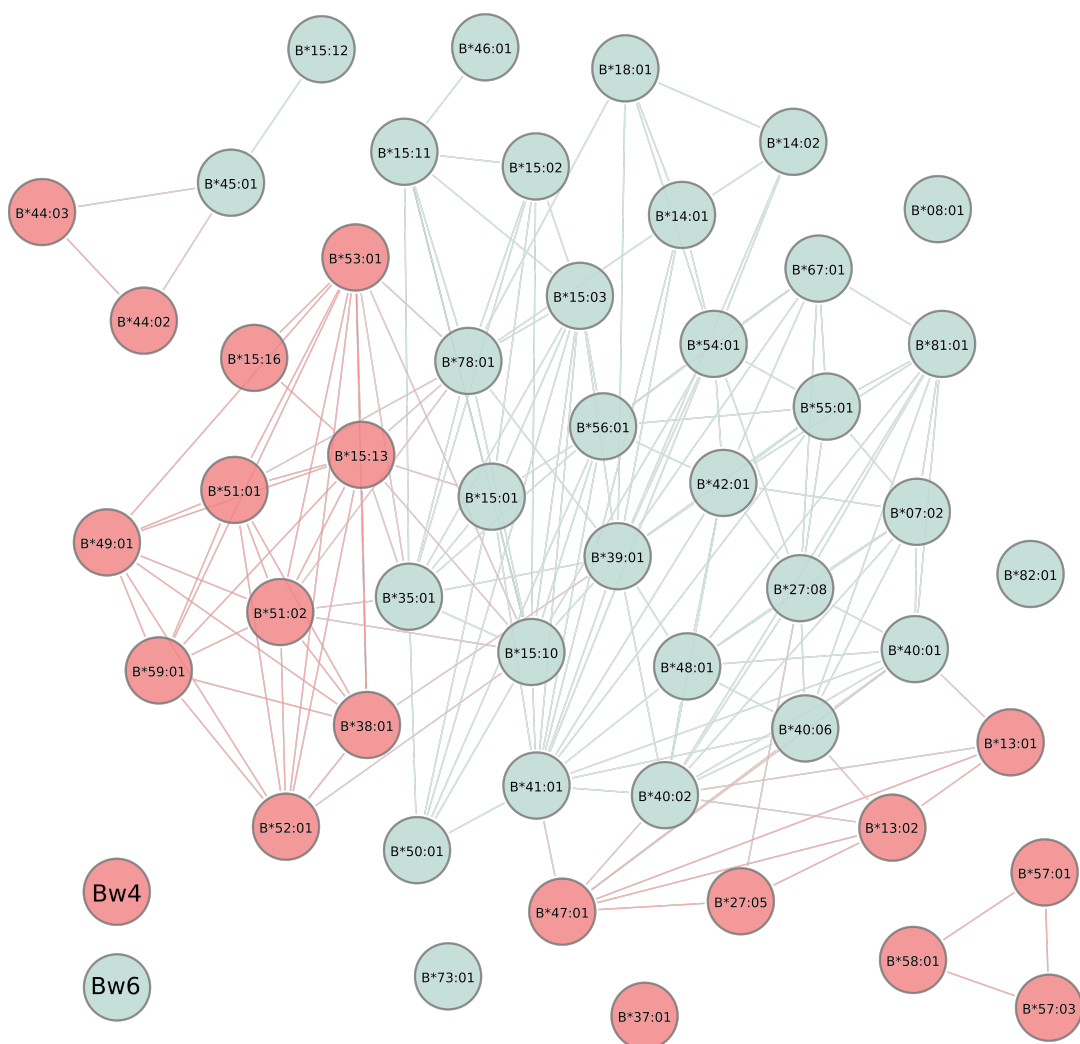


Figure 3.6: Graphe HLA-B. Les nœuds roses portent l'épitope Bw4, et les nœuds turquoise portent l'épitope Bw6. Bien que ce graphe soit largement inter-connecté, il s'organise autour du partage de ces deux épitopes publics.

allèles HLA-B*15. Concernant le super antigène Bw4, HLA-B*15:16 (B63 Bw4) était plus fortement corrélé avec HLA-B*15:13 (B77 Bw4) ($\rho = 0,812$) qu'avec les autres HLA-B*15.

3.1.5 Réseaux de corrélation des anticorps de classe II

Réseaux de corrélation HLA-DR

Pour le locus HLA-DRB1, l'utilisation du seuil $\rho > 0,8$ construit un graphe beaucoup moins inter-connecté que pour les réseaux de classe I. En effet, les antigènes des sous-groupes HLA-DR1, -DR2 (sous-types DR15 et DR16), -DR3, -DR4 et -DR9 forment des clusters

distincts respectivement. Les allèles HLA-DRB1*10:01 et HLA-DRB1*07:01 (les seuls antigènes représentatifs de leurs sous-groupes sérologiques) forment des noeuds isolés. Il convient de noter que la plus haute valeur de Spearman ρ pour l'allèle HLA-DRB1*07:01 était bien inférieure à 0,8 (DRB1*07:01/DRB1*09:02 : $\rho = 0,691$), ce qui suggère que cette entité présente une faible réactivité croisée avec les autres allèles testés.

Les sous-réseaux composés par les sous-groupes HLA-DR5 (DRB1*11, DRB1*12)/HLA-DR6 (DRB1*13, DRB1*14) et HLA-DR8 présentent des interactions plus complexes. En effet, les billes du DR11 et du DR12, bien que tous deux représentants du supertype DR5, ont une corrélation relativement inférieure à celles des autres groupes sérologiques (DRB1*11:01 / DRB1*12:01, $\rho = 0,73$). Il en est de même pour les allèles du DR13 et DR14 (DR6), dont l'ensemble des corrélations représentées sont toutes inférieures à 0.8. Malgré tout, nous avons identifié de fortes corrélations entre HLA-DRB1*08 et les allèles HLA-DRB1*11:01 ($\rho = 0,838$), -DRB1*13:03 ($\rho = 0,865$) et -DRB1*14:01 ($\rho = 0,806$) ; ces corrélations ne représentant pas des interactions décrites par les CREGs.

Réseaux de corrélation HLA-DQ et HLA-DP

L'analyse des réseaux en fonction des groupes sérologiques pour les locus DQ et DP est complexe. En effet, les interactions observées dépendent d'une balance subtile entre les réactions croisées touchant les épitopes communs des chaînes α ou β .

Pour HLA-DQ, on retrouve deux principaux clusters représentés par HLA-DQ1 (-DQ5, -DQ6) et HLA-DQ3 (-DQ7, -DQ8, -DQ9). Toutefois, une bille du DQ5 reste isolée (DQA1*01:01 / DQB*05:01), et 3 billes du DQ7 forment un îlot. Les billes du DQ2 et du DQ4 sont soit isolées, soit associées par paires en fonction des chaînes alpha communes.

Pour HLA-DP, il n'y a pas de classification en groupes sérologiques utilisables. On note toutefois la présence de deux clusters principaux, le premier incluant des billes du DP2, DP4 (DPB1*04:02), DP18 et DP28 et le deuxième incluant des billes DP3, DP6, DP9, DP10, DP14, et DP17.

Nous reviendrons sur ces graphes au cours du chapitre présentant des exemples d'utilisation de l'outil HLA Graph. Nous verrons qu'ils peuvent permettre d'identifier la source α ou β d'une immunisation anti-HLA.

3.2 Spearman ρ et épitopes partagés

L'influence des épitopes publics Bw4/Bw6 est clairement identifiable dans l'interprétation des graphes HLA-A et HLA-B. Bien entendu, ces deux seuls épitopes, bien que déterminant dans l'immunogénicité des antigènes du HLA, ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des réactions croisées observées. Nous avons calculé la distribution des corrélations paire de bille par paire de bille en fonction du nombre d'eplets communs partagés selon la base de données "Epitope Registry" (Fig. 3.7 & 3.8). Les deux billes d'une même paire appartiennent au même locus.

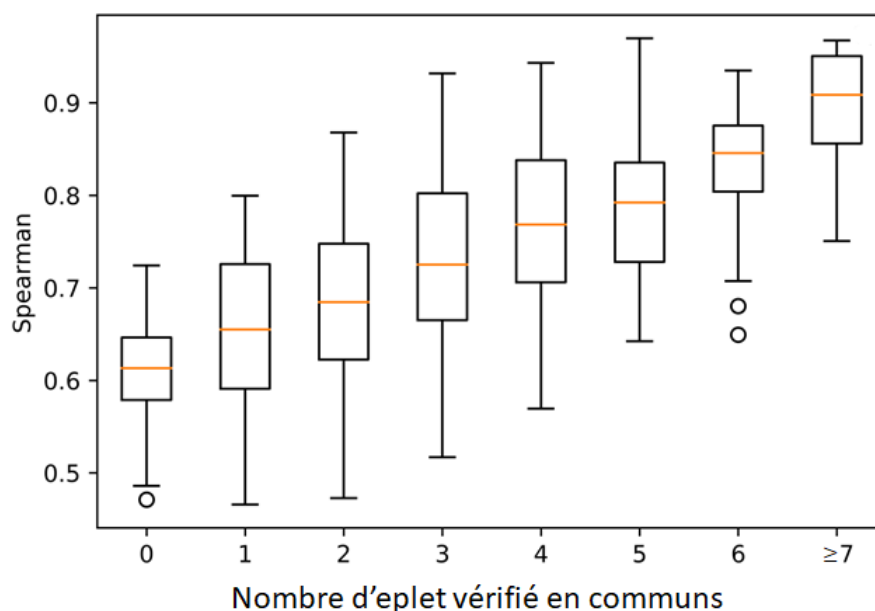


Figure 3.7: Coefficient de Spearman par paire de billes en fonction du nombre d'eplets vérifiés communs. La comparaison de chaque groupe deux à deux est statistiquement significative (test-t de Student, $p < 0.05$)

Certains exemples particulièrement intéressants méritent une description plus détaillée. Tout d'abord, nous observons que l'allèle HLA-B*46:01 présente une corrélation forte avec plusieurs allèles du HLA-C, et notamment les allèles du C*03 (HLA-C*03:04, $\rho = 0,819$ - HLA-C*03:03, $\rho = 0,814$ - HLA-C*03:02, $\rho = 0,811$). En effet, cet allèle est décrit comme un dérivé phylogénétique du HLA-C [15]. L'analyse épitopique retrouve le partage de l'épitope 76VS76VRN et 163LW.

D'autre part, le sous-groupe sérologique B15 présente des interactions intéressantes. En effet, on observe un premier cluster inter-connecté constitué de B*15:01, B*15:02, B*15:03,

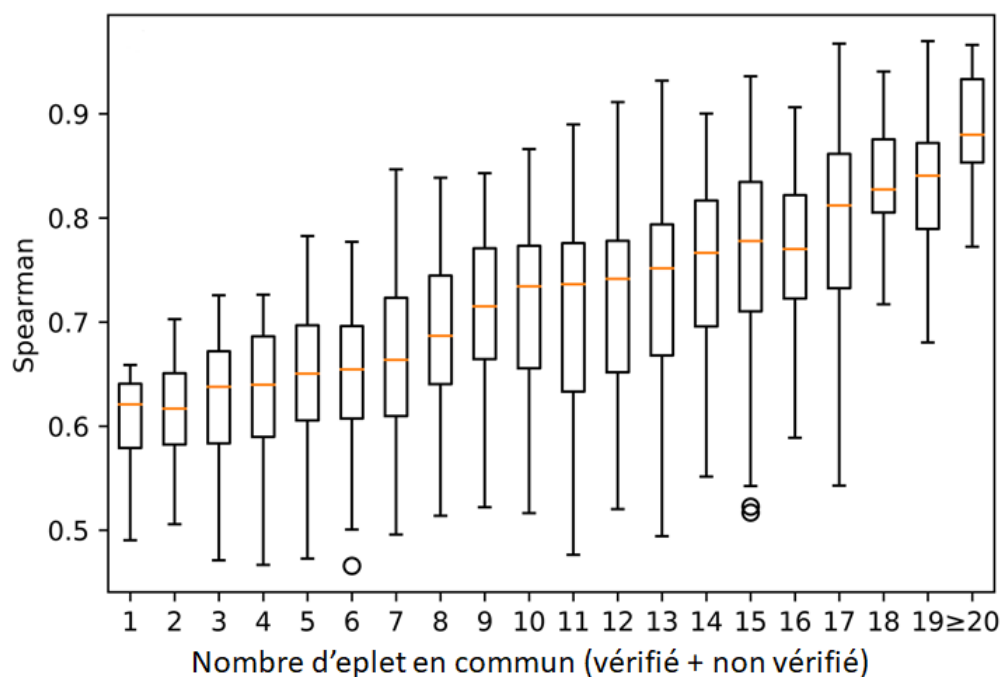


Figure 3.8: Coefficient de Spearman par paire de billes en fonction du nombre d'éplets vérifiés et non vérifiés communs.

B*15:10 et B*15:11, qui partage tous les épitopes 69TNT, 76ESN, 131S et 163LW. En revanche, les deux antigènes B*15:13 et B*15:16, ne portant pas 76ESN mais portant l'épitope Bw4 forment une branche distincte du graphe B15. Là encore, on observe que le mismatch Bw4/Bw6 interfère en diminuant significativement la corrélation. De plus, l'antigène B*15:12 se retrouve complètement isolé du reste du graphe B15. Là encore, l'analyse épitopique permet d'identifier l'épitope 166DG, uniquement porté par cet antigène au sein du HLA-B.

3.3 HLA Graph : un nouvel outil de matching épitopique

3.3.1 Utilisation et interprétation des résultats

Afin de rendre plus accessible le modèle bio-informatique que nous avons construit, et afin de le rendre utilisable en routine pour le biologiste au moment de l'interprétation des anticorps anti-HLA, nous avons développé un outil accessible en ligne. Cet outil permet, à partir des données brutes des fluorescences insérées par l'utilisateur, de construire des graphes servant de support visuel à une analyse épitopique d'un profil d'immunisation. Les figures

3.9 et 3.10 présentent un exemple simplifié des résultats obtenus par HLA Graph.

Format d'entrée

HLA Graph prend en entrée les données de fluorescence de l'ensemble des billes d'un test Single Antigen de classe I ou de classe II. L'utilisateur peut directement insérer des données de fluorescence au format excel selon un schéma décrit dans le tutoriel du site. Afin d'optimiser l'accessibilité à HLA Graph, il est également possible de coller les données brutes directement présentes dans le logiciel HLA FUSION (onglet "Raw data").

L'utilisateur saisit ensuite un seuil de positivité : les antigènes dont les MFI sont inférieures au seuil sont considérés comme négatifs. Les antigènes dont les MFI sont supérieures au seuil sont considérés comme positifs.

L'utilisateur peut également choisir de cocher manuellement les billes qu'il considère positives pour un locus donné via un formulaire dédié.

Génération des graphes

HLA Graph utilise les graphes vierges au format SVG précédemment présentés, auxquels sont ajoutées des informations dépendant des données saisies par l'utilisateur :

- Les antigènes positifs sont affichés en teintes de rouge, dont l'intensité est proportionnelle à la fluorescence
- Les antigènes négatifs sont affichés en blanc
- Les liens entre les antigènes positifs sont affichés en rouge. Les autres liens sont retirés.

Analyse épitopique

L'algorithme implémenté dans HLA Graph identifie un ou plusieurs épitopes permettant d'expliquer le profil d'immunisation. Le principal objectif d'HLA Graph est d'afficher ces épitopes par ordre de priorité, de façon parcimonieuse et intuitive. Dans un premier temps, l'ensemble des épitopes présents à la surface d'une bille négative est considéré comme négatif. Ensuite, afin d'identifier les meilleurs candidats, les règles appliquées par l'algorithme sont les suivantes (du plus au moins probablement immuno-réactif) :

- Lorsqu'un épitope est présent sur l'ensemble des billes positives au sein d'un même locus, celui-ci est affiché en rouge. Ces épitopes sont considérés comme étant les meilleurs candidats pour expliquer un profil.
- Les épitopes portés par deux billes liées ou plus sont affichés en vert. Ces épitopes sont communs aux billes positives qui sont souvent la source de réactions croisées.
- Les épitopes portés par une bille isolée sont affichés en gris. Ces épitopes peuvent expliquer la réactivité d'une bille seule.

Lorsqu'un trop grand nombre d'épitopes est positif, et que ceux-ci ne peuvent pas être affichés sur le graphe pour des raisons de visibilité, nous affichons l'option la plus parcimonieuse, c'est-à-dire les épitopes qui sont partagés par le plus grand nombre d'antigènes positifs. Également, les épitopes formant des clusters au sein d'un même graphe sont affichés en priorité.

Réactivité dirigée contre la chaîne alpha ou bêta

Concernant les analyses des HLA-DQ et DP, HLA Graph considère dans un premier temps les antigènes comme la somme des séquences d'épitopes α et β . Lorsqu'un épitope positif est identifié, une requête est ensuite effectuée pour identifier l'appartenance de ce dernier à l'une des deux chaînes. Cette information est indiquée en haut à gauche du graphe, afin de rapidement comprendre si l'immunisation observée concerne la chaîne α ou β .

Tableaux résumés

L'ensemble des épitopes candidats ne peut être affiché sur un graphe. Des tableaux résumés donc pour l'ensemble des épitopes candidats les antigènes qui les présentent à leur surface. Les épitopes sont affichés de gauche à droite du meilleur au moins bon candidat suivant les règles décrites ci-dessus. Une première table, accessible via l'onglet "View positive eplets", résume l'ensemble des antigènes présents dans le kit testé. La seconde table, accessible *via* l'onglet "View all alleles", affiche en plus tous les allèles connus par la base de données "Epitope Registry". Cette dernière permet de prédire, pour un épitope donné, si un allèle non testé dans le kit sera réactif chez un patient donné.

Antigène	Sérologie	MFI
A*01:01	A1	0
A*02:01	A2	8000
A*03:01	A3	0
A*11:01	A11	0
A*23:01	A23	3000
A*24:01	A24	3000
A*26:01	A26	0
A*66:02	A66	3000
A*68:01	A68	10000
A*69:01	A69	10000

Table 3.1: Exemple simplifié de fichier de données HLA-A pouvant être utilisé dans HLA Graph.

3.3.2 HLA Graph : exemples d'utilisations

Dans cette partie, nous allons développer plusieurs exemples d'utilisation d'HLA Graph que nous avons rencontrés en pratique clinique.

HLA-DR et épitope 96HK

La figure 3.11 représente le réseau généré par HLA Graph pour un échantillon présentant des MFI positives pour un large panel d'antigènes a priori non décrit comme présentant des réactions croisées (HLA-DR3, -DR8, -DR11, -DR12, -DR13, -DR14). Il est intéressant de noter qu'HLA Graph identifie l'épitope 96HK comme étant commun à l'ensemble de ces antigènes (affiché en rouge). Cet épitope permet notamment de renforcer les corrélations du cluster central formé d'HLA-DR8, DR11, DR13, DR14. Il est intéressant de souligner que les fluorescences des billes de ce cluster sont modérément supérieures aux fluorescences des billes en dehors de ce cluster (DR*14:02, DR12, DR3).

Le deuxième épitope candidat est 11STS, mais il n'est pas partagé par le DR8 et le DR12. Pour ce profil, nous pouvons considérer que la présence d'un anticorps anti-96HK constitue l'hypothèse la plus parcimonieuse.

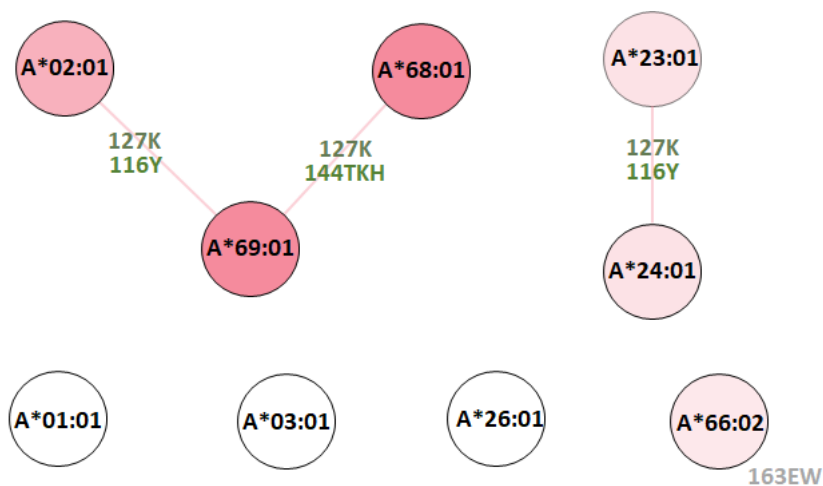


Figure 3.9: Graphe d'exemple généré par HLA Graph, correspondant aux données virtuelles de la table 3.1. Les billes positives (MFI > 1000) sont affichées en teintes de rouge dont l'intensité est proportionnelle à la fluorescence. Les billes négatives sont blanches. Des liens sont présents entre les billes positives et fortement corrélées. L'épitope 127K, partagé par le plus grand nombre de billes positives (A*02:01, A*23:01, A*24:01, A*68:01, A*69:01), est affiché en priorité. Le second candidat, 116Y, est partagé par A*02:01, A*69:01, A*23:01 et A*24:01 mais pas A*68:01. Les fluorescences sont plus intenses pour A68 et A69, et nous pouvons suggérer que ces deux allèles partagent un épitope spécifique ciblé par un second anticorps, que nous pouvons identifier comme un anti-144TKH. La bille A*66:02 forme un noeud isolé, avec une MFI plus faible que l'on peut attribuer à un anticorps anti 163EW.

HLA-DQ et épitopes 74EL-67VT

La figure 3.12 présente le résultat d'une analyse d'un profil d'immunisation anti-DQ. Chez ce patient, les anticorps ciblent l'ensemble des antigènes appartenant au DQ6, DQ7, DQ8 et DQ9. Les anticorps anti-DQ2, DQ4 et DQ5 sont négatifs. Le premier eplet candidat, présent sur l'ensemble des billes positives est le 74EL. En haut à gauche de la figure générée, il est précisé que cet eplet dépend de la chaîne β du DQ.

Une analyse plus approfondie révèle que la bille portant la chaîne DQB1*06:01 présente une MFI inférieure aux autres billes positives (2600 contre une moyenne de 13000). Or, la fonction "View positive eplets" révèle qu'un second épitope, le 67VT, est partagé par l'ensemble des chaînes bêta DQB1*06:02, *06:03, *03:01, *03:02, *03:03 mais pas DQB1*06:01. On peut supposer que deux anticorps sont présents dans ce sérum : un premier cible l'épitope 74EL et permet d'expliquer la positivité du DQB1*06:01, auquel se surajoute un deuxième anticorps anti-67VT expliquant les fluorescences plus élevées des autres billes. Ce deuxième épitope, potentiellement immunogène, est à ce jour non "Antibody Verified".

	127K	116Y	114H	144TKH	66KH	107W	163EW
Antigènes présent au sein du kit	A*02:01	A*02:01	A*02:01	A*02:01	A*02:01	A*02:01	A*66:02
	A*23:01	A*23:01	A*23:01	A*68:01	A*23:01	A*69:01	
	A*24:01	A*24:01	A*24:01	A*69:01	A*24:01		
	A*68:01	A*69:01	A*69:01				
	A*69:01						
Antigènes non présent au sein du kit	A*02:02	A*01:30	A*01:30	A*02:02	A*02:02	A*02:02	A*02:16
	A*23:02	A*03:19	A*24:04	A*02:30	A*23:02	A*02:04	A*66:03
	A*23:05	A*68:15	B*15:17	A*68:03	A*24:04	A*02:05	B*07:02
	A*68:03	B*07:02	B*27:05	A*68:04	A*31:02	...	B*13:01
	B*27:05

Figure 3.10: Tableaux résumant l'ensemble des associations épitopes-allèles. La partie supérieure intègre uniquement les antigènes présents au sein du kit, alors que la partie inférieure affiche la liste exhaustive de l'ensemble des allèles.

Des expériences complémentaires pourraient être nécessaires afin de confirmer son caractère immunogène.

HLA-DR et épitopes 70DA, 71A

La figure 3.13 présente un graphe HLA-DR plus complexe. On observe deux sources d'immunisation. La première est représentée par l'épitope 70DA (DRB1*01:03, DRB1*04:02, DR11, DR12, DR13, DR16, DRB5*01:01), et permet d'expliquer des positivités dissociées au sein d'un même sous-groupe sérologique (DR1 et DR4). Au second plan, on constate que le cluster DR15 et que la bille DRB5*02:02 ne portent pas 70DA mais partagent l'épitope 71A, nous permettant de supposer que seule la présence de deux anticorps permet de comprendre le profil d'immunisation.

Toutefois, ces deux épitopes sont composés d'acides aminés proches sur les protéines du HLA-DR, et nous pouvons formuler une seconde hypothèse. En effet, le 70DA est constitué d'un acide aspartique en position 70 et une alanine en position 73. L'épitope 71A est constitué d'une glutamine en position 70, d'une alanine en position 71 et d'une alanine en position 73. Il y a donc une substitution en position 70 entre deux acides aminés hydrophiles. Nous pouvons suggérer qu'il existe un seul anticorps ciblant ce même groupe d'acides aminés 70-73 avec une spécificité hétérogène, et que ce profil révèle un épitope non décrit par la base de données "Epitope Registry".

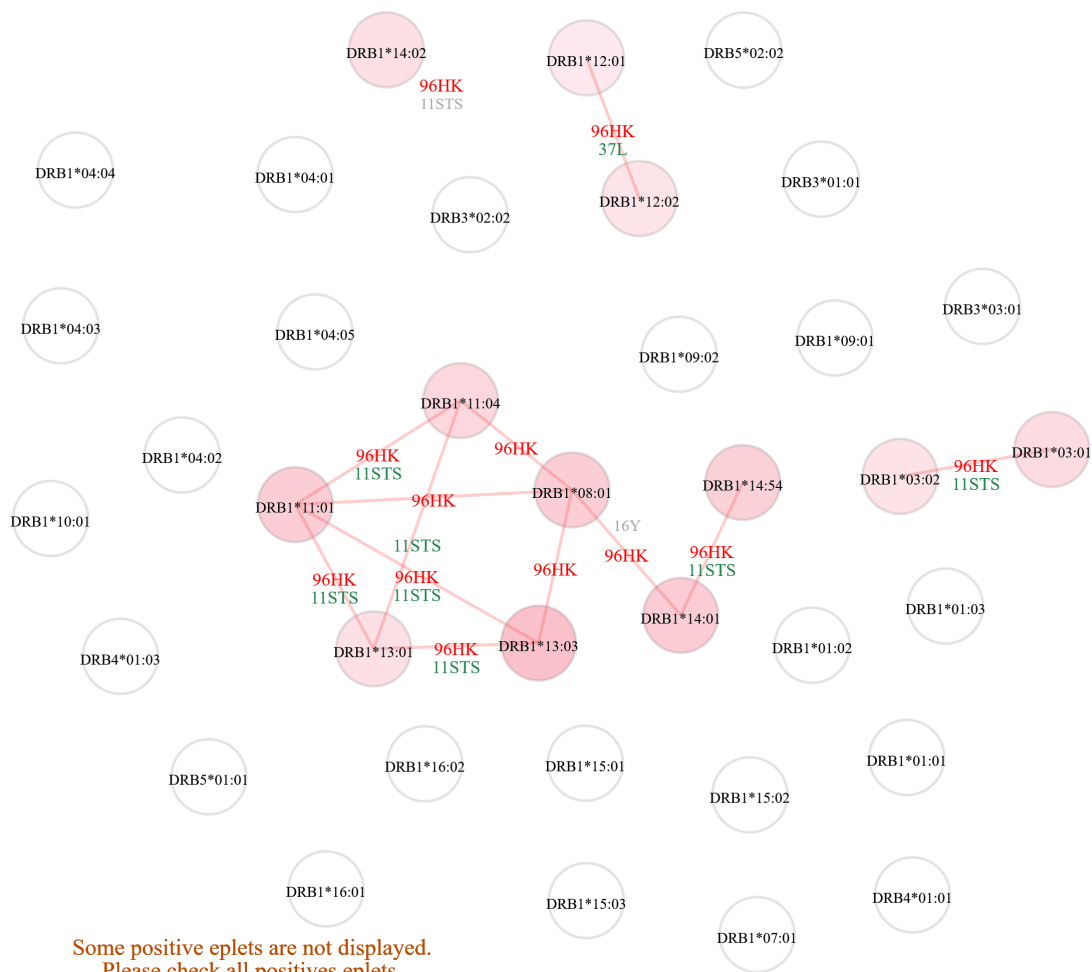
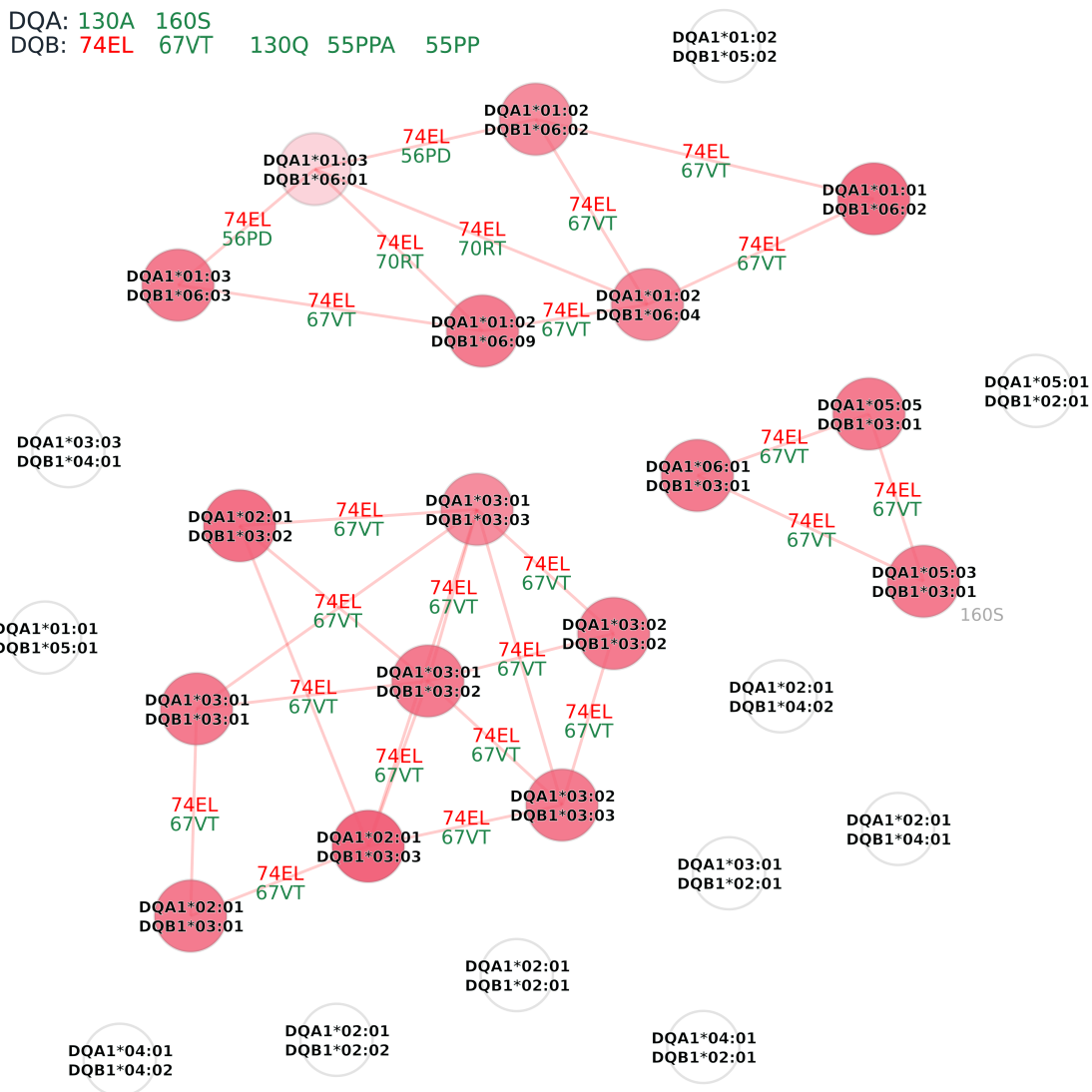


Figure 3.11: Figure générée par HLA Graph correspondant à l'analyse d'un sérum présentant un anticorps anti-96HK (HLA-DR).



74EL	67VT
DQB1*03:01	DQB1*03:01
DQB1*03:02	DQB1*03:02
DQB1*03:03	DQB1*03:03
DQB1*06:01	DQB1*06:02
DQB1*06:02	DQB1*06:03
DQB1*06:03	DQB1*06:04
DQB1*06:04	DQB1*06:09
DQB1*06:09	

Figure 3.12: Graphe et tableaux générés par HLA Graph correspondant à l’analyse d’un échantillon présentant des anticorps anti-DQ6, -DQ7, -DQ8 et -DQ9. Le tableau présente l’ensemble des chaînes du DQB (présentes dans le kit) portant les épitopes 74EL et 67VT. La chaîne DQB1*06:01, qui est la seule bille positive présentant des MFI significativement plus faibles, ne porte pas l’épitope 67VT.

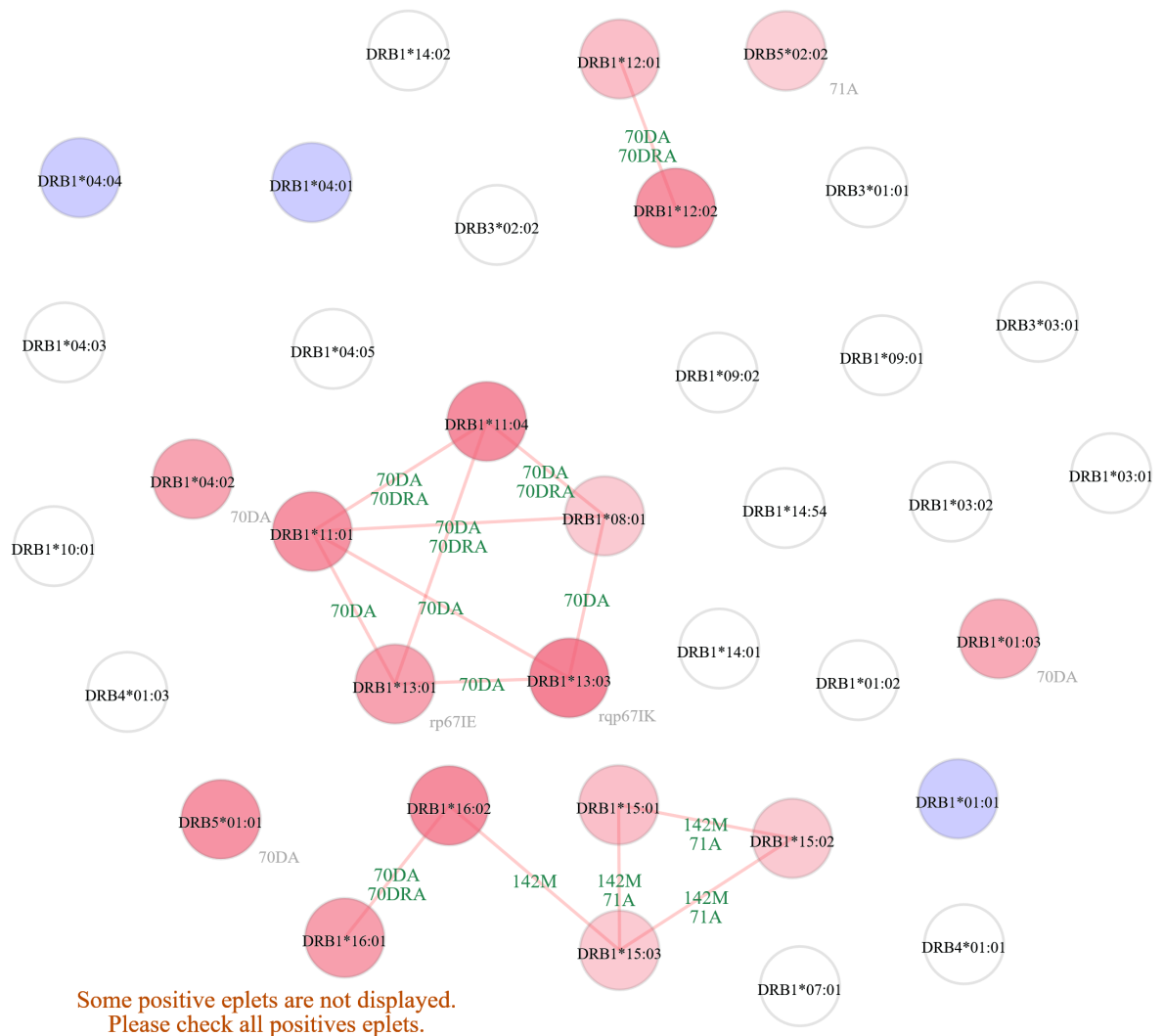


Figure 3.13: Figure générée par HLA Graph correspondant à l'analyse d'un sérum présentant un anticorps anti-70DA et anti-71A (HLA-DR).

Chapitre 4

Discussion

4.1 La corrélation des fluorescences reflète les réactions croisées des anticorps anti-HLA

Le suivi des anticorps anti-HLA est fondamental en transplantation d'organes. En particulier, le dépistage de ces anticorps doit systématiquement être réalisé avant la greffe pour prévenir les rejets hyperaigus. En raison de l'affiliation phylogénétique des différents gènes du système HLA, des séquences d'acides aminés sont partagées par des antigènes différents. L'exemple le plus emblématique en est l'épitope public Bw4, qui intègre environ 5 acides aminés présents à la surface d'un grand nombre de molécules HLA-A et HLA-B. Par conséquent, il est important d'identifier les anticorps susceptibles de fixer plusieurs antigènes du HLA. De nombreux travaux ont été réalisés aux cours des dernières années sur ce sujet, et l'utilisation d'algorithmes prédictifs de rejets utilisant le concept de "matching épitopique" fait l'objet de nombreuses publications [34] [45] [46].

Les tests de cytométrie de flux sur billes (Luminex™) sont les plus répandus pour le dépistage et l'identification des anticorps anti-HLA, mais déterminer la spécificité des anticorps est parfois difficile. Pour décrire avec précision la fréquence des réactions croisées des anticorps anti-HLA, nous avons collecté les données d'un grand nombre de tests SA. Nous avons montré qu'une représentation graphique basée sur le calcul de distances de Spearman constitue un outil robuste et intuitif pour comprendre les profils de réactivités croisées rencontrés couramment.

Tout d'abord, notre analyse confirme que les antigènes présentant un nombre élevé d'épitopes communs présentent des fluorescences corrélées. Par exemple, la corrélation la plus forte observée concerne les deux billes HLA-B*57:01 et -B*57:03, qui ne diffèrent dans leur séquence que d'un seul acide aminé se situant au fond de la poche de présentation peptidique et qui n'est pas accessible aux anticorps. D'un autre côté, les antigènes les moins corrélés présentent peu d'épitopes communs, avec des séquences d'acides aminés très différentes (exemple des allèles HLA-DRB1*01:01 et HLA-DRB1*03:02, qui ne présentent aucun épitope vérifié commun avec $\rho = 0.345$).

Deuxièmement, notre analyse confirme l'importance des épitopes publics Bw4 et Bw6. Nous observons que le partage de cet épitope entre deux allèles augmente fortement les corrélations, alors qu'un mismatch en induit la diminution. Par exemple, les deux allèles HLA-B*49:01 et HLA-B*50:01, qui appartiennent au même groupe sérologique B21 mais qui ne partagent pas le même Bw, ont une corrélation modérément plus faible $\rho = 0,797$. De même, HLA-B*27:08 montre des scores plus élevés avec les allèles HLA-B*81:01 et HLA-B*07:02 (épitopes publics Bw6, respectivement $\rho = 0,889$ et $0,881$) que HLA-B*27:05 (épitope Bw4, $\rho = 0,868$) du même groupe sérologique. Nous observons également que l'ensemble des antigènes du HLA-A portant Bw4 présente des corrélations plus faibles avec les autres antigènes HLA-A qu'avec certains antigènes du groupe Bw4 (A*32:01/HLA-B*59:01, $\rho = 0,802$). HLA-A*25:01 présente des corrélations inférieures au seuil de 0.8 avec tous les autres antigènes du groupe A10 (HLA-A*25:01 / -A*26:01 = $0,772$ et HLA-A*25:01/HLA-A*66:01 = $0,749$). Également, A*32 n'est pas fortement corrélé avec les autres antigènes du groupe A19. Certaines interactions particulières mettent en valeur le rôle de certains épitopes, telle que la corrélation observée entre HLA-B*15:12 et HLA-B*45:01 ($\rho = 0,802$). Cette interaction peut s'expliquer d'une part par l'épitope public Bw6 commun, mais aussi par l'eplet 163LS/G (partagé par HLA-B*15:12 et HLA-B*45:01 mais pas par les autres antigènes B15 portant Bw6).

Notre modèle, par l'intermédiaire des graphes, permet d'explorer la forte incidence de l'immunisation contre certains antigènes rares, qui est le plus souvent expliquée par la présence de réactions croisées. L'exemple le plus marquant de notre analyse concerne l'allèle HLA-B*46:01, dont les corrélations les plus élevées sont observées avec le locus HLA-C. Il est bien établi que l'allèle B*46:01 porte des épitopes commun avec le HLA-C en raison d'un événement de micro-version génétique qui serait survenu en Asie orientale il y a environ 40

000 ans [15]. Ainsi, cet allèle est fréquent au sein de certaines populations asiatiques (6.1%), mais est très rare au sein de la population caucasienne que nous avons analysée. Toutefois, nous observons que 602 de nos 5907 échantillons de classe I (10.2%) sont positifs pour HLA-B*46:01 avec une MFI > 2000. Par conséquent, la grande proportion de patients immunisés contre l'allèle HLA-B*46:01 résulte d'une immunisation antérieure contre les eplets HLA-C plutôt que d'une exposition directe à l'antigène HLA-B46.

Concernant le HLA-C, nous reconstituons les deux groupes HLA-C1 et HLA-C2 définis par l'affinité aux molécules KIR. Le graphe HLA-C est constitué de deux clusters s'articulant autour de deux épitopes principaux : 76VS76VRN (également partagé par B*46:01) et 80K. La topologie de ce graphe confirme le caractère fortement immunogène de ces deux épitopes. Nous pouvons suggérer qu'un mismatch de l'un de ces deux épitopes pourrait être associé à un mauvais pronostic.

4.2 HLA Graph : un nouvel outil de matching épitopique

Le concept de matching épitopique est essentiel pour la prise de décision en transplantation d'organes solides. L'algorithme HLAMatchmaker fut le premier outil rendant accessible cette approche aux biologistes en routine. Toutefois, son utilisation en pratique reste relativement marginale. En effet, l'utilisation d'HLA Matchmaker est basée sur l'utilisation de fichiers au format Excel n'apportant pas de support visuel et dont l'utilisation nécessite une formation.

En établissant une carte moderne des réactions croisées observées en pratique, les graphes constituent un support d'aide à la validation des profils d'immunisation. Ils permettent de constater la fréquence d'une co-positivité observée, afin d'en déduire la présence d'épitopes communs. A l'inverse, les tests SA peuvent présenter des bruits de fond non spécifiques qu'il est plus simple d'identifier comme artéfactuels avec une meilleure connaissance des réactivités croisées potentielles.

Afin de rendre le matching épitopique plus accessible en routine, nous avons développé HLA Graph - un outil utilisant ces réseaux d'interactions et les données de fluorescence d'un échantillon. Grâce au modèle des distances de Spearman, cet outil apporte un support visuel aidant la compréhension des réactivités croisées liées au partage d'épitopes communs.

Cet outil suit des règles d'utilisation simple, permettant un accès rapide à l'utilisateur *via* les données fournies par le logiciel d'interprétation HLA FUSION™ utilisé par les biologistes. La présentation visuelle, sous forme de graphe, permet d'identifier rapidement la ou les sources d'immunisation. Un algorithme similaire à celui utilisé par HLAMatchmaker permet de proposer les épitopes les plus probablement ciblés.

Plusieurs avantages peuvent être tirés de l'utilisation d'HLA Graph. Tout d'abord, il permet de prédire la réactivité des antigènes non testés par le kit. Par exemple, l'épitope 70DA est partagé par plusieurs antigènes du HLA-DR, et touche des allèles isolés au sein d'un même groupe sérologique (Fig. 3.13). Notamment, cet épitope est porté par le DRB1*04:02, mais pas les autres allèles du DR4 testés par le kit (DRB1*04:01, DRB1*04:03, DRB1*04:04, DRB1*04:05). Dans le cas d'un crossmatch virtuel, un donneur DR4 présentant un allèle rare et non testé peut poser des difficultés d'interprétation. En analysant l'ensemble des données fournies par HLA Graph, il est possible de prédire que cet épitope est porté par les allèles rares DRB1*04:12, DRB1*04:14, DRB1*04:15 (non exhaustif). Ces antigènes devraient donc être interdits face à un anticorps anti-70DA. De plus, comme nous l'avons vu au travers de cet exemple, la présentation visuelle permet d'identifier rapidement plusieurs sources d'immunisation sous forme de clusters individualisés.

Par ailleurs, en confrontant les MFI aux épitopes positifs, il est également possible d'identifier les antigènes ciblés par plusieurs anticorps (exemple des épitopes 74EL et 67VT 3.3.2). Cette approche nous a notamment permis de suggérer qu'un épitope non vérifié était potentiellement immunogène.

Des mises à jour très régulières ont été apportées à HLA Graph au cours de ces derniers mois. Le retour des utilisateurs permet de proposer des améliorations constantes, tout en gardant pour principal objectif son accessibilité et sa simplicité d'utilisation. En particulier, nous avons développé une version d'HLA Graph spécifique aux utilisateurs du kit Immucor™ (LifeCodes™).

4.3 Perspectives du modèle

Bien que l'importance de certains épitopes est bien connue (Bw4/Bw6), l'impact précis de chaque mismatch épitopique sur la survie du greffon constitue l'un des principaux enjeux

de la recherche en histocompatibilité. Au cours de ce travail, nous avons démontré que notre modèle permet d'établir un score de "distance épitopique" global, indépendant de l'impact de chaque épitope pris isolément.

Nous suggérons que l'appariement de donneur et de receveur présentant des antigènes fortement corrélés serait le témoin d'une faible distance épitopique ; ou du moins que les épitopes mismatchés seraient moins probablement la cause d'une immunisation. Ainsi, le simple calcul de la somme des épitopes mismatchés utilisés par les essais cliniques récents pourrait être moins précis que le calcul des corrélations de Spearman. Des études de survie ultérieures pourraient permettre de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Au sein d'un travail en cours, nous proposons de déterminer l'impact de chacun des eplets sur la prédiction du Spearman ρ , afin de leur attribuer un score d'immunogénicité. Pour cela, nous utilisons des classifieurs de machine learning (Forêt d'arbre aléatoire) associés à des algorithmes d'extraction de paramètres (Recursive Feature Elimination). Des résultats préliminaires confirment l'importance des épitopes les mieux décrits, et permet d'identifier les épitopes non responsables de réactions croisées. Bien que des améliorations de ce modèle sont encore nécessaires, nous estimons qu'il permettra de réduire le nombre d'épitopes immunogènes à une liste restreinte mais plus précise.

L'utilisation de ces corrélations de Spearman est toutefois dépendante du kit OneLambda™ (Labscreen™) principalement utilisé lors de notre étude. Afin de réduire ce biais, nous avons récolté des données du test de cytométrie sur billes développé par Immucor™ (LifeCodes™). L'analyse de ces données fait également l'objet d'un travail en cours d'écriture. En compilant les deux tests, nous espérons augmenter le pool d'antigènes étudiés et limiter les effets liés aux seuils de sensibilité et spécificité internes aux kits.

Chapitre 5

Conclusion

Nous estimons que le calcul des coefficients de corrélation des fluorescences constitue une métrique intéressante pour mesurer la proximité épitopique fonctionnelle entre deux antigènes du HLA. Nous espérons qu'HLA Graph, qui utilise ce modèle, devienne un outil largement utilisé par la communauté scientifique pour identifier les épitopes immunogènes les plus classiquement ciblés par les anticorps anti-HLA. À terme, ce type de modèle pourrait permettre d'estimer l'impact de chaque épitope dans le pronostic des greffes d'organes solides.

Bibliographie

- [1] J. Dausset. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematologica*, 20(1-4):156–166, 1958.
- [2] D. B Amos, Peter Alfred Gorer, and Z. B. Mikulska. An analysis of an antigenic system in the mouse (the H-2 system). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 144(916):369–380, November 1955.
- [3] Donald C. Shreffler and Chella S. David. The H-2 major histocompatibility complex and the immune response region: Genetic variation, function, and organization. In *Advances in Immunology*, pages 125–195. Elsevier, 1975.
- [4] George D. Snell, Marianna Cherry, and PETER DEMANT. H-2: Its structure and similarity to HL-A. *Immunological Reviews*, 15(1):3–25, June 1973.
- [5] J Hors, D Fradelizi, N Feingold, and J Dausset. CRITICAL EVALUATION OF HISTOCOMPATIBILITY IN 179 RENAL TRANSPLANTS. *The Lancet*, 297(7700):609–612, March 1971.
- [6] J. DAUSSET and J. HORS. HL-A and kidney transplantation. *Nature New Biology*, 238(83):150–152, August 1972.
- [7] Anaya JM. Cruz-Tapias P, Castiblanco J. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. 2013.
- [8] Olivier P. Joffre, Elodie Segura, Ariel Savina, and Sebastian Amigorena. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8):557–569, July 2012.
- [9] Karthik Dhatchinamoorthy, Jeff D. Colbert, and Kenneth L. Rock. Cancer immune evasion through loss of MHC class I antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, 12, March 2021.
- [10] Susan Feyerabend, Stefan Stevanovic, Cécile Gouttefangeas, Dorothee Wernet, Jörg Hennenlotter, Jens Bedke, and al. Novel multi-peptide vaccination in HLA-A2*01:01 sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. *The Prostate*, 69(9):917–927, June 2009.

- [11] Ryuji Okuyama, Atsushi Aruga, Takashi Hatori, Kazuyoshi Takeda, and Masakazu Yamamoto. Immunological responses to a multi-peptide vaccine targeting cancer-testis antigens and VEGFRs in advanced pancreatic cancer patients. *OncImmunity*, 2(11):e27010, November 2013.
- [12] Steffen Walter, Toni Weinschenk, Arnulf Stenzl, Romuald Zdrojowy, Anna Pluzanska, Cezary Szczylik, and al. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nature Medicine*, 18(8):1254–1261, July 2012.
- [13] Hong-Xia Wang, Wenrong Pan, Lei Zheng, Xiao-Ping Zhong, Liang Tan, Zhanfeng Liang, Jing He, Pingfeng Feng, Yong Zhao, and Yu-Rong Qiu. Thymic epithelial cells contribute to thymopoiesis and t cell development. *Frontiers in Immunology*, 10, January 2020.
- [14] James Robinson, Dominic J Barker, Xenia Georgiou, Michael A Cooper, Paul Flicek, and Steven G E Marsh. IPD-IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*, October 2019.
- [15] Hugo G. Hilton, Curtis P. McMurtrey, Alex S. Han, Zakia Djaoud, Lisbeth A. Guethlein, Jeroen H. Blokhuis, and al. The intergenic recombinant HLA-b*46:01 has a distinctive peptidome that includes KIR2dl3 ligands. *Cell Reports*, 19(7):1394–1405, May 2017.
- [16] Faviel F Gonzalez-Galarza, Antony McCabe, Eduardo J Melo dos Santos, James Jones, Louise Takeshita, Nestor D Ortega-Rivera, and al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Research*, November 2019.
- [17] Alan E. Beer, James F. Quebbeman, Jonathan W.T. Ayers, and Richard F. Haines. Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 141(8):987–999, December 1981.
- [18] P. Moncharmont. Platelet component transfusion and alloimmunization: Where do we stand? *Transfusion Clinique et Biologique*, 25(3):172–178, September 2018.
- [19] Emilio Rodrigo, Marcio F. Chedid, David San Segundo, Juan C.R. San Millán, and Marcos López-Hoyos. Acute rejection following kidney transplantation: State-of-the-art and future perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, 26(28):3468–3496, August 2020.

- [20] Villard J. Georgescu D., Perrari-Lacraz S. Anticorps anti-hla et rejet en transplantation rénale : impact des nouvelles techniques de détection. *volume 7. no. 108, 1064 - 1069*, November 2007.
- [21] Rubin Zhang. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 13(1):182–192, April 2017.
- [22] Jan Klein. Private and public antigens of the mouse h-2 system. *Nature*, 229(5287):635–637, February 1971.
- [23] B D Schwartz, L K Luehrman, and G E Rodey. Public antigenic determinant on a family of HLA-b molecules. *Journal of Clinical Investigation*, 64(4):938–947, October 1979.
- [24] Benjamin D. Schwartz, Lisa K. Luehrman, Tsung Lee, and Glenn E. Rodey. HLA serological cross-reactivity: HLA-b15 has two public antigens. *Human Immunology*, 1(4):331–345, December 1980.
- [25] C. A. Müller, G. Engler-Blum, V. Gekeler, I. Steiert, E. Weiss, and H. Schmidt. Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-b locus specificities bw4 and bw6. *Immunogenetics*, 30(3):200–207, September 1989.
- [26] Glenn E. Rodey. Public eptopes and the antigenic structure of the hla molecules. *Crit Rev Immuno*, April 1987.
- [27] Glenn E. Rodey, John F. Neylan, John D. Whelchel, Kenneth W. Revels, and Robert A. Bray. Epitope specificity of HLA class i alloantibodies i. frequency analysis of antibodies to private versus public specificities in potential transplant recipients. *Human Immunology*, 39(4):272–280, April 1994.
- [28] Anand Deshpande. The human leukocyte antigen system ... simplified. *Global Journal of Transfusion Medicine*, 2(2):77, 2017.
- [29] René J Duquesnoy. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. i. description of the algorithm. *Human Immunology*, 63(5):339–352, May 2002.
- [30] Rene J. Duquesnoy. A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level. *Human Immunology*, 67(11):847–862, November 2006.
- [31] R. J. Duquesnoy, M. Marrari, A. Mulder, L. C. D. da Mata Sousa, A. S. da Silva, and S. J. H. do Monte. First report on the antibody verification of HLA-ABC epitopes

- recorded in the website-based HLA epitope registry. *Tissue Antigens*, 83(6):391–400, May 2014.
- [32] Xiaoxiang Deng, Ulrich Storz, and Benjamin J. Doranz. Enhancing antibody patent protection using epitope mapping information. *mAbs*, 10(2):204–209, December 2017.
- [33] B.A. Bradley. The role of HLA matching in transplantation. *Immunology Letters*, 29(1-2):55–59, July 1991.
- [34] C. Wiebe, D. Pochinco, T. D. Blydt-Hansen, J. Ho, P. E. Birk, M. Karpinski, A. Goldberg, L. J. Storsley, I. W. Gibson, D. N. Rush, and al. Class II HLA epitope matching—a strategy to MinimizeDe NovoDonor-specific antibody development and improve outcomes. *American Journal of Transplantation*, 13(12):3114–3122, October 2013.
- [35] N. Lachmann, M. Niemann, P. Reinke, K. Budde, D. Schmidt, F. Halleck, A. Pruß, C. Schönemann, E. Spierings, and O. Staeck. Donor-recipient matching based on predicted indirectly recognizable HLA epitopes independently predicts the incidence ofDe NovoDonor-specific HLA antibodies following renal transplantation. *American Journal of Transplantation*, 17(12):3076–3086, July 2017.
- [36] Liesbeth Daniëls, Maarten Naesens, Jean-Louis Bosmans, Daniel Abramowicz, Evi Nagler, Steven Van Laecke, Patrick Peeters, Dirk Kuypers, and Marie-Paule Emonds. The clinical significance of epitope mismatch load in kidney transplantation: A multicentre study. *Transplant Immunology*, 50:55–59, October 2018.
- [37] Martina Schnaidt, Christof Weinstock, Marija Jurisic, Barbara Schmid-Horch, Andrea Ender, and Dorothee Wernet. HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. *Transplantation*, 92(5):510–515, September 2011.
- [38] Jonathan Visentin, Margaux Vigata, Sophie Daburon, Cécile Contin-Bordes, Véronique Fremeaux-Bacchi, Claire Dromer, and al. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation*, 98(6):625–631, September 2014.
- [39] Pauli Virtanen, Ralf Gommers, Travis E. Oliphant, Matt Haberland, Tyler Reddy, David Cournapeau, and al. SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python. *Nature Methods*, 17:261–272, 2020.

- [40] Mathieu Bastian, Sebastien Heymann, and Mathieu Jacomy. Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks. 2009.
- [41] Yifan Hu and Lei Shi. Visualizing large graphs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 7(2):115–136, January 2015.
- [42] J. D. Hunter. Matplotlib: A 2d graphics environment. *Computing in Science & Engineering*, 9(3):90–95, 2007.
- [43] Miguel Grinberg. *Flask web development: developing web applications with python.* ” O’Reilly Media, Inc.”, 2018.
- [44] Peter Parham. MHC class i molecules and kirs in human history, health and survival. *Nature Reviews Immunology*, 5(3):201–214, February 2005.
- [45] A. R. Tambur and F. H. J. Claas. Toward HLA epitope matching in clinical transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13(12):3059–3060, October 2013.
- [46] Jiabing Ma, Yicheng Mo, Menglin Tang, Junjie Shen, Yanan Qi, Wenxu Zhao, Yi Huang, Yanmin Xu, and Cheng Qian. Bispecific antibodies: From research to clinical application. *Frontiers in Immunology*, 12, May 2021.

Chapitre 6

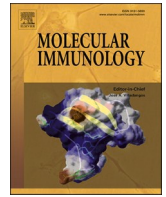
Annexes

- 6.1 Publication originale - « Antibodies against HLA cross-reactivity groups: From single antigen bead assay to immunoinformatics interpretation of epitopes »**



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Antibodies against HLA cross-reactivity groups: From single antigen bead assay to immunoinformatics interpretation of epitopes

Cédric Usureau^{a,b,c}, Edgar Lefèvre^d, Isabelle Top^{c,e}, Macha Nikolski^d, Pauline Varlet^{c,e}, Gabriel Choukroun^f, Judith Desoutter^{a,b,c}, Nicolas Guillaume^{a,b,c,*}

^a Department of Hematology and Histocompatibility, Amiens University Medical Center, Amiens, France

^b EA 4666 Hematim, Jules Verne University of Picardie, Amiens, France

^c French Speaking Society of Histocompatibility and Immunogenetic (SFHI), France

^d Bordeaux Bioinformatics Center, CNRS, IBGC CNRS UMR 5095, Bordeaux University, Bordeaux, France

^e Department of Immunology and Histocompatibility, Lille University Hospital, Lille, France

^f Department of Nephrology and Transplantation, Amiens University Hospital, Amiens, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Major histocompatibility complex
Transplantation
Antibody
Epitope

ABSTRACT

Identification of anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies (Abs) is based on Luminex™ technology. We used bioinformatics to (i) study the correlations of mean fluorescence intensities (MFIs) for all the possible allele pairs, and (ii) determine the degree of epitope homology between HLA antigens.

Using MFI data on anti-HLA Abs from 6000 Luminex™ assays, we provide an updated overview of class I and II HLA antigen cross-reactivity in which each node corresponded to an allele and each link corresponded to a strong correlation between two alleles (Spearman's $\rho > 0.8$). We compared these correlations with the serological groups and the results of an epitope analysis.

The strongest correlations concerned allele-specific Abs directed against the same antigen. For the HLA-A locus, the highest values of Spearman's ρ reflected broad specificity. For the HLA-B locus, graphs defined the HLA-Bw4 public epitope, and correlations between HLA-A and -B alleles were only present for beads with the same Bw4 public epitope. For the HLA-C locus, we identified two groups that differed with regard to their KIR ligand subclassification. Lastly, the HLA-DRB1 subgroups were part of a network. In the epitope analysis, Spearman's ρ was related to the number of matched epitopes within pairs of alleles.

The combination of Spearman's ρ with simple, undirected graphing constitutes an effective tool for understanding routinely encountered cross-reactivity profiles. Based on this model, we have implemented an online data visualization tool available at <http://cusureau.pythonanywhere.com/>.

1. Introduction

Assaying for anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies is essential in organ and hematopoietic stem cell transplantation because their generation can lead to allograft rejection (Gladstone and Bettinotti, 2017; Zhang and Reinsmoen, 2020). Data from single-antigen bead (SAB) assays are routinely analyzed before transplantation (in order to risk-stratify transplant recipients) and after transplantation (in order to monitor potential graft rejection by the host's immune system). The Luminex™ SAB assay comprises almost 100 beads with discontinuously arranged, overlapping antigens that display epitopes; hence, predicting

recipient antibody reactivity against the donor graft is challenging.

Over many decades, the HLA research community has developed models of the immunization profiles observed in recipients. The resulting anti-HLA antibodies can react with “private” epitopes (shared by very few other HLA allele products) or “public” epitopes (encoded by many different HLA alleles). Cross-reactive groups (CREGs) have been defined on the basis of serological cross-reactivity patterns. The term “public determinant” is employed if a serum sample reacts against two or more specific patterns within a single CREG (Colombani et al., 1974). Many public determinants correspond to structurally defined epitopes. By way of an example, the Bw4/Bw6 public epitopes differentiate

Abbreviations: Ab, antibody; HLA, human leukocyte antigen; MFI, mean fluorescence intensity; CREG, cross-reactive group.

* Corresponding author at: Department of Histocompatibility, Amiens University Medical Center, F-80054, Amiens, France.

E-mail address: guillaume.nicolas@chu-amiens.fr (N. Guillaume).

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.02.020>

Received 1 May 2020; Received in revised form 26 January 2021; Accepted 23 February 2021

Available online 2 March 2021

0161-5890/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

between two HLA-B antigen profiles and are also shared by a few HLA-A molecules. More recently, the use of molecular templates has enabled HLA proteins to be decomposed into potentially immunogenic sequences of epitopes (referred to as “eplets”) in an HLA-Matchmaker bioinformatics analysis (Duquesnoy and Askar, 2007). Many HLA antigens detected by specific sera possess unique eplets and are recorded in the International Epitope Registry (<https://www.epregistry.com.br/>) as having been experimentally verified (Duquesnoy, 2016). As a modern, epitope-based HLA matching tool, HLA-Matchmaker provides a better understanding of antibody profiles and thus improves the identification of critical mismatches (Duquesnoy, 2018).

Hence, we retrospectively analyzed raw data from Luminex™ LAB-Screen™ SAB assays by studying the correlation between the antibodies’ mean fluorescence intensity (MFI) and the shared epitopes. We hypothesized that a strong correlation would reflect epitope similarity between two antigens. To test this hypothesis, we elaborated a model that compared the MFI correlations with CREGs, serological groups, and allelic subgroups. We built easy-to-use networks that facilitated the biological and clinical interpretation of SAB assay results. By providing a better understanding of antibody profiles, these models might help us to identify determinant epitopes with potential clinical relevance.

2. Materials and methods

2.1. Study samples

We retrospectively analyzed data from class I (SA1) and class II (SA2) Luminex™ LABScreen™ SAB assays (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) performed on ethylenediaminetetraacetic acid EDTA-treated serum samples, in order to avoid a complement interference phenomenon (Schnaidt et al., 2011; Schwaiger et al., 2014; Visentin et al., 2014a), collected at Amiens University Medical Center (Amiens, France) and Lille University Medical Center (Lille, France) between January 2015 and June 2019. The assayed samples came from (i) patients on the organ transplant waiting list, (ii) patients just before hematopoietic stem cell transplantation, (iii) patients being monitored after receipt of a kidney allograft, and (iv) patients who were refractory to platelet transfusions.

Data from 5908 SA1 assays and 6103 SA2 assays were acquired. The SA1 panel comprised 31 beads with HLA-A antigens, 50 with HLA-B antigens, and 16 with HLA-C antigens. The SA2 panel comprised 29 beads with HLA-DRB1 antigens, 28 with HLA-DQB1/-DQA1 antigens, and 31 with HLA-DPB1/-DPA1 antigens. Indeed, each HLA-DQ or HLA-DP bead carries two different antigens on its surface (HLA-DQA1/-DQB1 and HLA-DPA1/-DPB1 respectively). The serological equivalents of HLA-A, -B, -C, DRB1 alleles were defined according to the HLA dictionary 2008 (Holdsworth et al., 2009).

2.2. Pattern creation

We extracted MFI values (trimmed means) from the .csv files generated by HLA-Fusion™ software (One Lambda). All samples with a high background (negative control bead with a threshold greater than 500) were excluded. These tables show alleles in columns and samples in rows. The correlation was calculated for each pair.

2.3. Computing networks

Graphs were created with Gephi software (version 0.9.2, GitHub, San Francisco, CA). To compare the Bw4/Bw6 public epitopes and the serological subgroups, we mapped the Spearman’s distances between beads and then created non-directed graphs. Each bead was represented by a node, and the links corresponded to correlations between beads. For the HLA-A, -B, -C and -DRB1 networks, we filtered out links with a value below 0.8 and thus selected strong correlations only. The layouts were generated using Hu’s algorithm (Hu et al., 2019). Expansion and a few

manual adjustments were performed to improve visibility. The node links corresponded to cross-reactivity subgroups. For the HLA-B*46:01/HLA-C network, the layouts were generated using the Force Atlas algorithm implemented in the Gephi software. The Euclidian distances between C nodes and B*46 nodes were proportional to Spearman’s ρ . DQ and DP networks are difficult to describe because both beads both carry HLA-DQB1/-DQA1 and HLA-DPB1/-DPA1 antigens and so linkage disequilibrium may induce variation in the correlations. Hence, we developed HLA Graph to interpret these specific loci. This webtool is available online at <http://cureau.pythonanywhere.com/>. The terms of use are detailed in the “Help” section of the website. HLA Graph helps to analyze the anti-HLA antibodies in a single sample. Once the user has uploaded a datatable containing MFI values from an SA1 or an SA2 assay, HLA Graph’s workflow is as follows:

- Extract positive antigens towards preset MFI thresholds.
- Using empty graph templates, highlight (in shades of red) the positive beads (i.e. proportionally to the MFI). Graph templates for HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1 and -DPA1 are shown in the present manuscript’s figures and supplemental data.
- Highlight in red the links between positive beads, which are usually correlated.
- From the eplet sequences provided by HLA-Matchmaker, identify potentially immunoreactive eplets by applying the following rules:
 - o Not reactive: eplet carried by one or more of the negative beads.
 - o Potentially reactive (displayed in green): eplets carried by one or several positive beads.
 - o Probably reactive (displayed in red): eplets carried by all of the positive beads.
- Build a datatable listing all known antigens that carry the reactive eplets, according to HLA-Matchmaker.

2.4. Figure design

A correlation matrix was obtained by using the “scatter matrix” function in the pandas.plotting Python package (Python software foundation, Beaverton, OR). Boxplot and scatter plots were built with the corresponding functions from the matplotlib.pyplot package in Python (<https://ieeexplore.ieee.org/document/4160265>).

Elements in the panel were sorted by bead “ID number”. Each bead was coated with a single antigen representing a single allele. Each cell corresponded to the Spearman distance between two beads; the cell’s color ranged from light blue (most strongly correlated, with low distances) to dark blue (least strongly correlated, with high distances). Groups of cells close to diagonal may correspond to allelic subgroups.

2.5. HLA-Matchmaker analysis

The HLA-Matchmaker tool describes the sequence locations of antibody-verified eplets and polymorphic residues (i.e. candidates for the definition of additional epitopes). We used the “HLA-A, -B, -C and HLA-DRB1 matching for up to 1000 cases (v02)” Excel spreadsheet file to count the number of antibody-verified eplet matches and the total number of eplet matches (i.e. verified and non-verified eplet matches) for the two beads in each pair.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed using the SciPy package in Python. To study the cross-reactivity between the different beads, we calculated the MFI correlation between the two beads in each pair. Given that the MFI data included outliers and were not normally distributed, we calculated Spearman’s rank correlation coefficients (denoted as ρ). The MFI cut-off for positivity was >2000 . We used a t-test to compare Spearman’s distances between groups formed by the number of eplet matches. The threshold for statistical significance was set to $p < .05$.

3. Results

3.1. Spearman's ρ clearly identifies co-positive beads

We focused our analysis on HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1/DQA1 and DPB1/DPA1 loci. To identify strongly correlated pairs of HLA alleles, we calculated Spearman's ρ and thus obtained a distance matrix. We identified 574 pairs with a Spearman's ρ above 0.8 (47, 172, 39, 31, 33 and 54 correlations for HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQB1/DQA1 and DPB1/DPA1, respectively) (Supplemental S1). The strongest correlation (combining 4 loci) was found for two HLA-B*57 alleles (B*57:01 and B*57:03 ($\rho = 0.969$)). In contrast, the weakest correlation was found for two alleles from the HLA-DRB1*01 and HLA-DRB1*03 genes (DRB1*01:01 and DRB1*03:02: $\rho = 0.356$) (Supplemental S2).

3.2. Spearman's ρ clearly identifies serological subgroups

Having assumed that Spearman's ρ reflects co-positivity, we used the ρ values to build networks, identify co-positivity profiles, and compare locus networks with well-established antigen CREGs. We built HLA-A networks in which nodes with a common serological subgroup appeared in the same color (Fig. 1). HLA-A, B, C, DRB1, DQB1/DQA1 and DPB1/DPA1 networks were used as the empty template for HLA Graph.

3.2.1. Analysis of anti-class I antibodies through specific features of HLA-A, -B and -C antigen

For the HLA-A locus, beads reflecting immunization against broad specificities HLA-A2, -A9 (subgroups: A23, A24), -A10 (subgroups A26, A34, and A66 but not A25), -A19 (subgroups A29, A30, A31, A33, and A74 but not A32) and -A28 (subgroups A68, A69) formed distinct clusters (Fig. 1). A*25:01 had a Spearman's ρ just below the cut-off of 0.8, as did the other beads forming the HLA-A10 group (A*25:01/A*26:01 = 0.772 and HLA-A*25:01/HLA-A*66:01 = 0.749).

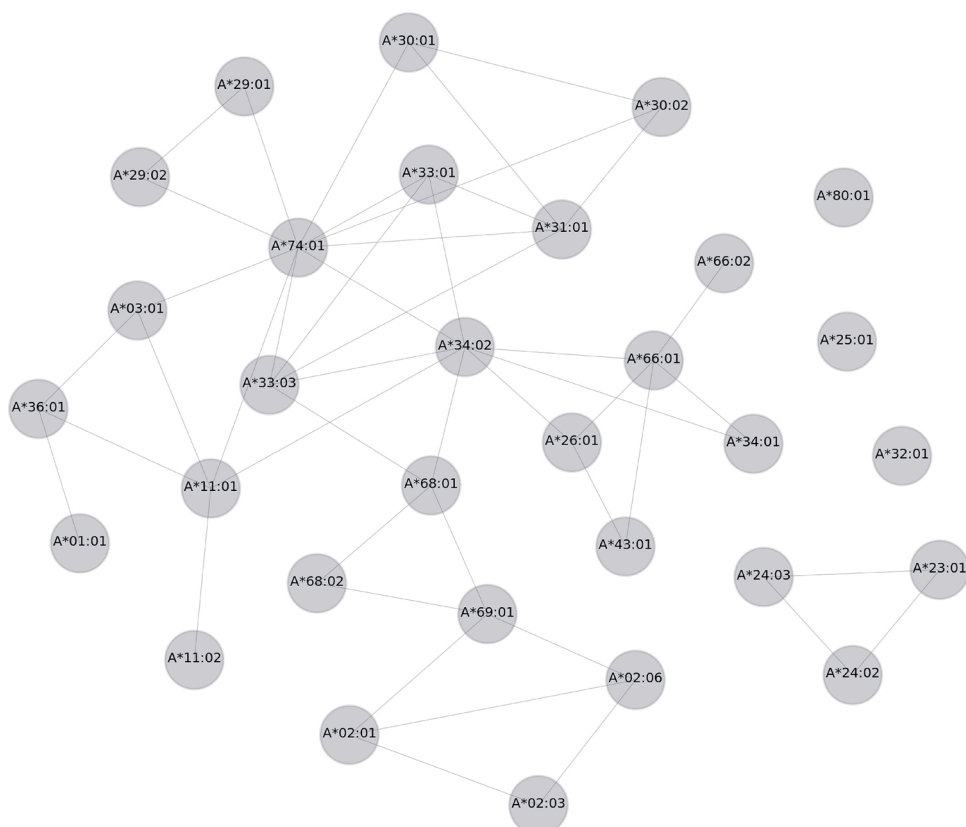


Fig. 1. the Spearman's distance network for HLA-A.

Links with a Spearman's ρ value < 0.8 were filtered out. Stronger correlations are displayed as thicker, more intensely colored lines. Isolated nodes (0 degrees) are displayed in grey. The node colors represent different CREGs or serological subgroups, forming distinct clusters. Except for HLA-A*80:01, all isolated nodes carry HLA-Bw4 antigens. This network serves as an empty template or HLA Graph. Combined with sample MFI values, HLA Graph highlights positive nodes, links and eplets on these templates.

For HLA-B locus, serological subgroups in the panel test were represented by HLA-B5 (subgroups: B51, B52), -B12 (B44, B45), -B14 (B64, B65), -B15 (B62, B63, B70, B71, B72, B75, B76, B77), -B16 (B38, B39), -B17 (B57, B58), -B21 (B49, B50), -B22 (B54, 55, 56) and -B40 (B60, B61) subtypes. With the exception of HLA-B15 and HLA-B21 subtypes, all tested alleles were strongly interlinked (Supplemental S1 and S3).

By way of an example, HLA-B40 is represented by three strongly interlinked ($p > 0.905$) alleles (HLA-B*40:01 for HLA-60 and HLA-B*40:02/-B*40:06 for HLA-B61). HLA-B21 was represented by only two alleles (B*49:01 and B*50:01), for which Spearman's ρ was slightly below the cut-off of 0.8 ($\rho = 0.797$).

The polymorphism found in the HLA-B*15 allelic subgroup is well known. The SA1 kit includes 8 HLA-B15 beads from 7 different serological subgroups (the B*15:02 and B*15:11 alleles belong to the same B75 subgroup). The HLA-B*15:01 (B62), -B*15:02 (B75), -B*15:03 (B72), -B*15:10 (B71) and -B*15:11 (B75) alleles share the Bw6 antigen specificities and are fully interconnected. However, HLA-B*15:12 (B76 Bw6 serological equivalent) was weakly correlated with all the other HLA-B*15 alleles (the highest correlation was with B*15:01: $\rho = 0.679$). For the Bw4 antigen specificities, HLA-B*15:16 (B63 Bw4) was more strongly correlated with HLA-B*15:13 (B77 Bw4) ($\rho = 0.812$) than with the other HLA-B*15.

For the HLA-C locus, HLA-C antigens are known to be ligands for KIR receptors, which are key regulators of NK cell activity. We identified two groups that differed with regard to their KIR ligand subclassification (Parham, 2005). We classified the HLA-C alleles in our antibody detection panel according to the KIR-ligand group. The group 1 alleles included HLA-C*01:02, -C*03:02, -C*03:03, -C*03:04, -C*07:02, -C*08:01, -C*12:03, -C*14:02, and -C*16:01. The group 2 HLA-C alleles included HLA-C*02:02, -C*04:01, -C*05:01, -C*06:02, -C*15:02, and -C*17:01. Moreover, these two KIR-ligand groups were interconnected by two alleles: HLA-C*14:02 (from group 1) was correlated with HLA-C*04:01 (from group 2), with $\rho = 0.830$ (Fig. 2).

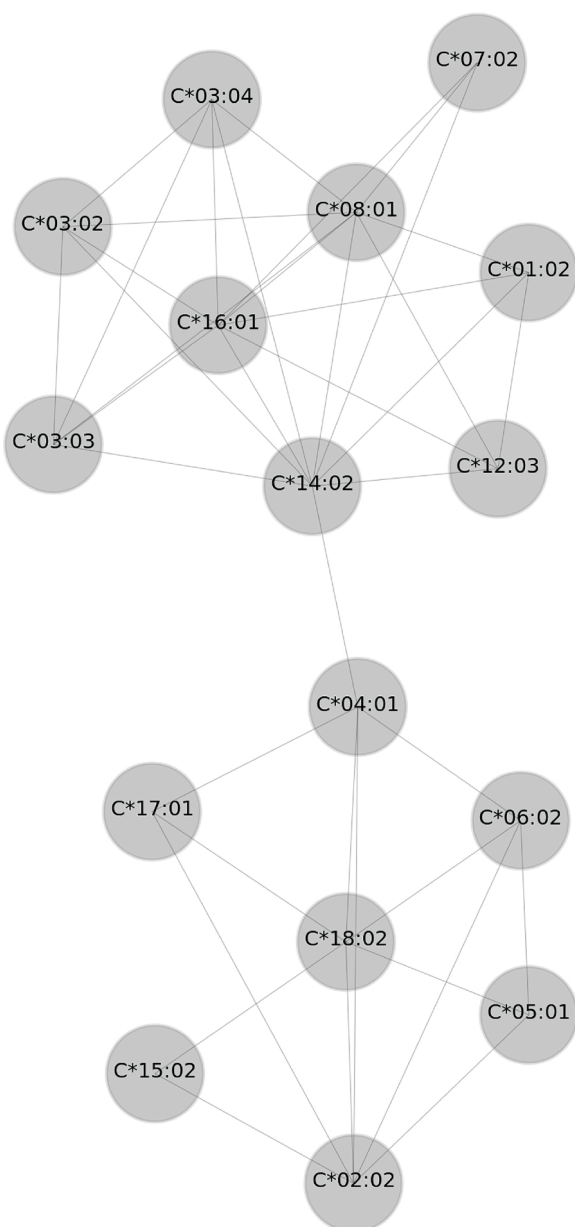


Fig. 2. the Spearman's distance network for HLA-C. Links with a Spearman's ρ value < 0.8 were filtered out. Stronger correlations are displayed as thicker, more intensely colored lines. There are no isolated nodes. The network forms two distinct clusters, corresponding to the presence of the 80 K eplet (blue) or the 76VS76VRN eplet. This network serves as a blank canvas for HLA Graph. Combined with sample MFI values, HLA Graph highlights positive nodes, links and eplets on these templates.

3.2.2. Analysis of anti-Class II DRB1 reactivity

For the HLA-DRB1 locus, we found that the application of a Spearman's ρ cut-off of >0.8 to the HLA-DR1, -DR2 (DR15 and DR16 subtypes), -DR3, -DR4 and -DR9 subgroups resulted in a non-interconnected graph, with distinct clusters (Supplemental S4). HLA-DRB1*10:01 and HLA-DRB1*07:01 alleles (the only beads representative of their serological subgroups) were isolated, with the other HLA-DRB1 genes. It is noteworthy that the highest Spearman ρ value for the HLA-DRB1*07:01 allele was well below 0.8 (DRB1*07:01/DRB1*09:02: $\rho = 0.691$), suggesting that this entity is poorly cross-reactive with the other tested alleles.

The subnetworks composed by the HLA-DR5 (DRB1*11, DRB1*12)/HLA-DR6 (DRB1*13, DRB1*14) and HLA-DR8 subgroups displayed

interactions that were more difficult to interpret.

We did not confirm serological data for the HLA-DR11 and -DR12 subtypes, both of which belong to the HLA-DR5 serological subgroup. The strongest correlation was between the HLA-DRB1*11:01 and -DRB1*12:01 beads. ($\rho = 0.730$). The same was true for the HLA-DRB1*13 and -DRB1*14 alleles (composing the HLA-DR6 subgroups), where the highest Spearman's ρ was below 0.8 (HLA-DRB1*14:02/-DRB1*13:01, $\rho = 0.794$). In contrast, we found strong correlations between HLA-DRB1*08 on one hand and the HLA-DRB1*11:01 ($\rho = 0.838$), -DRB1*13:03 ($\rho = 0.865$) and -DRB1*14:01 ($\rho = 0.806$) alleles on the other; these correlations cannot be explained by conventional CREGs.

3.2.3. Analysis of the CREG specificities involving the HLA-A locus

CREG 1C (HLA-A1, -A3, -A9, -A11, -A29, -A30, -A31, -A36, and -A80) (Rodey et al., 1994) was characterized by a cluster of HLA-A1, -A3, -A11, and -A36 subtypes. HLA-A*80:01 was correlated with other CREG A1 alleles, with a Spearman's ρ below 0.8 (0.779 for HLA-A*80:01/-A*36:01, and 0.748 for HLA-A*80:01/-A*11:01).

CREG 2C (A2, A9, A28, B17) was only represented by a strong correlation between HLA-A*02:01/-A*02:06 and HLA-A*69:01 ($\rho = 0.810$ and 0.827, respectively); conversely, HLA-A68 was linked to A2 with a lower Spearman correlation ($\rho = 0.763$ with A*02:06). Indeed, HLA-A9 (A*23:01, A*24:02 and A*24:03 alleles) was isolated and lacked strong correlations with other subtypes.

CREG 10C (HLA-A10, -A11, -A28, -A32, -A33, -A43, -A74) was represented by a strong correlation between the HLA-A*43:01 allele and HLA-A*26:01 and HLA-A*66:01 and a weaker correlation with HLA-A*25:01 ($\rho = 0.680$), as expected from the low correlation between A*25 and other A10 antigen specificities. Moreover, the HLA-A*74:01 allele (forming a central, connected node) was strongly correlated with the A34 CREG A10 member (HLA-A*74:01/HLA-A*34:02, $\rho = 0.831$). However, we also highlighted a strong correlation between HLA-A*74:01 and HLA-A*03:01 ($\rho = 0.827$), which might correspond to unknown or unexplained cross-reactivity (Fig. 1).

3.2.4. Analysis of the HLA-Bw4 and HLA-Bw6 antigen specificities

By including all HLA-B alleles detected by a single antigen, the resulting networks showed distinct clusters that matched the public epitopes previously described by serological methods - confirming that our bioinformatics tool identified cross-reactive beads with shared epitopes. We next focused on the Bw4 and Bw6 public epitopes described by Van Rood and Van Leeuwen (Van Rood and Van Leeuwen, 1963). The antigen specificities were A23, 24, 25, 32 and B13, 27, 37, 38, 44, 47, 49, 51, 52, 53, 57, 58, 59, 63, and 77 in the Bw4 subgroup, and B7, 8, 18, 35, 39, 41, 42, 45, 46, 48, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 64, 65, 67, 71, 72, 73, 75, 76, 78, 81, and 82 in the Bw6 subgroup. An analysis of closely related HLA-B alleles that differentially expressed Bw4 and Bw6 suggested that these epitopes are determined by amino acid residues 77 and 80–83 on the α -1 helix (Müller et al., 1989).

The correlation between beads and Spearman's ρ clearly identified antigenic associations between these public epitopes. To characterize this profile in more detail, we focused on the Bw4 antigen specificities, which have been described for a few HLA-A proteins (A23, A24, A25, and A32). We showed that ρ values above 0.8 for HLA-A vs. HLA-B alleles were only present for beads sharing the Bw4 public epitope (HLA-A*32:01/HLA-B*59:01: $\rho = 0.802$). Moreover, it is noteworthy that HLA-A9 (A23, A24 subtypes), -A25 and -A32 were not strongly correlated (i.e. ρ was below 0.8) with any of the other HLA-A alleles. A general approach confirmed that the distances for HLA-A/HLA-B pairs both carrying Bw4 was lower than the distances for HLA-A pairs not sharing Bw4 (Fig. 3).

3.3. The eplet approach, based on Spearman's ρ

Even though the HLA-B allele's correlations were primarily

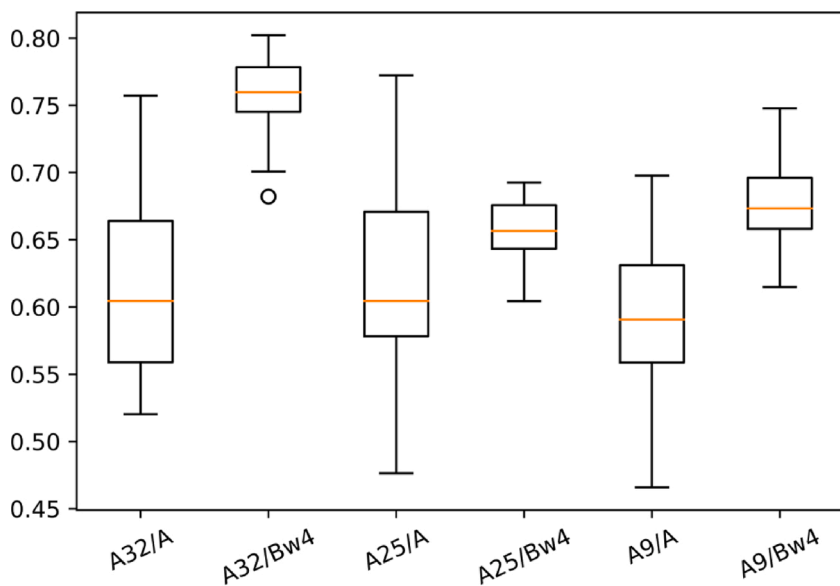


Fig. 3. Comparison of mean Spearman distances for HLA-A and -B beads sharing the Bw4 epitope.

A32/A, A25/A and A9/A corresponded to correlations between HLA-A serologic subgroups carrying Bw4 versus all the HLA-A beads not carrying Bw4. A32/Bw4, A25/Bw4, A9/Bw4 corresponded to correlations between HLA-A beads carrying Bw4 versus all the HLA-B beads carrying Bw4.

The boxplots show that sharing Bw4 resulted in stronger correlations between HLA-A and -B molecules. The median distances between A32/A25 and A9 and other HLA-A molecules were always below 0.8. These alleles present intermediate correlations with Bw4.

The box corresponds to the interquartile range (IQR, Q1 to Q3), and the line corresponds to the median. The lower fence is at $Q1 - 1.5 \times IQR$ and the upper fence is at $Q3 + 1.5 \times IQR$. Outliers are those beyond the whiskers.

Bw antigen in common?	Same serological group?	Correlation
yes	yes	strong
yes	no	strong/intermediate
no	yes	strong/intermediate
no	no	weak

influenced by the presence of the Bw4/Bw6 antigen specificities, this association alone cannot explain our network. We used an eplet-based approach to analyze the dispersion of the Spearman ρ values across HLA-B15 Bw6/Bw4 entities. According to an HLA-Matchmaker analysis, two main common eplets were clearly identified for Bw6: 69TNT and 76ESN. The case of HLA-B*15:12 warrants further investigation. The loss of correlation with HLA-B*15:12 allele and the HLA-B15 Bw6 entity might be due to the presence of the 166DG eplet or the absence of the 163 W eplet (Fig. 4). However, the strongest correlation including HLA-B*15:12 concerned HLA-B*45:01 ($\rho = 0.802$), which shared the 69TNT and 76ESN eplets but not the 166DG eplet.

The HLA-B*46:01 allele's profile warranted further investigation. The highest Spearman's ρ values for HLA-B*46:01 were seen with the HLA-C locus - especially HLA-C*03:04 ($\rho = 0.819$), HLA-C*03:03 ($\rho = 0.814$) and HLA-C*03:02 ($\rho = 0.811$). Based on this information, we used the HLA-Matchmaker algorithm to determine the eplets shared by the HLA-B*46:01 allele and all HLA-C alleles. Firstly, we noted that both 76VS and 76VRN eplets (found for some HLA-C alleles, and especially HLA-C*03:04, HLA-C*03:03, and HLA-C*03:02) are also shared by the HLA-B*46:01 allele. Moreover, another verified eplet (163 L W) was also carried by the HLA-B*46:01 allele and the more restrictive HLA-C*03:02, HLA-C*03:03 and HLA-C*03:04 entities.

To examine the networks in their entirety, we compared the Spearman's ρ values and number of matched eplets provided by the HLA-Matchmaker algorithm for each pair of alleles. Boxplots represented the distribution of Spearman's ρ with regard to verified eplet matches and total eplet matches (Fig. 5) for all possible pairs; the greater the numbers of verified and total eplet matches, the higher the value of Spearman's ρ .

3.4. HLA graph: an intuitive tool for predicting reactive epitopes

As we mentioned for HLA-C in Fig. 2, uploading a datafile with a

positive value for HLA-C beads carrying 76VS76VRN clearly displayed these epitopes as reactive eplets (Fig. 6).

About HLA-DQB1/-DQA1 and HLA-DPB1/-DPA1 antigens, it may be tricky to determine which subunit (A1 alpha chain, or B1 beta chain) is responsible for the cross-reaction (Supplemental S5 and S6). To answer this question, HLA Graph merges A1 and B1 eplet sequences into a single sequence. By following the same rules, HLA graphs identify potentially reactive eplets and display the two subunits to which they belong. HLA Graph helps users to quickly identify whether the patient is immunized against alpha or beta chains.

By way of an example, we used HLA Graph to analyze a sample in which four DP beads had an MFI greater than 2000 (DPA1*02:01/DPB1*09:01, DPA1*02:02/DPB1*10:01, DPA1*02:01/DPB1*14:01, DPA1*02:01/DPB1*17:01) and other DP beads were negative. These four beads are strongly correlated, which is probably because they all carried the same DPA1*02 serologic antigen. However, 10 beads carrying DPA*02:01 or DPA*02:02 were negative. The HLA Graph algorithm also identified and displayed 9H as a common eplet shared by DPB1*09:01, DPB1*10:01, DPB1*14:01, DPB1*17:01 (Fig. 7) - making it explicit to the user that the antibodies are directed against the beta chain. Moreover, HLA graph displayed a data table showing that 9H eplet is also carried by DPB1*30:01, DPB1*35:01, DPB1*45:01, and DPB1*55:01, which are not covered by the test kit. This specific example is described on the HLA Graph website ("Download Example SA2").

4. Discussion

Following solid organ transplantation, antibodies against polymorphic HLA molecules can predict allograft rejection. Screening is particularly important when (for example) antibodies to a previously rejected graft are present because the latter situation could lead rapidly to dangerous, hyperacute rejection. As a reflection of the complex nature

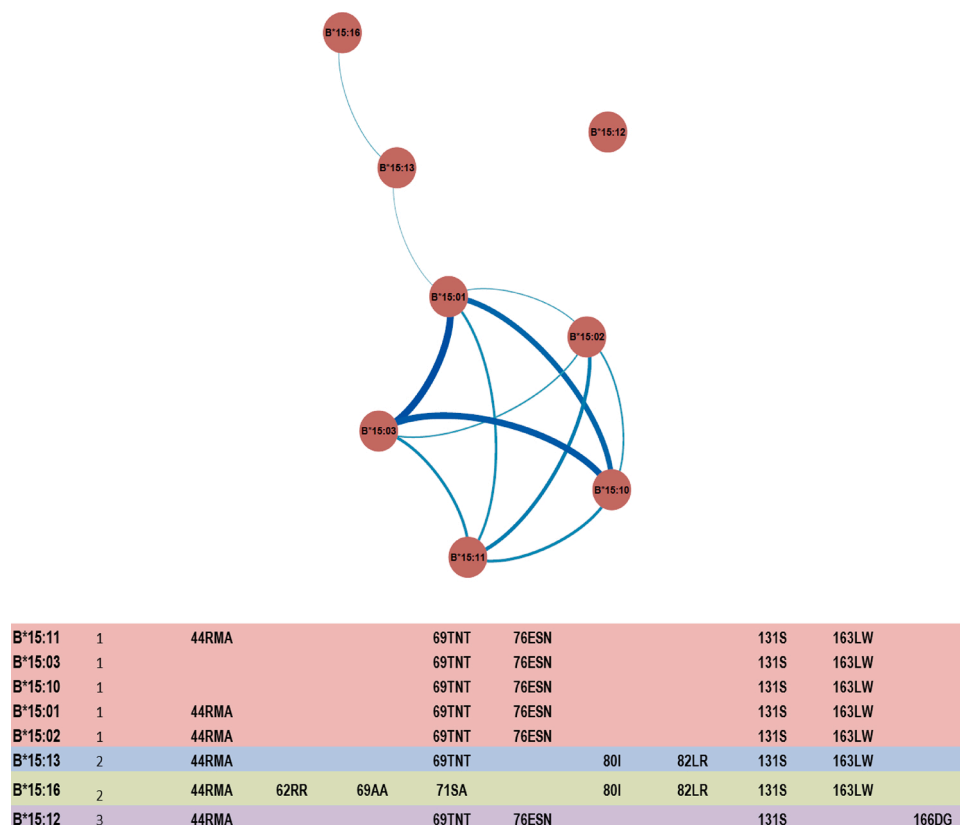


Fig. 4. the Spearman's distance network for HLA-B15 and a table showing matched eplets for pairs of beads. Although the main cluster shares 69TNT and 76ESN eplets, HLA-B*15:12 is an isolated node featuring the 166DG eplet.

of HLA polymorphism and the impact of historical recombination events, specific amino acid motifs may be present in several HLA allotypes - including those coded at different loci. The best example of this is the Bw4 motif that comprises 5 or so distinct amino acids present on the surface of some HLA-A and -B molecules. Hence, along with HLA-specific antibodies, it is also important to identify antibodies that might cross-react with different HLA allotypes. Much work has been done in this regard by clinical HLA laboratories and transplantation communities across the world, so that "epitope matching" and predictive algorithms are frequently used for recipient selection. Assays like the Luminex™ (in which specific HLA allotypes are bound to beads) are common tools for antibody screening, and the cross reactivities make it difficult to determine the precise specificities of these antibodies.

To describe how cross-reactivity patterns are correlated with HLA types, we amalgamated the data from a large number of Luminex™ assays. We showed that a graphical model of Spearman-based distances constitutes a robust, intuitive, effective tool for understanding routinely encountered cross-reactivity profiles.

Firstly, our Spearman analysis showed that the beads with a high degree of epitope homology are highly correlated, it thus constituted a useful bioinformatics tool for screening our bead panel for cross-reactivity (i.e. the strongest correlation between HLA-B*57:01 and B*57:03 alleles). These two allotypes differ only by a single amino acid, which is buried at the bottom of the binding groove and thus cannot be accessed by antibodies. In contrast, the least correlated allotypes differed most in terms of the amino-acid sequence (HLA-DRB1*01:01 and HLA-DRB1*03:02 alleles).

Secondly, our Spearman analysis correlated closely with the Bw4/Bw6 public epitopes in general and HLA-B alleles in particular. These two alleles (HLA-B*49:01 and HLA-B*50:01) from the B21 antigen had a $\rho = 0.797$ but do not share Bw public epitopes (Bw4 for HLA-B49, and Bw6 for HLA-B50), which might explain the low observed correlation. In

the same explanation, HLA-B*27:08 showed higher scores with the HLA-B*81:01 and HLA-B*07:02 alleles (Bw6 public epitopes, respectively $\rho = 0.889$ and 0.881) than HLA-B*27:05 (Bw4 epitope, $\rho = 0.868$). These cases highlighted that our algorithm was dependent on data input, with a lower frequency of sensitization against a distinct epitope from Bw4/Bw6 public epitopes or with a high level of MFI differences between two beads sharing the same epitope distinct from Bw4/Bw6 epitopes. In our model, moreover, HLA-A genes carrying Bw4 have intermediate cross-reactivity with HLA-A and HLA-B loci.

Sometimes, the correlation did not closely match broad specificities.

As a first example, HLA-A*25:01 had a Spearman's ρ just below the cut-off of 0.8, along with the other beads forming the A10 group (HLA-A*25:01/HLA-A*26:01 = 0.772 and HLA-A*25:01/HLA-A*66:01 = 0.749). This lower correlation could be due to a notable difference for two Bw4 epitopes, 80I and 82LR on HLA-A*25:01 and lacking on HLA-A*26:01, -A*34:01, -A*34:02, -A*66:01, -A*66:02.

As a second example, HLA-A*32 was not correlated with other broad HLA-A19 specificities. However, we highlighted a proximity with HLA-A*23, HLA-A*24 and HLA-A*25. This might be due to the presence in all three antigens of two similar antibody-verified epitopes (80I and 82LR), both of which are part of the HLA-Bw4 public epitope.

Furthermore, a Spearman correlation analysis can distinguish clearly between two groups of functional antigens. The antigens are divided into two categories, depending on the amino acid at position 80 of the KIR binding domain's alpha-1 helix (HLA-C1 for asparagine (N) and HLA-C2 for lysine (K)) (Cerwenka and Lanier, 2001).

We also describe unexpected correlations, such as those for HLA-A*74:01 and HLA-A*03:01 ($\rho = 0.827$). This might correspond to unknown or unexplained cross-reactivity. Indeed, epitopes shared by HLA-A*74:01 and HLA-A*03:01 are also shared by a broad panel of alleles with weak correlations in our model (e.g. HLA-A*01:01, -A*02:01, and -A*02:02).

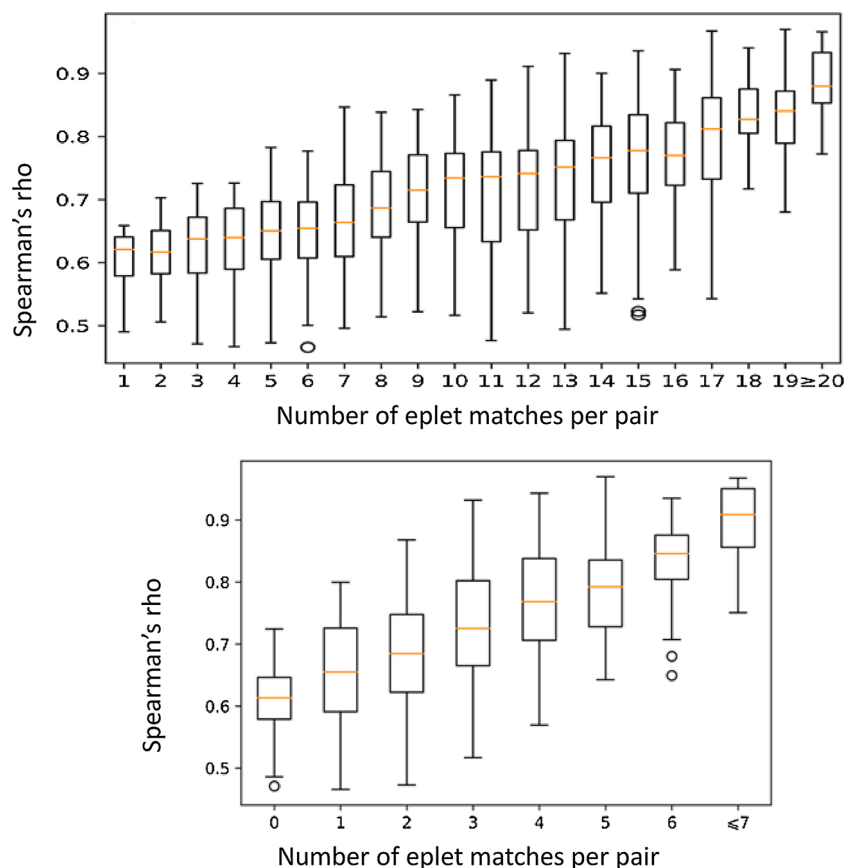


Fig. 5. the link between Spearman's ρ and the number of eplet matches provided by the HLA-Matchmaker algorithm.

The boxplot shows the distribution of Spearman's ρ , based on verified eplet matches and total eplet matches (i.e. verified and non-verified eplet matches) for all possible pairs including HLA-A, B, C, DR.

The eplet approach based on Spearman's ρ can also help to understand correlations, such as that between HLA-B*15:12 and HLA-B*45:01 ($\rho = 0.802$). This co-positivity might be explained by not only the common Bw6 public epitope but also the 163LS/G eplet (shared by HLA-B*15:12 and HLA-B*45:01 but not by other entities with B15 Bw6 specificity). Alternatively, the co-positivity may be explained by complex sensitization profiles with different combinations of eplets in highly sensitized patients.

Lastly, our model can explain the high incidence of immunization against rare antigens and therefore cross reactivity between two allele groups. By way of an example, the highest Spearman's ρ values for HLA-B*46:01 were seen with the HLA-C locus. It is widely established that HLA-B*46 carries the C1 epitope, due to a historical recombination event between HLA-B and HLA-C. This allele is found occasionally in Asian populations (6.1 %) but very rarely in Caucasian populations (Barber et al., 1996). However, we found that 602 of our 5907 class I samples (10.2 %) were positive (MFI > 2000) for an antibody against the HLA-B*46:01 entity. Hence, the large proportion of patients immunized against the HLA-B*46:01 allele results from previous immunization against HLA-C eplets rather than direct exposure to HLA-B46 antigen. In our Caucasian study population, rare antigens can be highly correlated with others but then barely involved in sensitization. Therefore, any positivity would be due mostly to cross-reactivity and would rarely be isolated. Moreover the absence of cross-reactivity for an unexpected sensitization could be an argument to identify anti-denatured anti-HLA antibodies (Tait et al., 2013; Visentin et al., 2014b; Gutiérrez-Larrañaga et al., 2021).

Alternatively, a common antigen would be highly correlated with others if contained a low number of private eplets.

While epitope matching is essential for decision making in

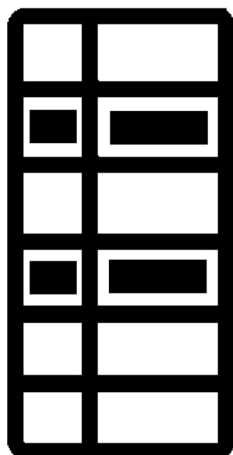
transplantation, the HLA-Matchmaker algorithm provides possible explanations for interactions. However, the outputs of HLA-Matchmaker's validation support tools are not visualized in an intuitive manner. Based on the model described above and HLA-Matchmaker's outputs, we developed HLA Graph - an online tool that builds specific graphs for a given sample (<http://cusureau.pythonanywhere.com/>) This data visualization tool may help biologists to (i) understand cross-reactivity due to specific eplets and thus (ii) predict reactivity against antigens that are not screened for by our class I (SA1) and class II (SA2) Luminex™ LABScreen™ SAB assays. Moreover, this online tool can be regularly and easily improved, as required.

5. Conclusion

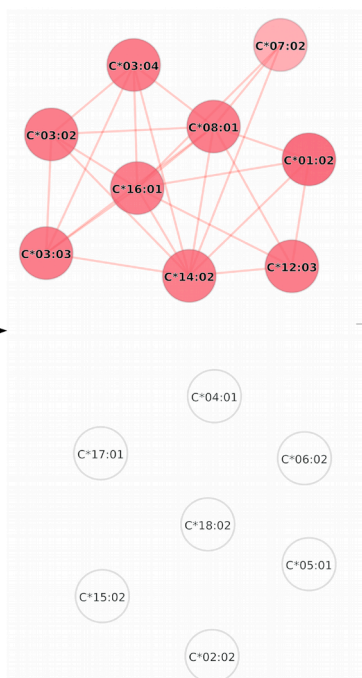
We consider that analyzing the MFI value is an obvious way of exploring HLA cross-reactivity and understanding antibody profiles. Given our use of retrospectively gathered, non-filtered data, the resulting networks needed to be checked against well-established CREGs. As expected, the presence of common Bw public epitopes or affiliation to the same serological subgroup resulted in strong correlations between members.

We showed that before applying an epitope-based approach, it is appropriate to analyze antibodies directed against correlated alleles. By studying shared or matched epitopes in these outliers, it might be possible to identify highly relevant immunogenic or non-immunogenic eplets. Moreover, the cross-reactivity patterns could be used to predict unknown cross-reactions. Lastly, an analysis of known reactivity and predicted reactivity (to antigens that are not present on the beads) would be relevant for the transplantation community. On the basis of this model, we developed HLA Graph - a new data visualization tool that

1. Input MFI values



2. Highlight positive beads



3. Display positive eplets

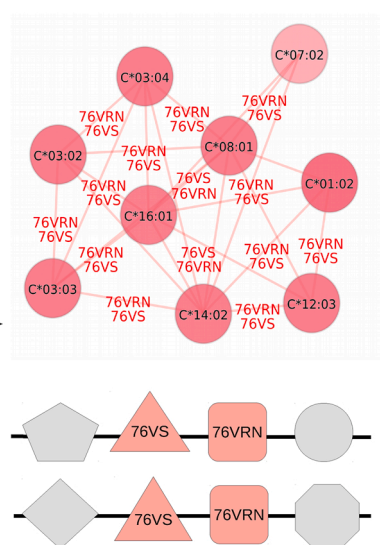


Fig. 6. HLA Graph workflow.

A user upload datatable containing MFI values from a specific SA1 or SA2 sample. The first column contains the alleles' ID and second contains the corresponding MFI value. Sample datatable templates (in Excel® format) can be downloaded from the website. The tool will automatically determine whether the table contains SA1 or SA2 bead IDs and will generate an A, B, C graph or a DRB1, DQB1/DQA1, DPB1/DPA1 graph, respectively. HLA Graph will color positive beads (based on a given threshold) in shades of red and will highlight links between positive beads. Positive eplets shared by correlated beads are displayed on links. Positive eplets carried by a single bead are displayed under the bead.

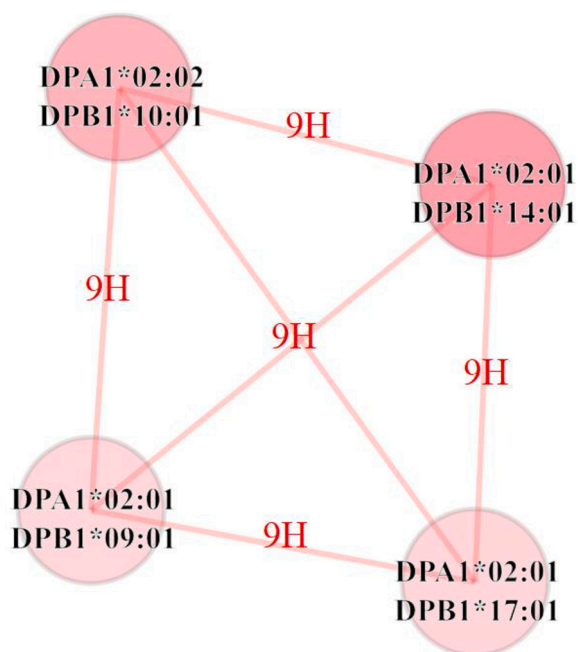


Fig. 7. 9H eplet identification by HLA Graph algorithm. The HLA Graph algorithm also identified and displayed 9H as a common eplet shared by DPB1*09:01, DPB1*10:01, DPB1*14:01, DPB1*17:01.

simplifies routine epitope analysis.

Authors contributions

Cédric Usureau: Acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the article, final approval of the version to be submitted.
Edgar Lefevre and Macha Nikolski: Acquisition of data, analysis and interpretation of data.
Isabelle Top, Pauline Varlet, Gabriel Choukroun: Interpretation of data and final approval of the version to be submitted.
Judith Desoutter and Nicolas Guillaume: conception and design of the study, interpretation of data, drafting the article and revising it critically for important intellectual content, final approval of the version to be submitted.

Data availability statement

The datasets generated during and/or analyzed during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.02.020>.

References

- Barber, L.D., Percival, L., Valiante, N.M., Chen, L., Lee, C., Gumperz, J.E., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Bigge, J.C., Parekh, R.B., Parham, P., 1996. The inter-locus recombinant HLA-B*4601 has high selectivity in peptide binding and functions characteristic of HLA-C. *J. Exp. Med.* 184, 735–740. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.735>.
- Cerwenka, A., Lanier, L.L., 2001. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol. Rev.* 181, 158–169. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.9>.
- Colombani, J., Colombani, M., Degos, L., Terrier, E., Gaudy, Y., Dostot, H., 1974. Effect of cross reactions on HL-A antigen immunogenicity. *Tissue Antigens* 4, 136–145. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1974.tb00234.x>.
- Duquesnoy, R.J., 2016. Reflections on HLA epitope-based matching for transplantation. *Front. Immunol.* 7, 469. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00469>.
- Duquesnoy, R.J., 2018. Epitope-based human leukocyte antigen matching for transplantation: a personal perspective of its future. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 23, 486–492. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000539>.
- Duquesnoy, R.J., Askar, M., 2007. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. V. Eplet matching for HLA-DR, HLA-DQ, and HLA-DP. *Hum. Immunol.* 68, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.10.003>.
- Gladstone, D.E., Bettinotti, M.P., 2017. HLA donor-specific antibodies in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: challenges and opportunities. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2017, 645–650. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.645>.
- Gutiérrez-Larrañaga, M., Riesco, L., Guiral, S., Irure, J., Rodrigo, E., Ocejo-Vinyals, J., Martorell, J., Caro, J.L., López-Hoyos, M., San Segundo, D., 2021. Detection of antibodies to denatured human leucocyte antigen molecules by single antigen Luminex. *HLA* 97, 52–59. <https://doi.org/10.1111/tan.14098>.
- Holdsworth, R., Hurlley, C.K., Marsh, S.G., Lau, M., Noreen, H.J., Kempenich, J.H., Setterholm, M., Maiers, M., 2009. The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 2009 (73), 95–170. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01183.x>.
- Hu, Y., Shi, L., Liu, Q., 2019. A coloring algorithm for disambiguating graph and map drawings. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 25, 1321–1335. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45803-7_8.
- Müller, C.A., Engler-Blum, G., Gekeler, V., Steiert, I., Weiss, E., Schmidt, H., 1989. Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. *Immunogenetics* 30, 200–207. <https://doi.org/10.1007/bf02421207>.
- Parham, P., 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 201–214. <https://doi.org/10.1038/nri1570>.
- Rodey, G.E., Neylan, J.F., Whelchel, J.D., Revels, K.W., Bray, R.A., 1994. Epitope specificity of HLA class I alloantibodies. I. Frequency analysis of antibodies to private versus public specificities in potential transplant recipients. *Hum. Immunol.* 39, 272–280. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(94\)90270-4](https://doi.org/10.1016/0198-8859(94)90270-4).
- Schnaidt, M., Weinstock, C., Jurisic, M., Schmid-Horch, B., Ender, A., Wernet, D., 2011. HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 92, 510–515. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31822872dd>.
- Schwaiger, E., Wahrmann, M., Bond, G., Eskandary, F., Böhmig, G.A., 2014. Complement component C3 activation: the leading cause of the prozone phenomenon affecting HLA antibody detection on single-antigen beads. *Transplantation* 97, 1279–1285. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000441091.47464.c6>.
- Tait, B.D., Süsal, C., Gebel, H.M., Nickerson, P.W., Zachary, A.A., Claas, F.H., Reed, E.F., Bray, R.A., Campbell, P., Chapman, J.R., Coates, P.T., Colvin, R.B., Cozzi, E., Doxiadis, I.I., Fuggle, S.V., Gill, J., Glotz, D., Lachmann, N., Mohanakumar, T., Suciuc-Foca, N., Sumitran-Holgersson, S., Tanabe, K., Taylor, C.J., Tyan, D.B., Webster, A., Zeevi, A., Opelz, G., 2013. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 95, 19–47. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31827a19cc>.
- Van Rood, J.J., van Leeuwen, A., 1963. Leukocyte grouping. A method and its application. *J. Clin. Invest.* 42, 1382–1390. <https://doi.org/10.1172/JCI104822>.
- Visentin, J., Guidicelli, G., Bachelet, T., Jacquelinet, C., Audry, B., Nong, T., Dubois, V., Moreau, J.F., Lee, J.H., Couzi, L., Merville, P., Taupin, J.L., 2014a. Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. *Transplantation* 98, 738–744. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000229>.
- Visentin, J., Vigata, M., Daburon, S., Contin-Bordes, C., Fremaux-Bacchi, V., Dromer, C., Billes, M.A., Neau-Cransac, M., Guidicelli, G., Taupin, J.L., 2014b. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation* 98, 625–631. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000315>.
- Zhang, X., Reinsmoen, N.L., 2020. Impact and production of Non-HLA-specific antibodies in solid organ transplantation. *Int. J. Immunogenet.* 47, 235–242. <https://doi.org/10.1111/iji.12494>.

HLA Graph : modèle d'analyse épitopique des anticorps anti-HLA

Introduction: L'identification des anticorps anti-HLA est réalisée par les tests de cytométrie de flux sur billes Luminex™. Nous avons développé un modèle étudiant les corrélations des fluorescences entre les différentes paires d'allèles étudiées, que nous avons confronté aux séquences d'épitopes qu'elles partagent.

Matériel et méthode: A partir des données de plus de 6000 tests Luminex™, nous avons construit des graphes de corrélations dans lesquels chaque noeud est un allèle et chaque lien correspond à une corrélation forte entre deux allèles.

Résultats: Les allèles d'un même groupe sérologique étant fortement corrélés, les graphes construits s'articulent autour des groupes de réactivités croisées décrits. La distance de Spearman ρ est associée au nombre d'épitopes communs entre deux antigènes.

Discussion: Les graphes de corrélations représentent un support visuel intéressant pour comprendre les réactions croisées les plus fréquemment observées. A partir de ce modèle, nous avons développé un nouvel outil de matching épitopique, accessible en ligne à l'adresse <https://casureau.pythonanywhere.com/>.

Conclusions: HLA Graph est un nouvel outil d'interprétation des anticorps anti-HLA. Ce modèle pourrait permettre de mieux définir l'importance de chaque mismatch épitopique en transplantation.

Mots clé: Transplantation, Anticorps anti-HLA, Rejet, Bioinformatique, Luminex™

HLA Graph : A new tool for epitope matching

Introduction: Identification of anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies (Abs) is based on Luminex™ technology. We developed a model studying correlations of mean fluorescence intensities (MFIs) for each allele pair, and we determined the degree of epitope homology between HLA antigens.

Methods: Using data from more than 6000 Luminex™ assays, we provide an updated overview of class I and II HLA antigen cross-reactivity in which each node corresponds to an allele and each link corresponds to a strong correlation between two alleles (Spearman's $\rho > 0.8$).

Results: We compared these correlations with the serological groups and the results of an epitope analysis. The strongest correlations were observed with Abs directed against the same serological subgroups. In the epitope analysis, Spearman's ρ was related to the number of matched epitopes within pairs of alleles.

Discussion: The combination of Spearman's ρ with simple, undirected graph constitutes an effective tool for understanding routinely encountered cross-reactivity profiles. Based on this model, we have implemented an online data visualization tool available at <https://casureau.pythonanywhere.com/>.

Conclusion: HLA Graph is a new epitope matching tool. Our model could help determine the strength of each epitope in the immunization process after transplantation.

Keywords: Transplant, anti-HLA antibodies, Rejection, Bioinformatic, Luminex™