



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Médecine



ANNEE 2019

N°

IGM ANTI-HLA : SEROLOGIE ET SYNTHÈSE LYMPHOCYTAIRE EN TRANSPLANTATION RENALE

THESE
Présentée

À l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 5 avril 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par Charline BAUDOIN
Née le 01 janvier 1991
À Antony

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiat, reproductions illicites encourt une poursuite pénale.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Médecine



ANNEE 2019

N°

IGM ANTI-HLA : SEROLOGIE ET SYNTHÈSE LYMPHOCYTAIRE EN TRANSPLANTATION RENALE

THESE
Présentée

À l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 5 avril 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par Charline BAUDOIN
Née le 01 janvier 1991
À Antony

Année Universitaire 2018-2019
au 1^{er} Février 2019

Doyen :
Assesseurs :

M. Marc MAYNADIÉ
M. Pablo ORTEGA-DEBALLON
Mme Laurence DUVILLARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

			Discipline
M.	Sylvain	AUDIA	Médecine interne
M.	Marc	BARDOU	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	BASTIE	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	BAULOT	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Yannick	BEJOT	Neurologie
M.	Alain	BERNARD	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Mme	Christine	BINQUET	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Philippe	BONNIAUD	Pneumologie
M.	Alain	BONNIN	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	BONNOTTE	Immunologie
M.	Olivier	BOUCHOT	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaid	BOUHEMAD	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale
M.	Alexis	BOZORG-GRAYELI	ORL
M.	Alain	BRON	Ophtalmologie
M.	Laurent	BRONDEL	Physiologie
Mme	Mary	CALLANAN	Hématologie type biologique
M.	Patrick	CALLIER	Génétique
Mme	Catherine	CHAMARD-NEUWIRTH	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	CHARLES	Réanimation
M.	Pascal	CHAVANET	Maladies infectieuses
M.	Nicolas	CHEYNEL	Anatomie
M.	Alexandre	COCHET	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	CORMIER	Urologie
M.	Yves	COTTIN	Cardiologie
M.	Charles	COUTANT	Gynécologie-obstétrique
M.	Gilles	CREHANGE	Oncologie-radiothérapie
Mme	Catherine	CREUZOT-GARCHER	Ophtalmologie
M.	Frédéric	DALLE	Parasitologie et mycologie
M.	Alexis	DE ROUGEMONT	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Serge	DOUVIER	Gynécologie-obstétrique
Mme	Laurence	DUVILLARD	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Olivier	FACY	Chirurgie générale
Mme	Laurence	FAIVRE-OLIVIER	Génétique médicale
Mme	Patricia	FAUQUE	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	FRANCOIS-PURSSELL	Médecine légale et droit de la santé
M.	Pierre	FUMOLEAU	Cancérologie
M.	François	GHIRINGHELLI	Cancérologie
M.	Vincent	GREMEAUX	Médecine physique et réadaptation
(Mise en disponibilité du 12 juin 2017 au 11 juin 2019)			
M.	Pierre Grégoire	GUINOT	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Frédéric	HUET	Pédiatrie
M.	Pierre	JOUANNY	Gériatrie

M.	Sylvain	LADOIRE	Histologie
M.	Gabriel	LAURENT	Cardiologie
M.	Côme	LEPAGE	Hépto-gastroentérologie
M.	Romarc	LOFFROY	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	LORGIS	Cardiologie
M.	Jean-Francis	MAILLEFERT	Rhumatologie
M.	Cyriaque Patrick	MANCKOUNDIA	Gériatrie
M.	Sylvain	MANFREDI	Hépto-gastroentérologie
M.	Laurent	MARTIN	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	MASSON	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	MAYNADIÉ	Hématologie – transfusion
M.	Marco	MIDULLA	Radiologie et imagerie médicale
M.	Thibault	MOREAU	Neurologie
M.	Klaus Luc	MOURIER	Neurochirurgie
Mme	Christiane	MOUSSON	Néphrologie
M.	Paul	ORNETTI	Rhumatologie
M.	Pablo	ORTEGA-DEBALLON	Chirurgie Générale
M.	Pierre Benoit	PAGES	Chirurgie thoracique et vasculaire
M.	Jean-Michel	PETIT	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Christophe	PHILIPPE	Génétique
M.	Lionel	PIROTH	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	QUANTIN	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	QUENOT	Réanimation
M.	Patrick	RAY	Médecine d'urgence
M.	Patrick	RAT	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	REBIBOU	Néphrologie
M.	Frédéric	RICOLFI	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	SAGOT	Gynécologie-obstétrique
M.	Emmanuel	SAPIN	Chirurgie Infantile
M.	Henri-Jacques	SMOLIK	Médecine et santé au travail
M.	Éric	STEINMETZ	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	THAUVIN	Génétique
M.	Benoit	TROJAK	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Pierre	VABRES	Dermato-vénéréologie
M.	Bruno	VERGÈS	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	ZWETYENGA	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

PROFESSEURS EN SURNOMBRE

M.	Bernard	BONIN (Surnombre jusqu'au 31/08/2019)	Psychiatrie d'adultes
M.	Philippe	CAMUS (Surnombre jusqu'au 31/08/2019)	Pneumologie
M.	Jean-Marie	CASILLAS-GIL (Surnombre jusqu'au 31/08/2020)	Médecine physique et réadaptation
M.	Maurice	GIROUD (Surnombre jusqu'au 21/08/2019)	Neurologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES

M.	Jean-Louis	ALBERINI	Discipline Universitaire
Mme	Lucie	AMOUREUX BOYER	Biophysiques et médecine nucléaire
Mme	Shaliha	BECHOUA	Bactériologie
M.	Benjamin	BOUILLET	Biologie et médecine du développement
Mme	Marie-Claude	BRINDISI	Endocrinologie
M.	Jean-Christophe	CHAUVET-GELINIER	Nutrition
Mme	Marie-Lorraine	CHRETIEN	Psychiatrie, psychologie médicale
M.	Damien	DENIMAL	Hématologie
Mme	Vanessa	COTTET	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Hervé	DEVILLIERS	Nutrition
Mme	Ségolène	GAMBERT-NICOT	Médecine interne
Mme	Marjolaine	GEORGES	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Françoise	GOIRAND	Pneumologie
M.	Charles	GUENANCIA	Pharmacologie fondamentale
Mme	Agnès	JACQUIN	Physiologie
M.	Alain	LALANDE	Physiologie
M.	Louis	LEGRAND	Biophysique et médecine nucléaire
Mme	Stéphanie	LEMAIRE-EWING	Biostatistiques, informatique médicale
M	Maxime	SAMSON	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Paul-Mickaël	WALKER	Médecine interne
			Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEURS EMERITES

M.	Laurent	BEDENNE	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Jean-François	BESANCENOT	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	François	BRUNOTTE	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Jean	CUISENIER	(01/09/2018 au 21/08/2021)
M.	Jean-Pierre	DIDIER	(01/11/2018 au 31/10/2021)
Mme	Monique	DUMAS-MARION	01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Jean	FAIVRE	(01/09/2018 au 21/08/2021)
M.	Claude	GIRARD	(01/01/2019 au 31/12/2022)
M.	Patrick	HILLON	(01/09/2016 au 31/08/2019)
M.	François	MARTIN	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Pierre	TROUILLOUD	(01/09/2017 au 31/08/2020)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jean-Noël	BEIS	Médecine Générale
----	-----------	-------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Didier	CANNET	Médecine Générale
M.	François	MORLON	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Anne	COMBERNOUX -WALDNER	Médecine Générale
M.	Clément	CHARRA	Médecine Générale
M.	Benoît	DAUTRICHE	Médecine Générale
M.	Rémi	DURAND	Médecine Générale
M.	Arnaud	GOUGET	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Lucie	BERNARD	Anglais
M.	Didier	CARNET	Anglais
Mme	Catherine	LEJEUNE	Pôle Epidémiologie
M.	Gaëtan	JEGO	Biologie Cellulaire

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Marianne	ZELLER	Physiologie
-----	----------	---------------	-------------

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme	Marceline	EVRARD	Anglais
Mme	Lucie	MAILLARD	Anglais

PROFESSEURS CERTIFIES

Mme	Anaïs	CARNET	Anglais
M.	Philippe	DE LA GRANGE	Anglais
Mme	Virginie	ROUXEL	Anglais (Pharmacie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	François	GIRODON	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques
Mme	Evelyne	KOHLI	Immunologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Mathieu	BOULIN	Pharmacie clinique
M.	Philippe	FAGNONI	Pharmacie clinique
M.	Frédéric	LIRUSSI	Toxicologie
M.	Marc	SAUTOUR	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	SCHMITT	Pharmacologie

L'UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

COMPOSITION DU JURY

Président et Directeur : Professeur REBIBOU Jean-Michel

Membres :
Professeur MOUSSON Christiane
Professeur BAMOULID Jamal
Docteur ZANETTA Gilbert

SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

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

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

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

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

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

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

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

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

A l'issue de la rédaction de ce travail, je tiens à remercier les membres de mon jury :

Monsieur le Professeur Jean-Michel REBIBOU,

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet mais également de votre disponibilité et votre intérêt lors de la réalisation de ce projet.

Merci de m'avoir transmis un peu de votre savoir. Les semestres effectués au sein de votre service m'ont conforté dans mon choix d'y exercer la néphrologie, et je vous remercie de la confiance que vous m'accordez en me proposant de poursuivre ma formation dans votre équipe.

Madame le Professeur Christiane MOUSSON,

Je suis très honorée de vous compter parmi les juges de cette thèse. Merci pour votre disponibilité et pour vos enseignements lors de mes différents passages dans le service en tant qu'externe puis interne, ainsi que de m'avoir transmis votre passion pour la transplantation rénale.

Monsieur le Professeur Jamal BAMOULID,

Pour me faire le plaisir et l'honneur de faire partie de ce jury. Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de l'avoir enrichi par tes conseils avisés. Merci pour ton encadrement et ta disponibilité pendant la réalisation du M2.

Monsieur le Docteur Gilbert ZANETTA,

Je te remercie d'avoir accepté de participer à ce jury. Merci de partager quotidiennement ton expérience médicale, et d'être toujours disponible et bienveillant à chaque fois que l'on te sollicite dans le service.

Je tiens également à dire Merci :

À ma famille,

À Deb, Merci tout simplement d'être là ! Tu me comprends en une seconde, et me fait rire souvent en moins de temps que ça ! Je suis chanceuse d'avoir grandi à tes côtés !

À mon père, merci pour ... tout, depuis ... toujours ! En particulier merci pour ton indéfectible soutien quotidien et ton courage. Tu nous as permis de grandir heureuses et de nous réaliser sans limites !

À mes grands-parents, pour la tendresse et le soutien dont je suis entourée depuis ma naissance !

À mes tantes et à mes oncles, merci pour votre bienveillance et votre affection ! Et pour avoir stimulé mon sens de l'humour et ma curiosité dès mon plus jeune âge !

À mes cousines et cousins, les grands pour avoir partagé une enfance pleine de bons souvenirs ! Et aux petits de me permettre de faire perdurer ça encore un peu !

À mes amis,

À Mathoch, pour être présente depuis ... longtemps ! On s'en est quand même pas mal sortie depuis le (/malgré le ?) collègue Pasteur !

À Clem (Petite), Clem (Grande), Pauline et Aurélie. Pour ces petites folies qui ne sont possibles que quand on est ensemble ! Je suis heureuse que l'on arrive encore à partager ces trop courts moments ensemble !

Aux vieux de l'externat qui sont partis : DD, H, Claire, Gio, Eymeric, Martine, Pedro, PD, Ruben ... Pour avoir rendu ces années de fac inoubliables ! Vous me manquez ! Dijon n'est pas vraiment la même sans vous ! Certaines rues restent, même après ces 5 dernières années, toujours les vôtres ! Mais aussi aux vieux qui sont restés : Lucette, Moumoun, Jerem, Flo, que je ne vois pas autant que ce que je le souhaiterais mais qui restent des repères dans ma vie dijonnaise !

Aux « nouveaux » dijonnais : Soph, Caro, Mathou, Philou & Valentin, Sonia, Nine, Lucie & Lambert, Solène & Guillaume, pour avoir repeuplé la ville ! Je suis heureuse de vous avoir dans le coin au quotidien ! Je n'aurai pas cru que le choix d'un bungalow au weekend d'accueil ou d'un périph en premier semestre ait autant de conséquence !

A la famille Mâconnaise : Lulu, A2, Sarou, Elsa, Sarah, Mathilde, Nico, JC, Yann, Kinan, Aurélien, Pour le semestre de folie ! Et les weekends depuis ! Entre soirées et moments de vie, Macon a été largement à la hauteur de sa réputation ! Une pensée particulière à la BDC et aux WAGS pour les moments de partages de tous les jours !

Aux Chalonnais (1) : Guillaume & Anne-Laure, Adé, Vinciane, Mathilde, Augustin, Florian & Anne-Laure, Marie, Justine, Johan... pour avoir initié cet internat avec autant de rire et de bons souvenirs ! Pensée particulière à mes 2 colocs du 3^{ème} bis ! (2) Sarou, Berthou, Marion, Alix, JB, Erwan, ... j'ai adoré la petite vie de famille pendant ces 6 mois avec vous à l'internat ! (3) Hugo, Mélanie, Laura, Jeremy, Marc-Antoine, Antoine, Gauthier, Jean, ... pour avoir profité des terrasses chalonnaises !

A Hélène, pour avoir partagé tout le M2 : des cours, à la coloc, aux multiples trajets en voiture ! Je suis contente que l'on se soit trouvée le premier jour, ça aurait été terriblement moins drôle sans toi ! L'année recherche est finie mais pas les « petites sauterelles Greigert-Baudoin » !

A Ally ! De ma co-interne, à ma colloc du 3 bis, à mon amie ! Même si je ne te vois pas du tout autant que j'aimerais !

A Jean-Chou, à tous tes toi d'ailleurs ! Pour les partages d'états d'âmes notamment !

A mes co-internes,

De néphrologie, vieux et jeunes : Wendy, Élise, Jean, Mehdi, Célia, Kadia, Paulo, Magali, pour avoir rythmer les cours de DES et les trop peu nombreux apéro-néphro !

Et non-néphrologues, Benoît pour l'expérience de « vieil » interne et les bières avec PH, Anne-Claire pour tes histoires toujours incroyables ! et ta manière de nous les raconter ! J'ai adoré nos 6 mois de binôme, Natachou pour ta gentillesse et ton attention, Sarou pour les 6 mois parfaits à U12, Marie,

Bertrand, Razvan, Henri et Adrien pour les 6 mois de réa dans une superbe ambiance, Louise, Thomas et Romain pour ce semestre épuisant mais drôle !

Une pensée pour mes co-externes, Clémence, Pierre & Blandine, Simon !

Aux médecins et équipes rencontrés pendant mes différents stages :

Le service d'endocrinologie de Chalon, pour m'avoir permis d'apprendre à être interne dans une ambiance sereine et les gouters quotidiens !

Le service de médecine interne de Chalon, pour m'avoir appris mille choses au sein d'une équipe soudée et généreuse !

Le service U12 de Macon, pour m'avoir montré un autre aspect de la néphrologie ! Sans oublier la partie onco du service !

Le service de Réanimation médicale de Chalon, pour m'avoir fait grandir médicalement ! Venir travailler tous les jours au sein de l'équipe de copains a été un vrai plaisir ! Quitter l'équipe et le service à la fin du semestre a été un vrai drame pour moi !

A toute l'équipe du service de néphrologie du CHU,

Aux médecins : PH, Mathieu, Samir, Manue, Quentin, Zaara, Nabil, pour m'apprendre des choses tous les jours, et pour le plaisir de travailler avec vous ! A Anna, pour la fraîcheur que ta présence apportait au service, et pour nos multiples discussions !

Aux infirmier(e)s, aides-soignant(e)s, ASH, c'est un plaisir de travailler avec vous au quotidien !

Aux secrétaires, Isabelle et Ariane, votre bureau est mon premier contact avec le service tous les matins, et du coup c'est toujours avec le sourire que j'arrive !

A toute l'équipe de l'EFS et de l'IBCT croisée pendant mon année recherche,

A Chantal et Isabelle : Pour avoir été présentes et souriantes tous les jours de mon M2 ! Merci pour vos conseils avisés, et m'avoir appris à être une vraie petite technicienne du HLA en herbe ! Dommage que le labo soit si loin du service de néphro dijonnais ...

A toute l'équipe de l'IBCT, et notamment Hanane, Cécile, Anaïs, Audrey, Inès : pour m'avoir initié à la vie de labo, des manips aux pauses ! Merci aussi à Myriam d'avoir été toujours disponible pour m'aider ! Et à Antoine, d'avoir partagé le chamboulement hôpital/laboratoire et les aléas quotidiens des manips !

À toi Maman, entre mille choses, merci pour ton amour et ton courage,
Pour ton rire aussi !

Table des matières

Introduction

I.	LA REPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE EN TRANSPLANTATION RENALE	16
1.	REJET HUMORAL	16
2.	ONTOGENIE, DIFFERENTIATION ET FONCTION DES LYMPHOCYTES B	18
3.	LYMPHOCYTES B MEMOIRES EN TRANSPLANTATION	20
II.	ANTICIPER LES LESIONS DU GREFFON PAR UN DEPISTAGE PLUS PRECOCE DE LA REPONSE HUMORALE.....	21

Objectifs

23

Matériels et méthodes

A- Mise au point d'un test de dépistage des IgM anti-HLA

I.	SERUMS	24
1.	CONTROLES POSITIFS IGM ANTI-HLA	24
2.	TEMOIN NEGATIF.....	24
3.	SERUMS POSITIFS EN IGG ANTI-HLA	24
II.	DETECTION DES DSA IGM PAR LA TECHNOLOGIE LUMINEX®	24
1.	PRINCIPE	24
2.	LES DIFFERENTS KITS LUMINEX® UTILISES	25
3.	MODIFICATION DE LA TECHNIQUE LUMINEX® POUR LA DETECTION DES ANTICORPS ANTI-HLA DE TYPE IGM.....	26
III.	DETECTION DES DSA IGG PAR LA TECHNOLOGIE LUMINEX®	26
1.	PROTOCOLE UTILISE	26
2.	L'ANTICORPS ANTI-IGG CONJUGUE	26
IV.	PRETRAITEMENTS DES SERUMS COMPORTANT DES IGG ANTI-HLA	27
1.	ENDOPEPTIDASE.....	27
2.	FILTRATION.....	27
3.	DILUTION	27
4.	EDTA	27
V.	ANALYSE DES RESULTATS ET INTERPRETATION	28

B- Stimulation polyclonale de lymphocytes B

I.	CELLULES MONONUCLEES	28
1.	MISE AU POINT DE LA CULTURE	28
2.	CELLULES MONONUCLEES DES PATIENTS TRANSPLANTES	28

II.	CULTURE CELLULAIRE	29
1.	CONDITIONS DE CULTURE	29
2.	MARQUAGE DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES B EN CYTOMETRIE	30
3.	MISE AU POINT	31
III.	ANALYSES STATISTIQUES	32

Résultats

A- Mise au point d'un test de dépistage des IgM anti-HLA

I.	DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DU TEST	33
1.	DETERMINATION DE LA CONDITION LA PLUS SENSIBLE	34
2.	DETERMINATION DE LA CONDITION AVEC LA MEILLEURE REPRODUCTIBILITE INTRA-EXPERIENCE DES MESURES	34
3.	CHOIX DE LA CONDITION RETENUE	34
II.	VALIDATION DU TEST	35
III.	IDENTIFICATION DES ANTICORPS IGM ANTI-HLA DETECTES EN LUMINEX® SINGLE ANTIGEN	36
IV.	POSITIVITE DE LA BILLE CONTROLE POSITIF DU KIT DE DEPISTAGE	37
1.	PREMIERES OBSERVATIONS	37
2.	METTRE EN EVIDENCE LA PRESENCE D'UNE IGM ANTI-IGG	37
a)	Première expérience	38
b)	Test d'autres concentrations en sérum FR+	38
3.	ÉLIMINER UN FACTEUR CONFONDANT DONT LE TEMOIN EST LA POSITIVITE DE LA BILLE N°2	41
a)	Validation de l'activité de l'endopeptidase	41
b)	Comparaison des différentes méthodes	42

B- Stimulation polyclonale de lymphocytes B

I.	MISE AU POINT DE STIMULATION POLYCLONALE DE LYMPHOCYTES B EN CULTURE ..	46
1.	ANALYSE DES RESULTATS DE PHENOTYPAGE CELLULAIRE	47
2.	DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE	48
II.	CULTURE DE PBMC DE PATIENTS TRANSPLANTES	48
1.	RESULTATS DU PHENOTYPAGE CELLULAIRE	49
2.	DEPISTAGE D'ANTICORPS ANTI-HLA DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE	49

Discussion

52

Perspectives

58

Conclusions

59

Table des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Classification de Banff 2017 révisée de l'ABMR des greffons rénaux	13
<u>Tableau 2</u> : Patients retenus pour le test de stimulation polyclonale des lymphocytes B circulants	24
<u>Tableau 3</u> : Anticorps conjugués utilisés pour le phénotypage et la quantification des populations lymphocytaires B suivies	26
<u>Tableau 4</u> : Évaluation de la sensibilité des différentes conditions par calcul de la moyenne des différences entre les MFI mesurées pour chaque bille positive	28
<u>Tableau 5</u> : Évaluation de la reproductibilité intra-expérience des différentes conditions par calcul du coefficient de variation	29
<u>Tableau 6</u> : Nombre de billes retrouvées positives dans les 15 sérums connus positifs IgM anti-HLA en LCT testés en dépistage Luminex®	30
<u>Tableau 7</u> : Mélange de sérums connus IgG anti-HLA + avec deux concentrations d'un sérum FR+	35
<u>Tableau 8</u> : Moyenne selon plusieurs modalités des rapports MFI initiales / MFI post traitements de sérums positifs en dépistage Luminex® IgM	40

Table des figures

<u>Figure 1</u> : Survie du greffon rénal selon la période de greffe de 1986 à 2013	11
<u>Figure 2</u> : Histoire naturelle de l'ABMR	12
<u>Figure 3</u> : Activation de la réponse humorale des lymphocytes B mémoires dans le contexte d'une transplantation rénale	15
<u>Figure 4</u> : Principe de la technique Luminex	20
<u>Figure 5</u> : Stratégies de fenêtrage utilisées pour les analyses de cytométrie en flux des différentes populations cellulaires étudiées	27
<u>Figure 6</u> : Exemple de MFI recueillies par le Luminex® pour un des sérums testés lors de la première expérience (Patient 12) selon les 4 conditions (A, B, C, D)	28
<u>Figure 7</u> : Deux profils de positivité du dépistage d'IgM anti-HLA	31
<u>Figure 8</u> : Inactivation de la positivité des billes par traitement du sérum au DTT	32
<u>Figure 9</u> : Dépistage IgM Luminex® d'un mélange de 50% de sérum Bille n°2 + et d'un sérum IgG+	33
<u>Figure 10</u> : Mélange de sérums connus IgG anti-HLA + avec deux concentrations d'un sérum FR+	36
<u>Figure 11</u> : Traitement d'un sérum IgG anti-HLA positif par une endopeptidase IgG spécifique	37
<u>Figure 12</u> : Illustration de l'utilisation de l'endopeptidase et de l'interprétation de la MFI de la bille n°2	38
<u>Figure 13</u> : Comparaison des conséquences sur les MFI de différentes méthodes de prétraitement d'un sérum testé en dépistage IgM Luminex®	39
<u>Figure 14</u> : Exemple : Test du Sérum P20 en dépistage Luminex® IgM	41
<u>Figure 15</u> : Suivi du pourcentage de plasmablastes (CD19 ⁺ CD38 ^{high} IgD) dans la population totale de lymphocytes B (CD19 ⁺)	42
<u>Figure 16</u> : Variation parmi la population CD19 ⁺ totale du pourcentage des plasmablastes (CD19 ⁺ CD38 ^{high} IgD), des lymphocytes B naïfs (CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺) et des lymphocytes B mémoires (CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻ CD38 ⁻) entre J0 et J8	43
<u>Figure 17</u> : Proportion des populations suivies parmi la population B totale à J0 et aux différents temps de culture J8 et J10	45
<u>Figure 18</u> : Variation des pourcentages parmi la population B totale (CD19 ⁺) des populations suivies entre J0 et J8	46
<u>Figure 19</u> : Difficultés d'interprétation des tests Luminex® lors de la présence d'une bille n°2 positive du fait de la présence d'une IgM anti-IgG	49

Liste des abréviations

ABMR - AntiBody Mediated Rejection

Ag - Antigène

ARN - Acide ribonucléique

ADN - Acide désoxyribonucléique

AF - Alexa Fluor®

BCR - *B cell receptor*

BV - Brilliant Blue™

C1q - *Complement component 1q*

CD - *Cluster of Differentiation*

CPA - Cellule Présentatrice d'Antigène

CpG - Cytosine phosphate Guanine

DTT - Dithiothréitol

DSA - *Donor Specific Antibody*

EFS - Établissement Français du Sang

ELISPOT - *Enzyme-linked immunospot*

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*

FBS - *Fœtal Bovine Serum*

FvD - *Fixable viability Dye*

FR - *Facteur rhumatoïde*

HLA - *Human Leucocyte Antigen*

IgM - Immunoglobuline type M

IgG - Immunoglobuline type G

IL - Interleukine

LCT - Lymphocytotoxicité

LLPC - *long-lived plasma cells*

mBC - *memory B cells*

MFI - *Median Fluorescence Intensity*

PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PBS - *Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)*

PE - Phycoérythrine

PerCP-Cy - *Peridinin Chlorophyll Cyanine*

PMW - *Poke Weed Mitogen*

PS - Pénicilline Streptomycine

RPM - *Rotations Par Minute*

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SAC - *Staphylococcus aureus Cowan*

SpA - *Soluble protein A*

SvF - Serum de Veau Fœtal

TLR - *Toll-like Receptor*

TFH - *T follicular helper*

INTRODUCTION

Pendant longtemps, les travaux concernant l'immunologie de la transplantation se sont concentrés sur l'immunologie cellulaire. Le développement de molécules comme la ciclosporine dont l'action est centrée sur la réponse cellulaire a permis d'améliorer largement le pronostic à court terme des greffons rénaux. L'amélioration est moins évidente sur le pronostic à long terme (**Figure 1**).

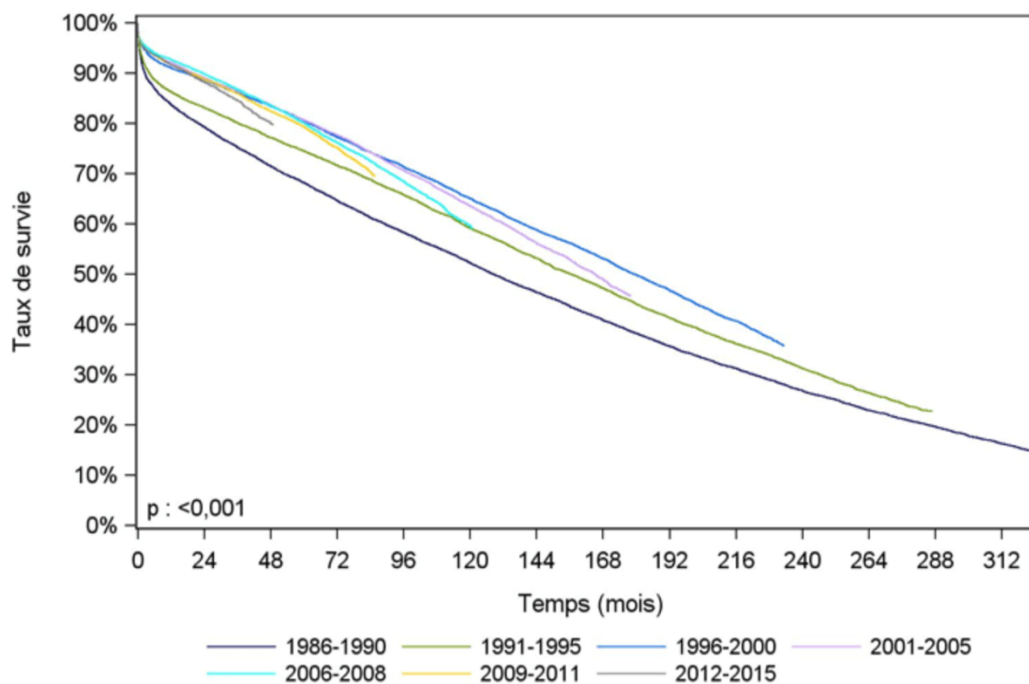


Figure 1 : **Survie du greffon rénal selon la période de greffe de 1986 à 2013.** Tiré du rapport annuel de l'Agence de la Biomédecine 2013. L'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine a permis une amélioration de la survie du greffon à court terme par diminution de l'incidence du rejet aigu cellulaire.

Grace au développement de marqueurs histologiques tels que les dépôts de C4d et aux progrès dans la détection des anticorps anti-HLA ¹ (HLA : *Human Leukocyte Antigen*), la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes (Ag) du donneur (DSA : *donor specific antibody*) et en particulier contre les Ag HLA du apparaît maintenant comme la principale cause de perte de transplants rénaux ².

I. La réponse immunitaire humorale en transplantation rénale

1. Rejet humoral

Le rejet humoral (ABMR : *antibody mediated rejection*) est à considérer comme un continuum, une maladie progressive et chronique secondaire à la présence de DSA (**Figure**

2). Il regroupe le rejet humoral infraclinique, le rejet aigu humoral et le rejet chronique humoral.

Le rejet humoral infraclinique et le rejet aigu humoral sont responsables de lésions inflammatoires de la microcirculation à type de capillarite glomérulaire et péri-tubulaire. La persistance de ces lésions liée à celle des DSA après plusieurs mois ou années entraînent des lésions chroniques associées au déclin de la fonction du greffon.

Ces lésions chroniques sont irréversibles. Elles sont également très tardives par rapport au déclenchement des mécanismes physiopathologiques en cause. Les interventions thérapeutiques doivent pour être efficaces être mise en place bien en amont de l'observation de ces lésions.

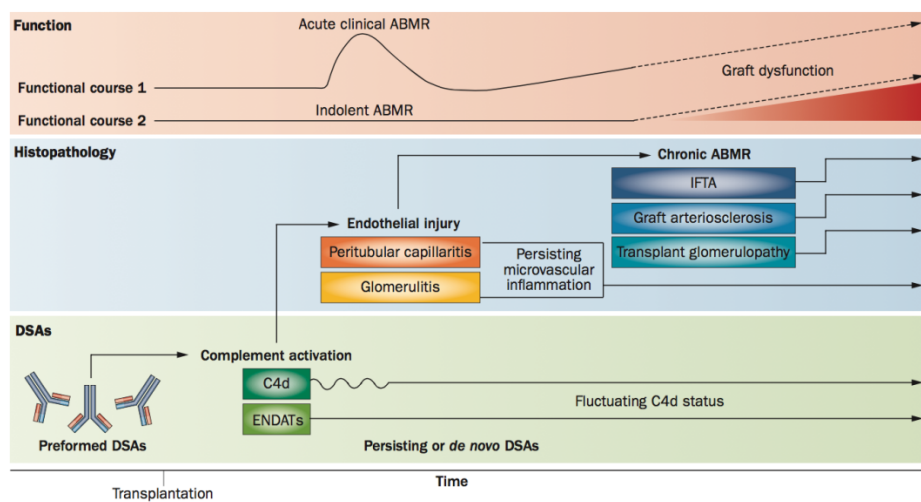


Figure 2 : Histoire naturelle de l'ABMR. Figure de Loupy et coll., 2012 ³. La présence de DSA, préformés ou de novo, est responsable de lésions histologiques inflammatoires de la microcirculation. Ces lésions peuvent évoluer à bas bruit, ou être responsables d'épisodes de rejet humoral aigu pouvant émailler l'évolution du rejet humoral. La persistance de ces lésions de type capillarite glomérulaire et péri-tubulaire va entraîner des lésions chroniques traduites cliniquement par une détérioration de la fonction du greffon.

En transplantation d'organe solide, le rejet chronique constitue une des étiologies majeures de la perte des greffons ⁴. Le rejet chronique à médiation humorale est maintenant une entité parfaitement définie avec des critères diagnostiques précis qui sont régulièrement réévalués dans la classification dite de Banff ⁵. Il est actuellement défini par l'association de trois critères (**Tableau 1**) : la présence d'anticorps dirigés contre un antigène du donneur appelés DSA, l'existence de témoins de l'interaction des anticorps avec l'endothélium vasculaire (présence de dépôts de C4d dans les capillaires péri-tubulaires ou augmentation de marqueurs moléculaires tels que l'expression des transcrits endothéliaux), et la présence de lésions histologiques particulières spécifiques : fibrose intra-intimale, duplication de la membrane basale glomérulaire, aspect multi-lamellé de la membrane des capillaires péri-tubulaires, ou encore fibrose interstitielle et atrophie tubulaire.

Tableau 1 : Classification de Banff 2017 révisée de l'ABMR des greffons rénaux ⁵. Le rejet chronique à médiation humorale est défini par l'association de trois critères diagnostiques précis régulièrement réévalués.

Chronic active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis²

1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including 1 or more of the following:

Transplant glomerulopathy (cg >0) if no evidence of chronic TMA or chronic recurrent/de novo glomerulonephritis; includes changes evident by electron microscopy (EM) alone (cg1a)

Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (requires EM)³

Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes; leukocytes within the sclerotic intima favor chronic ABMR if there is no prior history of TCMR, but are not required

2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including 1 or more of the following:

Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections)

At least moderate microvascular inflammation ([g + ptc] ≥2) in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, ptc ≥ 2 alone is not sufficient and g must be ≥1

Increased expression of gene transcripts/classifiers in the biopsy tissue strongly associated with ABMR, if thoroughly validated

3. Serologic evidence of donor-specific antibodies (DSA to HLA or other antigens). **C4d staining or expression of validated transcripts/classifiers as noted above in criterion 2 may substitute for DSA; however thorough DSA testing, including testing for non-HLA antibodies if HLA antibody testing is negative, is strongly advised whenever criteria 1 and 2 are met**

Une immunisation « de novo » est impliquée dans les rejets aigus tardifs, dans le rejet chronique et dans la glomérulopathie de l'allogreffe. Everly et coll. ont étudié cette allo-immunisation qui dans leur travail survient chez environ 25 % des transplantés rénaux. L'incidence est plus élevée la première année et est corrélée à un âge jeune, au sexe masculin, au nombre d'incompatibilités des antigènes HLA entre donneurs et receveurs, à la présence d'une immunisation avant greffe et à une mauvaise observance thérapeutique ⁶. Ces DSA *de novo* sont associés à la dégradation de la fonction du greffon, conséquence des lésions histologiques mises en évidence sur les biopsies de patients porteurs de ces anticorps ^{7,8}. Les protocoles actuels de prise en charge clinique du rejet humoral utilisent de multiples approches pour diminuer le taux d'anticorps circulant : plasmaphérèse, immunoadsorption, déplétion lymphocytaire B par exemple via un anticorps monoclonal anti-CD20, et pour bloquer la fonction effectrice des anticorps en utilisant notamment des immunoglobulines intraveineuses ou des inhibiteurs du complément. Sur un plan fonctionnel les résultats restent décevants ^{9,10}, probablement du fait d'une mise en place trop tardive des thérapeutiques par rapport aux lésions du greffon ; mais également sur un plan immunologique avec une persistance de la détection des anticorps dans le sérum.

2. Ontogénie, différenciation et fonction des lymphocytes B

La mémoire sérologique est générée d'une part par des anticorps préexistants constituant la mémoire humorale constitutive, sécrétés par des plasmocytes à durée de vie longue (LLPC : *long-lived plasma cells*) et d'autre part par la mémoire humorale réactive dans les cas de réinfection ou de persistance de l'antigène via l'activation des lymphocytes B mémoires spécifiques (mBC : *memory B cells*). Ces mBC, après réactivation par l'antigène et évolution phénotypique vers le profil d'une cellule sécrétrice, sont responsables de la production rapide et de forte amplitude d'anticorps de haute affinité. Ces lymphocytes B (LLPC et mBC) ont

après leur première activation commuté, c'est-à-dire qu'elles expriment et sécrètent des anticorps d'isotypes différents (notamment de type IgG)¹¹ des lymphocytes B naïfs. Les différents stades de maturation des lymphocytes B sont identifiables par la caractérisation de certains de leurs marqueurs de surface (CD : *cluster of differentiation*), et notamment par l'association pour chaque stade de différents CD.

Les lymphocytes B (CD19⁺) participant à la réponse humorale adaptative, résultent d'une première activation des lymphocytes B naïfs (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) spécifiques de l'antigène. L'activation des cellules B nécessitent deux signaux différents, le premier signal correspond à la liaison de l'immunoglobuline de surface avec l'antigène cible, ce qui entraîne une internalisation de ce complexe récepteur des cellules B (BCR : *B cell receptor*) / antigène, et la migration de la cellule B activée dans la zone B/T d'un organe lymphoïde secondaire. Dans l'organe lymphoïde secondaire, le lymphocyte B reçoit le deuxième signal d'activation via l'interaction CD40-CD40L transmise par le lymphocyte T auxiliaire folliculaire (TFH : *T follicular helper*) spécifique du même antigène, après que ce TFH ait été lui-même activé par le lymphocyte B jouant son rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA). Une partie de ces lymphocytes B activés se différencie en plasmablastes (CD19⁺CD38^{high}IgD⁻) de courte durée de vie, qui vont générer précocement des anticorps de type IgM, de faible affinité, une autre fraction des lymphocytes B va se différencier en mBC indépendante du centre germinale et une dernière va migrer dans le centre germinale pour une coopération avec les lymphocytes T auxiliaires folliculaires et les cellules dendritiques. Cette dernière fraction va subir une sélection positive qui va conduire à une commutation de classe et à une hypermutation somatique pour finalement produire des anticorps de haute affinité. Deux processus de différenciation vont avoir lieu dans le centre germinale, soit une différenciation en plasmocytes à longue durée de vie (LLPC), soit en mBC (CD19⁺CD27⁺IgD⁺CD38⁻) dépendant du centre germinale¹².

Dans le centre germinatif, deux types de lymphocytes B mémoires sont générés : des lymphocytes B mémoires IgM⁺ et des lymphocytes B mémoires IgG⁺, qui auront chacun des fonctions différentes lors de la ré-exposition à un antigène. Lors de la restimulation par un antigène connu, les cellules B mémoires IgG⁺ se différencient rapidement en plasmablastes qui vont générer une importante quantité d'anticorps spécifiques, alors que les cellules B mémoires IgM⁺ prolifèrent davantage et migrent vers le centre germinale pour un nouveau cycle de maturation^{13,14} (**Figure 3**).

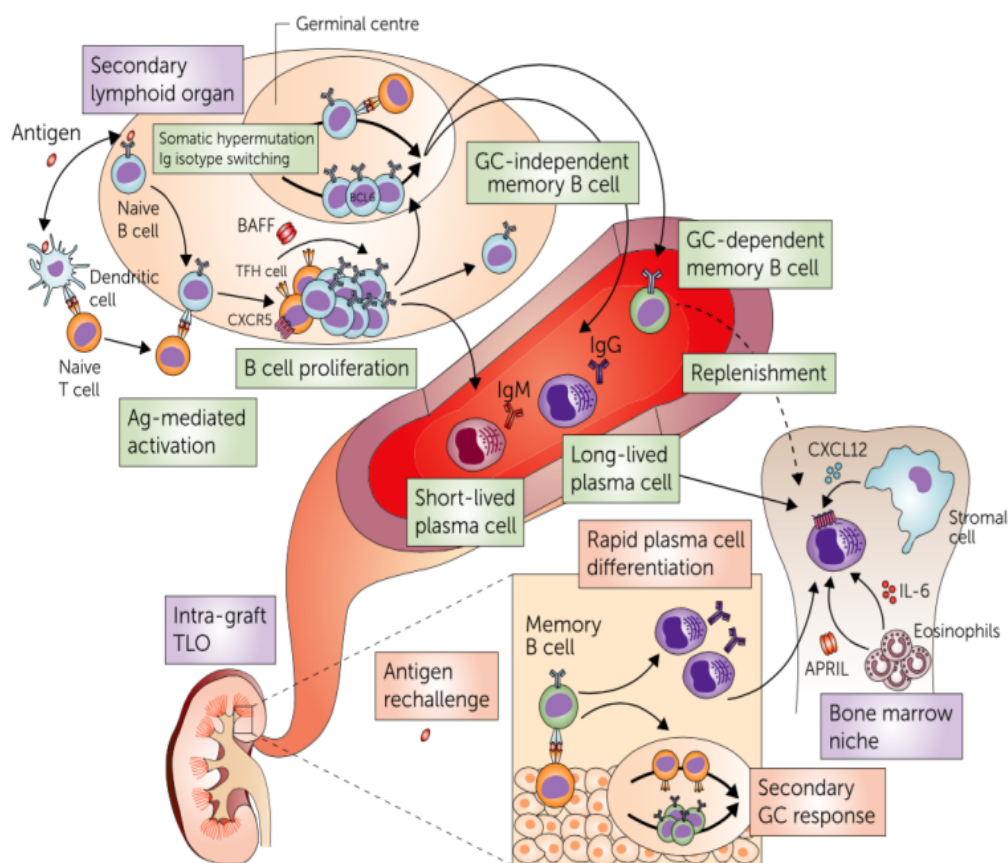


Figure 3 : Activation de la réponse humorale des lymphocytes B mémoires dans le contexte d'une transplantation rénale. Figure de Luque et coll., 2017 ¹⁵. Après la première rencontre avec l'antigène, les lymphocytes B naïfs et les lymphocytes T vont migrer dans les organes lymphoïdes secondaires où les lymphocytes B vont recevoir leur 2^{ème} signal activateur par les lymphocytes T folliculaires helper. Rapidement, des plasmocytes à courte durée de vie vont sécréter des IgM dans la circulation sanguine, pendant que d'autres lymphocytes B activés vont subir dans les centres germinaux des mutations somatiques et des commutations de classes. Puis des lymphocytes B mémoires dépendant du centre germinale et des plasmocytes à durée de vie longue passeront dans la circulation.

3. Lymphocytes B mémoires en transplantation

En situation clinique de transplantation allogénique, l'évaluation de la réponse humorale repose uniquement sur la détection d'anticorps circulants, ce qui est une vue superficielle de son ampleur dans la mesure où l'étude des lymphocytes B mémoires de nos patients n'est pas disponible en routine clinique.

Chez un patient, un sérum dépisté négatif pour la recherche d'anticorps anti-donneur en pré-transplantation ne permet pas d'éliminer complètement la possibilité que des DSA puissent être exprimés dans un contexte de stimulation des mBC de ce patient. Des études réalisées chez des patients transplantés rénaux ont mis en évidence l'intérêt d'évaluer les lymphocytes B mémoires alloréactifs pour mieux identifier le degré d'activation de la réponse immunitaire anti-donneur. Han et coll. ont mis en évidence la présence d'anticorps anti-HLA dans le surnageant de culture cellulaire de lymphocytes B stimulés de patients alors que ces anticorps

n'étaient pas identifiés dans le sérum des mêmes patients initialement ¹⁶. Lucia et coll. ont montré, dans un essai utilisant une technique ELISPOT détectant les lymphocytes B, que chez 30% des patients hautement immunisés, on retrouvait des mBCs réactifs à certains antigènes HLA en l'absence d'anticorps anti-HLA correspondant dans la circulation sanguine ¹⁷.

D'autres études démontrent le rôle potentiel de ces mBC comme témoin de l'immunité humorale des patients pour évaluer le risque de rejet. Purtha et coll., en utilisant une technique ELISPOT, ont rapporté après une infection virale chez la souris, que les anticorps produits par les LLPC étaient spécifiques d'un seul épitope viral alors que les mBC avaient la capacité de répondre contre le virus sauvage, et également contre certains variants ¹⁸. Ceci suggère que la stratification de l'immunisation des patients uniquement sur les DSA retrouvés dans les sérums sous-estime probablement l'alloréactivité à un éventuel donneur.

Sur le plan thérapeutique, dans plusieurs situations cliniques, une action sur la réponse humorale allogénique est mise en place : prévention d'un rejet aigu humoral chez un patient porteur de DSA préformés, traitement d'un rejet humoral aigu ou chronique. Le taux d'anticorps circulants peut être diminué en utilisant des échanges plasmatiques ou des colonnes d'immunoabsorption, mais après arrêt de ces traitements on observe une ré-augmentation du taux de DSA et donc un risque de survenue de lésions de rejet. Des traitements permettent d'inhiber l'activation du complément par les anticorps comme l'éculizumab, anticorps monoclonal dirigé contre le facteur C5 de la cascade du complément, mais d'autres lésions secondaires à la fixation des DSA indépendantes du complément ne sont pas prévenues.

Il est donc nécessaire d'agir également sur la synthèse même de ces anticorps. Mais la neutralisation des cellules sécrétant des anticorps anti-HLA doit pour être totalement efficace éliminer les cellules sécrétrices, et donc agir sur les lymphocytes B mémoires susceptibles de se différencier en cellules productrices d'anticorps. Par exemple, le Rituximab, anticorps anti-CD20, a montré une efficacité dans la déplétion lymphocytaire B périphérique, mais suite à son utilisation persiste une population résiduelle dans les organes lymphoïdes. De plus, cette molécule inhibe la prolifération de lymphocytes B naïfs CD27⁻ mais montre moins d'efficacité sur celle des cellules B mémoires CD27⁺ ¹⁹.

II. Anticiper les lésions du greffon par un dépistage plus précoce de la réponse humorale.

Lors du déclenchement d'une réponse immunitaire humorale, le premier stade est classiquement la sécrétion d'immunoglobulines de type M (IgM). Il semble important d'obtenir plus de précision sur la cinétique d'apparition des IgM anti-HLA puis de celle des

IgG, pour déterminer s'il existe au moins chez certains patients, une fenêtre de temps de durée significative pendant laquelle il existe une production de DSA IgM sans DSA IgG.

Les patients DSA IgM⁺ et DSA IgG n'ont théoriquement pas développé de plasmocytes à longue durée de vie, ni de lymphocytes B mémoires, et une thérapie dirigée contre les lymphocytes B pourrait être susceptible de stopper le processus d'immunisation. Un travail récent d'Everly et coll. en 2018 compare le taux de conversion d'IgM anti-HLA de novo en IgG anti-HLA de novo dans deux groupes de patients transplantés rénaux. Un groupe est traité par ciclosporine, un inhibiteur de la calcineurine, et l'autre groupe est traité par belatacept, bloqueur de la costimulation B/T, interaction nécessaire pour la commutation de classe des immunoglobulines sécrétées par un lymphocyte B activé. Le taux de développement d'IgM anti-HLA de novo était similaire dans les deux groupes (11% dans le groupe belatacept et 17% dans le groupe ciclosporine), avec un délai moyen d'apparition de douze mois. Chez les patients développant des IgM anti-HLA de novo, le taux de conversion en IgG anti-HLA de novo était 2,8 fois plus élevé dans le groupe traité par ciclosporine que dans le groupe traité par belatacept. Ces résultats laissant supposer la possibilité d'intervenir lors d'un dépistage d'IgM anti-HLA, et donc peut-être d'anticiper des lésions causées par des IgG anti-HLA.

De plus, il existe encore un débat en transplantation d'organe sur l'impact des DSA IgM sur le greffon. Dans le travail de Stasny et coll. en 2009, la présence d'IgM anti-HLA isolées apparaît associée à une augmentation de fréquence des lésions de rejet (62% des patients ayant présentés des signes histologiques de rejet vs. 14% des patients sans altération histologique avaient un DSA de type IgM). On retrouve des résultats similaires également dans un contexte de greffe cardiaque avec plus de lésions artéritiques coronaires chez les patients possédant des DSA IgM anti-HLA que ceux sans anticorps²⁰. Le caractère pathogène des IgM n'est pas retrouvé par Everly et coll. chez les patients possédant des DSA IgM anti-HLA isolés. Cet article montre qu'à un an de transplantation, 53% des patients ont des IgM anti-HLA. Le délai médian d'apparition était de 2 mois, et environ la moitié d'entre eux développait une immunisation IgG. Dans cette étude, plusieurs évolutions sont décrites, une persistance des DSA IgM isolés, une coexistence de DSA IgM et de DSA IgG, ou un switch des DSA IgM vers des DSA IgG. La persistance d'IgM associée à l'apparition d'IgG3 est apparue comme un élément de mauvais pronostic²¹. Indépendamment du caractère pathogène des IgM anti-HLA, la persistance de ceux-ci isolément ou associés à des IgG anti-HLA spécifiques du même antigène est peu en accord avec les connaissances sur l'ontogénie des lymphocytes B et la réponse immunitaire humorale.

OBJECTIFS

Devant l'impact majeur des DSA IgG sur la survie des transplants rénaux et le manque actuel d'efficacité des traitements pour prévenir les lésions liées à ces anticorps, la prévention de l'apparition de ces DSA est une priorité dans la prise en charge des patients transplantés. Les DSA IgM pourraient-ils être considérés comme un marqueur précoce d'allo-immunisation permettant d'utiliser une thérapeutique ciblée avant le développement d'une immunisation IgG ?

Dans cette optique, la première étape vise à mettre au point une technique de détection des anticorps anti-HLA de type IgM adaptée de la technique Luminex®. Cette démarche impose la mise au point d'un test de dépistage des IgM anti-HLA fiable, reproductible et utilisable en routine, sachant que les IgM sont classiquement difficile à dépister et à caractériser précisément du fait de leur manque de spécificité, du risque de réactions croisées, et de leur capacité de polymérisation.

La deuxième étape, développée en parallèle, consiste à suivre le versant cellulaire de l'immunisation pour tenter d'en maîtriser mieux la cinétique et d'établir une corrélation humorale et cellulaire. L'outil utilisé sera l'étude des immunoglobulines sécrétées par les plasmablastes induits par une stimulation polyclonale des lymphocytes B mémoires circulants. Plus précisément, nous souhaiterions comparer les caractéristiques des immunoglobulines des surnageants à celles du sang circulant.

MATERIELS ET METHODES

A- Mise au point d'un test de dépistage des IgM anti-HLA

I. Sérums

1. Contrôles positifs IgM anti-HLA

Il s'agit pour une part de sérums (n=7) de patients insuffisants rénaux chroniques greffés ou inscrits sur liste d'attente de greffe et identifiés comme ayant des anticorps anti-HLA de type IgM lors d'une recherche d'anticorps en lymphocytotoxicité (LCT) contre le panel. Une autre partie des sérums (n=8) provenaient d'une cohorte de surveillance d'immunisation maternelle post-partum recueillie dans le cadre d'un projet de recherche antérieur ²², et deux autres sérums avaient été identifiés au laboratoire d'histocompatibilité de l'hôpital Saint-Louis (Don du Pr Jean-Luc Taupin).

2. Témoin négatif

Les sérums utilisés comme témoins négatifs étaient isolés à partir d'un kit de cytophérèse de donneur de sexe masculin, n'ayant jamais été transfusé, de l'Établissement Français du Sang de Bourgogne Franche-Comté (EFS BFC, site de Besançon), inactivés par la chaleur (sérum chauffé à 63°C pendant 30 minutes). Les prélèvements ont été obtenus après signature par le donneur d'un consentement éclairé.

3. Sérums positifs en IgG anti-HLA

Les sérums utilisés pour les expériences sont des sérums de patients prélevés dans un contexte de surveillance d'immunisation post-transplantation rénale et testés en routine au laboratoire HLA de l'EFS BFC pour la recherche d'IgG anti-HLA. Il s'agissait de sérums connus comme positifs Luminex pour le dépistage et/ou l'identification d'IgG anti-HLA en Luminex®.

II. Détection des DSA IgM par la technologie LUMINEX®

1. Principe

La technologie Luminex® de détection d'anticorps anti-HLA de type IgG utilise des antigènes HLA purifiés fixés sur des microsphères en polystyrène. Ces microsphères renferment un mélange précis connus de deux fluorochromes. Lorsque des anticorps anti-HLA sont présents dans le sérum, ils se lient aux antigènes HLA spécifiques portés par les billes Luminex®. Après une phase de lavage, la phase de réaction avec un anticorps secondaire anti-IgG humaine couplé à la phycoérythrine permet de révéler les réactions positives. La lecture des résultats est réalisée par un cytomètre qui permet, à l'aide d'un premier laser de séparer les billes en fonction de leurs fluorescences propres, puis, à l'aide

d'un deuxième laser de déterminer une valeur de fluorescence liée à la présence d'anticorps anti-HLA reconnue par l'anticorps anti-Ig marqué. La réactivité d'un échantillon est déterminée à partir des données brutes de fluorescence enregistrées par l'appareil pour chaque bille recouverte d'antigène HLA ²³ (**Figure 4**).

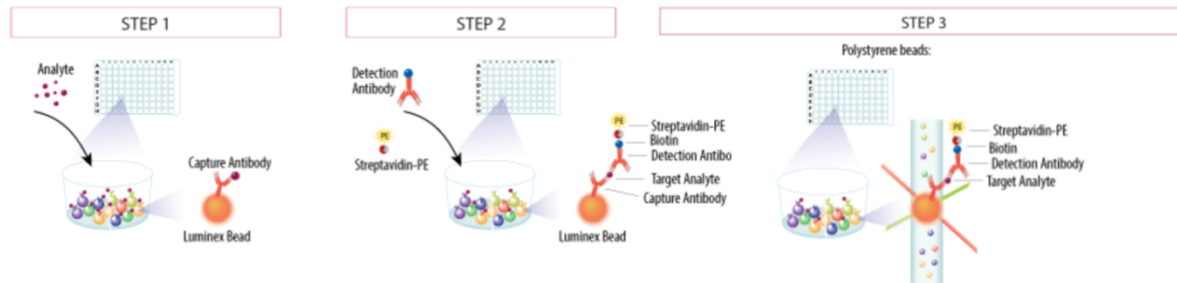


Figure 4 : Principe de la technique Luminex®. Après une incubation de 30 minutes des billes recouvertes d'antigènes HLA connus avec le sérum du patient, un anticorps secondaire marqué dirigé contre les immunoglobulines humaines est ajouté. Après un second temps d'incubation, la lecture au Luminex® permet d'identifier les billes et de déterminer la valeur de fluorescence liée à la présence ou non d'anticorps anti-HLA à la surface de cette bille.

2. Les différents kits Luminex® utilisés

a) *Le test mixte One Lambda LABScreen®*

Le test mixte est un test de dépistage qui détecte la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA de classe I et/ou de classe II. Chaque bille est recouverte par un ensemble défini d'antigènes HLA différents pour chaque panel de billes. Sont également présentes deux billes contrôles :

- une bille contrôle négatif qui n'est pas recouverte d'antigène anti-HLA,
- une bille contrôle positif recouverte d'IgG humaines purifiées,

qui permettent d'évaluer le bruit de fond de chaque sérum testé et de valider le test.

Nous avons utilisé le kit LABScreen™ Mixed Class I & II de One Lambda (One Lambda, LSM 12, Canoga Park, États-Unis).

b) *Le kit Single Antigen One Lambda LABScreen®*

Le test Single Antigen est un test d'identification qui permet de mettre en évidence la spécificité des anticorps présents dans les sérums positifs après dépistage. Dans ce kit, chaque bille Single Antigen ne porte qu'un seul antigène HLA. Nous avons utilisé les kits LABScreen™ Single Antigen bead Class I & II de One Lambda (One Lambda, LS1A04 et LS2A01). Ces kits contiennent également une bille contrôle positif et une bille contrôle négatif.

3. Modification de la technique Luminex® pour la détection des anticorps anti-HLA de type IgM.

Pour tester la détection d'IgM dirigés contre des antigènes HLA, nous avons utilisé le kit de dépistage LABScreen™ Mixed Class I & II de One Lambda.

a) L'anticorps anti-IgM conjugué

L'anticorps anti-IgM utilisé pour la détection des anticorps anti-HLA de type IgM est un anticorps dirigé contre la chaîne lourde des immunoglobulines M humaines, conjugué à un fluorochrome : R-phycoerythrin (PE) (Southern Biotech 2020-09, Birmingham, États-Unis). Nous avons utilisé deux dilutions de l'anticorps anti-IgM humaine pour la mise au point de la technique Luminex (cf. Résultats partie I).

b) Protocole utilisé

Dans une plaque de filtration 96 puits (Merck, Multiscreen-BV, ref. MABVN1250, Darmstadt, Allemagne), 20 µL de chaque sérum pur ou dilué au demi ont été incubés en présence d'un volume de 3 µL de billes à température ambiante, en agitation douce pendant 30 minutes. Chaque sérum a été testé en double pour la mise au point de la technique. Après 4 lavages avec le LABScreen™ Wash Buffer (One Lambda®), 100 µL de l'anticorps secondaire anti-IgM (Southern Biotech 2020-09) dilué à 1/100 ou 1/200 ont été ajoutés dans chaque puit, avant une deuxième incubation à température ambiante, en agitation douce pendant 30 minutes. Après 4 nouvelles étapes de lavages, les billes ont été remises en suspension dans 80 µL de PBS 1X avant lecture au Luminex®.

III. Détection des DSA IgG par la technologie LUMINEX®

Le principe, et les différents réactifs utilisés, à l'exception de l'anticorps secondaire, étaient identiques à ceux décrits précédemment pour la détection des DSA IgM.

1. Protocole utilisé

Le protocole de détection des DSA IgG est à la seule différence de la concentration de l'anticorps secondaire le même que celui décrit précédemment. Pour la recherche de DSA IgG, réalisé en routine en laboratoire HLA, l'anticorps secondaire anti-IgG était dilué au centième.

2. L'anticorps anti-IgG conjugué

L'anticorps utilisé pour la détection des IgG anti-HLA était un anticorps dirigé contre la chaîne lourde des immunoglobulines G humaines, couplé à un fluorochrome : R-phycoerythrin (PE) (One Lambda® LS-AB2, Hanovre, Allemagne).

IV. Prétraitements des sérums comportant des IgG anti-HLA

1. Endopeptidase

Une enzyme (FabRICATOR®, 2000ui A0-FR1-020, GENOVIS, Lund, Suède) a été utilisée pour la digestion des IgG contenus dans certains sérums. Cette endopeptidase dégrade les IgG à un site spécifique juste au-dessous de la région charnière, ce qui résulte en la formation d'un fragment F(ab)'₂ et d'un fragment constant. L'utilisation est optimale dans un tampon neutre contenant du sel type PBS, dont le pH est compris entre 6 et 8, à une température de 37°C, et pour une réaction de 30 minutes minimum. L'enzyme est efficace pour une concentration d'enzyme entre 0,5 et 10g/L, la quantité nécessaire pour la réaction est de 1 unité d'enzyme pour 1 µg d'IgG. Le sérum de patient testé était donc dilué dans du PBS, dans un ordre de grandeur permettant d'obtenir une quantité d'IgG dans les limites d'action de l'endopeptidase.

2. Filtration

Pour éliminer une éventuelle IgM anti-IgG, une solution retenue a été la filtration du sérum, afin d'éliminer l'agrégat éventuel formé par un anticorps IgG fixé par des IgM anti-IgG. Une fraction du sérum pouvait avant d'être testé être filtré par ultracentrifugation à 13 000 rpm (rotations par minutes) de 10 minutes à travers un filtre de 0,22 µm (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices, UFC30GV25, MERCK, Darmstadt, Allemagne).

3. Dilution

La dilution des sérums entraîne une diminution de la densité des anticorps présents par unité de volume. Cette diminution de densité peut diminuer le signal provoqué par la fixation d'un anticorps sur sa cible ou au contraire l'augmenter si la concentration initiale de l'anticorps entraînait un encombrement spatial qui ne permettait pas la fixation de tous les anticorps par un effet de compétition (effet prozone). Les sérums ont été dilués dans du PBS. Deux dilutions ont été testées : à une concentration de 1/10^{ème} et de 1/5^{ème}.

4. EDTA

L'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), en chélatant le calcium, inhibe la formation du complexe C1. Il permet donc de lever un éventuel effet prozone causé par une saturation des sites antigéniques disponibles pour la fixation de l'anticorps secondaire du fait d'un encombrement spatiale par les molécules du complément.

90 µL de sérum était mis en incubation avec 10 µL d'EDTA (EDTA sel disodique 0,1 mol/l (0,2N) en solution aqueuse, 28662.290, VWR CHEMICALS, Belgique). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante sur une plaque rotative en agitation douce, le sérum était testé en dépistage Luminex® selon le protocole décrit précédemment.

V. Analyse des résultats et interprétation

L'acquisition des données a été effectuée automatiquement par l'analyseur de flux LABScan™ 100 (Luminex® 100/200) avec plate-forme Luminex® XY, puis la lecture et l'analyse par le logiciel HLA Fusion™. La réactivité d'un échantillon est déterminée à partir des données brutes de fluorescence enregistrées par l'appareil pour chaque bille recouverte d'antigènes HLA.

Dans un contexte de recherche et pour identifier les conditions permettant une meilleure détection, nous avons considéré les billes comme positives c'est-à-dire comme ayant fixé des IgM anti-HLA, quand la MFI était supérieure à 500.

B- Stimulation polyclonale de lymphocytes B

I. Cellules mononuclées

1. Mise au point de la culture

Nous avons utilisé des cellules mononuclées (PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) issues de donneurs sains de l'EFS BFC pour la mise au point de la technique de culture cellulaire et la stimulation polyclonale des lymphocytes B. Les prélèvements ont été obtenus après signature par le donneur sain d'un consentement éclairé. Les cellules ont été isolées à partir du sang total sur gradient de Ficoll (Ficoll-Plaqué™ premium, référence : CMSMSL01-0U, Courtaboeuf, France) puis récoltées et congelées afin de pouvoir mettre en culture simultanément des cellules venant de donneurs différents.

2. Cellules mononuclées des patients transplantés

Secondairement, la culture cellulaire et la stimulation polyclonale des lymphocytes B ont été réalisées sur des cellules mononuclées congelées issus des patients transplantés rénaux du CHU de Besançon inclus dans la cohorte multicentrique Orly-Est (sérum et cellules mononuclées prélevés à J0, 3 mois, 12 mois et 36 mois de la transplantation). Les patients sélectionnés étaient ceux ayant développés une immunisation IgG anti-HLA *de novo* contre leur donneur (DSA) mis en évidence lors d'un dépistage de routine ou lors d'un épisode de dégradation clinico-biologique de la fonction du greffon rénal ayant mené à la recherche de DSA. Nous n'avons retenu que les patients dont le délai entre la première détection des DSA de type IgG et la date de prélèvements des cellules mononuclées étaient assez bref pour détecter la sécrétion d'immunoglobuline anti-HLA (IgM et/ou IgG) après stimulation B polyclonale dans le surnageant de culture. *In fine*, nous avons retenu 7 patients dont les délais entre la date de première identification du DSA de type IgG et la date du prélèvement de cellules mononuclées sont présentés dans le **tableau 2**.

Les contrôles utilisent des PBMC isolées de patients également transplantés mais dont le suivi au long cours n'a jamais mis en évidence de DSA *de novo*. Ils sont identifiés témoin 1 (T1), témoin 2 (T2), témoin 3 (T3). Ces cellules sont utilisées comme contrôles de deux façons, elles ont été cultivées sans stimulation polyclonale, juste en présence d'interleukine (IL) 2 : témoins non stimulés (nsT1, nsT2, nsT3), et parallèlement ont été cultivées en présence des antigènes et interleukines de stimulation : témoins stimulés (sT1, sT2, sT3).

Tableau 2 : Patients retenus pour le test de stimulation polyclonale des lymphocytes B circulants. Sept patients ayant développés des DSA IgG anti-HLA au cours de leur suivi post-transplantation rénale ont été retenus pour réaliser une culture des PBMC conservées dans le cadre du protocole Orly-Est. Ces patients ont été sélectionnés sur le délai court entre la date d'apparition des DSA et la date du prélèvement disponible.

Identification du patient	Date de la première identification de DSA IgG	Date de la transplantation	Date du prélèvement des PBMC	Délai entre le prélèvement des PBMC et la date du premier DSA IgG (en mois)
GUJE	12/11/2012	15/09/2011	24/09/2012	1,6
LELY	01/03/2017	21/03/2014	02/01/2017	2
VACH	01/01/2011	24/09/2010	24/09/2010	3,2
ORCH	24/05/2016	02/06/2017	02/06/2017	0
MEGE	08/08/2012	01/04/2011	21/03/2012	4,5
PAPI	15/04/2015	15/04/2014	15/04/2015	0
ZARA	14/10/2011	11/06/2010	13/07/2011	3

II. Culture cellulaire

1. Conditions de culture

Les cultures ont été réalisées dans des plaques 24 puits (Corning® CellBIND® 24-well, New York, États-Unis) à 37°C, dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ pendant une durée maximale de 8 à 10 jours. Le protocole de culture est adapté de celui utilisé dans les études de stimulation lymphocytaire B de Snanoudj et coll. ^{24,25}. Brièvement, chaque puit contenait à la mise en culture 5x10⁶ de cellules mononuclées dans un millilitre de milieu dit RPMI complet contenant : RPMI (RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™, Gibco, Waltham, États-Unis), 7% de sérum de veau foetal (FBS : *Fœtal Bovine Serum*) (FBS 10270, Gibco, Waltham, États-Unis), 1% de pénicilline-streptomycine (PS) (CABPES01-0U Life Science Eurobio, Les Ulis, France). À ce milieu était ajouté :

- 50 mmol/L de 2-mercaptoethanol (M-7522, lot 119H09142, Sigma®, Saint-Louis, États-Unis),
- 10 ng/mL de *Poke Weed Mitogen* (PMW) (Ref. 08780341, MP Biomedicals, Illkirch, France). Le PMW est un polysaccharide de type lectine purifiée venant d'une plante

(*Phytolacca americana*); stimulant la prolifération des lymphocytes B ainsi que la différenciation terminale en cellules productrices d'anticorps.

- 100 ng/mL de protéine de surface A (SpA) (82526-1MG, Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, États-Unis) d'une souche inactivée de *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC) : utilisée dans les études de stimulation de lymphocytes B pour déclencher une réponse cellulaire B indépendante des lymphocytes T du fait de sa condition de « super-antigène » entraînant l'agglutination des immunoglobulines de surface.

- 6 mg/mL de Cytosine Phosphate Guanine (CpG) (TLRL-2006, InVivoGen, San Diego, États-Unis) : motif non méthylé appartenant à l'ADN bactérien, reconnu par le récepteur TLR9 (Toll-like Receptor 9) présent chez l'homme sur les cellules dendritiques ainsi que sur les lymphocytes B (naïfs et mémoires). Cet antigène inhibe l'apoptose, stimule la prolifération lymphocytaire, la sécrétion de cytokines et de molécules de costimulation, ainsi que l'évolution phénotypique des lymphocytes B mémoires en cellules sécrétrices d'anticorps avec une réponse de type Th1-like.

- 100 UI/mL d'IL2 (Human IL-2, research grade, 130-097-742, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), nécessaire à la survie et à la prolifération des lymphocytes B et T activés.

- 10 ng/mL d'IL4 (Human IL-4, research grade, 130-093-915, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), stimulant la prolifération des lymphocytes B activés.

- 10 ng/mL d'IL6 (Human IL-6, research grade, 130-095-365, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), molécule co-adjuvante promouvant la production d'anticorps par la stimulation de production d'IL21 par les lymphocytes T CD4+.

- et 10 ng/mL d'IL21 (Human IL-21, research grade, 130-094-563, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), orientant la différenciation des lymphocytes B activés vers des cellules sécrétrices d'anticorps, et stimulant également la prolifération des lymphocytes B activés.

Au jour 6 de la culture, 100 UI/ml d'IL2 (Miltenyi Biotec) ont été ajoutés dans chaque puit.

2. Marquage des sous-populations lymphocytaires B en cytométrie

Le phénotypage des sous-populations B avant et après la culture avec stimulation polyclonale a été évalué par une technique de cytométrie en flux (**Figure 5**) (données recueillies par BD LSRF-FORTESSA™ X-20, et analysées par le logiciel BD FACS Diva) après marquage membranaire des cellules mononuclées. A l'arrêt de chaque culture, 3×10^6 de cellules étaient isolées si possible, dans les cas où le nombre de cellule était trop faible la totalité des cellules étaient utilisées. Un premier marquage de viabilité était effectué grâce à un marqueur de mortalité cellulaire FvD/APC-H7 (Fixable Viability Dye, Efluor 780, référence : 65-0865-14,

E Bioscience). Ce FvD était dilué au millième, puis 100 µL de cette solution diluée était ajouté aux 3 millions de cellules pour une incubation de 10min, à 4°C, dans l'obscurité. Ensuite, les cellules étaient marquées, par l'ajout de 3 µL de chacun des 5 anticorps conjugués répertoriés dans le **tableau 3** avant une incubation de 15 minutes également à 4°C et dans l'obscurité. Le marquage était réalisé afin de phénotyper par association de différents marqueurs de surface et de leurs niveaux d'expression ^{26,27} :

- Les lymphocytes B naïfs : CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺
- Les lymphocytes B mémoires : CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺ CD38
- Les plasmablastes : CD19⁺ CD38^{high} IgD⁺.

Tableau 3 : Anticorps conjugués utilisés pour le phénotypage et la quantification des populations lymphocytaires B suivies. L'association des signaux recueillis au cytomètre en flux de ces différents anticorps permet le suivi des différentes populations d'intérêt : les lymphocytes B naïfs (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺), les lymphocytes B mémoires (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺ CD38) et les plasmablastes (CD19⁺ CD38^{high} IgD⁺).

Cible	Fluorochrome	Référence	Fournisseur
CD19	R-phycoerythrin	PE/anti-human CD19, 2111040	SONY, San Jose, Etats-Unis
CD24	Alexa Fluor® 647	AF647/anti-humanCD24, 2155550	SONY, San Jose, Etats-Unis
CD27	Brilliant Blue™421	BV421/anti-human CD27, 2382090	SONY, San Jose, Etats-Unis
CD38	Peridinin Chlorophyll Cyanine 5,5	PerCP-Cy5/anti-human CD38, 2383070	SONY, San Jose, Etats-Unis
IgD de surface	Fluorescein isothiocyanate	FITC/anti-human IgD, 2341030	SONY, San Jose, Etats-Unis

3. Mise au point

La mise au point de la culture cellulaire et de la stimulation polyclonale des lymphocytes B a été réalisée sur des cellules mononuclées de donneurs sains. La première expérience de culture cellulaire et de stimulation polyclonale a été réalisée pour définir les temps de culture et de stimulation permettant la meilleure induction de plasmablastes (CD19⁺ CD38^{high} IgD⁺). Le jour de l'arrêt de la culture, les surnageants ont été prélevés. Après un traitement par centrifugation pour éliminer les éventuels débris cellulaires, les surnageants ont été conservés à -80°C pour la réalisation d'une recherche de DSA de type IgM et également de type IgG par technique LUMINEX® (cf. partie Résultats paragraphe AII).

III. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en pourcentage avec moyenne et écart type. Les différences entre les groupes ont été analysées 2 par 2 par un test non paramétrique (test de Mann-Whitney), avec un risque alpha de 5%. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative.

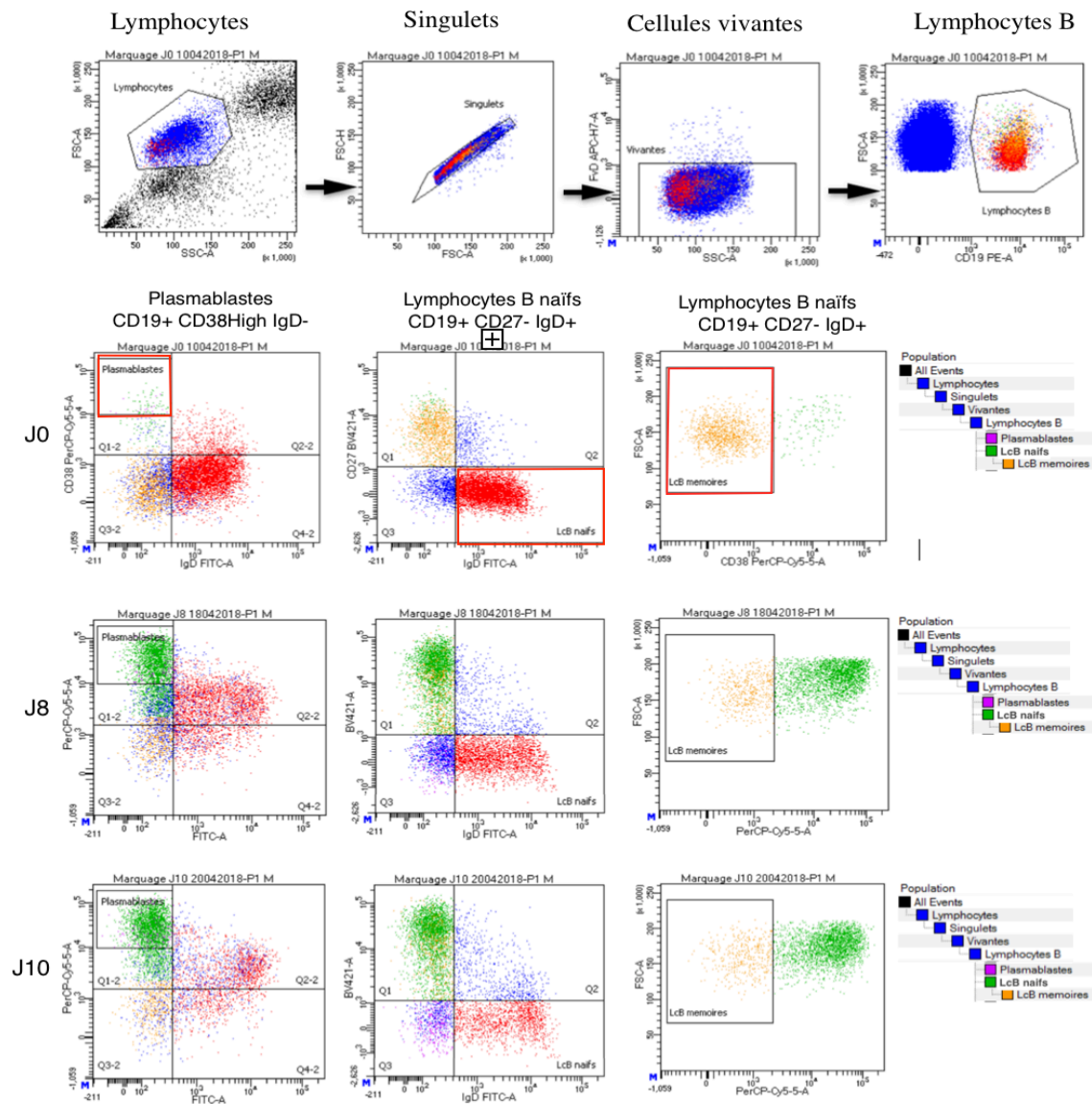


Figure 5 : Stratégies de fenêtrage utilisées pour les analyses de cytométrie en flux des différentes populations cellulaires étudiées.

RESULTATS

A- Mise au point d'un test de dépistage des IgM anti-HLA

I. Détermination des conditions optimales du test

La première expérience a été réalisée pour déterminer les conditions les plus adaptées au dépistage d'IgM anti-HLA : deux dilutions de sérums (pur et dilué au demi) et deux dilutions d'anticorps secondaire conjugué (dilué au centième et dilué aux deux centièmes) ont été testées.

Quatre associations de ces deux variables ont été expérimentées (**Figure 6**) :

- condition A : Sérum dilué au demi et anticorps dilué aux deux centièmes,
- condition B : sérum dilué au demi et anticorps dilué au centième,
- condition C : sérum pur et anticorps dilué aux deux centièmes, et
- condition D : sérum pur et anticorps dilué au centième.

L'expérience a été conduite sur dix sérums. Pour la validation, les tests ont été réalisés en double et la valeur retenue est la moyenne des deux valeurs mesurées pour chacune des 19 billes (les billes contrôles positives et contrôles négatives n'ont pas été prises en compte).

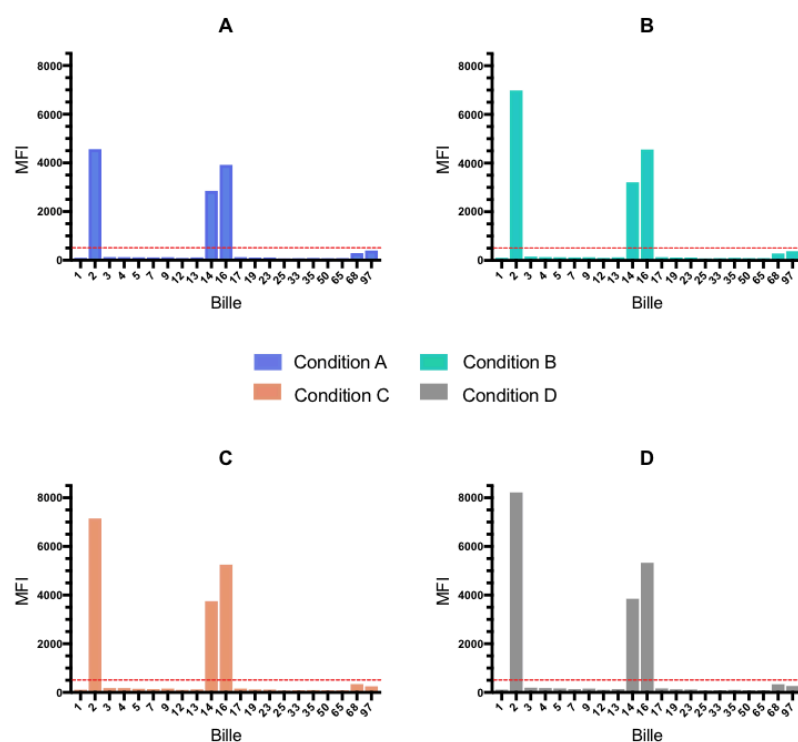


Figure 6 : Exemple de MFI recueillies par le Luminex® pour un des sérums testés lors de la première expérience (Patient 12) selon les 4 conditions (A, B, C, D). Ces quatre graphiques illustrent les MFI obtenues pour chacune des billes du kit de dépistage lors du test d'un sérum de patient selon les quatre conditions expérimentales évaluées. La moyenne des MFI entre le puit test et son double de chacune des 19 billes est représentée par une barre d'histogramme. Les billes considérées « positives » sont celles dont la moyenne des MFI entre le puit test et son double est supérieur à 500.

1. Détermination de la condition la plus sensible

Pour chaque bille positive (MFI > 500), nous avons calculé la différence des moyennes des MFI entre chaque condition. La condition considérée comme la plus sensible est celle pour laquelle la moyenne de ces différences avec les autres conditions était la plus élevée (**Tableau 4**). Nous avons ainsi pu classer les conditions testées de la plus sensible à la moins sensible. Ainsi, la plus sensible était la condition qui associait un sérum pur à un anticorps conjugué dilué au centième (condition D) suivie de la condition C (sérum pur et anticorps conjugué dilué aux deux centième). Venaient ensuite dans l'ordre les conditions B puis A.

Tableau 4 : Évaluation de la sensibilité des différentes conditions par calcul de la moyenne des différences entre les MFI mesurées pour chaque bille positive (MFI supérieure à 500). La condition D est supérieure en sensibilité aux autres techniques avec une moyenne de différence calculée à 353,1 par rapport à la condition C, à 531,3 avec la condition B et à 1108,1 avec la condition A.

Conditions	A	B	C	D
A		576,8	755	1108,1
B			178,2	531,3
C				353,1
D				

2. Détermination de la condition avec la meilleure reproductibilité intra-expérience des mesures

Le deuxième critère retenu pour le choix de la condition était la reproductibilité des mesures entre deux puits (test/double) pour une même expérience. Le coefficient de variation, calculé par le rapport de l'écart-type à la moyenne, est un marqueur de dispersion. Pour chaque bille testée, négative et positive, pour un sérum donné, le coefficient de variation de la MFI a été calculé pour chacun des couples test/double dans une condition donnée. Puis la moyenne des coefficients de variation des dix sérums testés a été calculée pour chacune des conditions A, B, C et D. Les deux conditions pour lesquelles les coefficients de variation sont les plus faibles sont les conditions B et C (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Évaluation de la reproductibilité intra-expérience des différentes conditions par calcul du coefficient de variation. Par condition, pour chaque binôme test/dupliqua pour chaque bille des dix patients testés, le coefficient de variation a été calculé. Puis les moyennes de ces coefficients de variation pour chaque condition ont été calculées. La condition B est la plus reproductible avec une moyenne du coefficient de variation calculée à 7,8%.

Condition	A	B	C	D
Moyenne des coefficients de variation (%)	10,2	7,8	8,4	10,1

3. Choix de la condition retenue

En tenant compte de la sensibilité et de la reproductibilité de chaque condition nous avons retenu la condition C (sérum pur et anticorps aux deux centièmes).

Pour s'assurer de la reproductibilité inter-expérience de la condition retenue, trois des sérums testés positifs en IgM anti-HLA (sérum avec au moins une bille positive (MFI > 500)) dans la première expérience de mise au point ont été de nouveau testés avec la condition C. La moyenne et l'écart-type de chaque couple de puits test/double ont été calculés pour chaque bille de chacune des deux expériences et les moyennes de ces deux critères ont permis de calculer un coefficient de variation moyen inter-expérience de 6,2%. Si l'on calcule ce coefficient de variation moyen en utilisant l'écart-type entre les 4 valeurs de MFI mesurées pour chaque bille (2 valeurs par expérience), le coefficient de variation moyen inter-expérience est de 14,6%.

II. Validation du test

Cette expérience nous a permis de confirmer avec notre technique Luminex® la présence d'IgM anti-HLA sur 15 sérums connus comme positifs en lymphocytotoxicité (LCT) pour la recherche d'IgM anti-HLA ou identifiés positifs par d'autres laboratoires.

Parmi les 15 sérums testés, connus comme étant IgM anti-HLA positifs en LCT, tous ont été dépistés positifs avec la méthode Luminex® que nous avons mise au point. Cependant, l'étude Luminex® a mesuré un nombre variable de billes positives selon les sérums testés (**Tableau 6**), avec schématiquement deux types de profils de positivité. Certains patients présentaient des IgM anti-HLA de spécificité étroite et ne positivaient que quelques billes du kit de dépistage (de 1 à 6, n=9/15), alors que d'autres sérums présentaient une positivité large, avec de nombreuses billes positives (de 7 à 21, n=6/15) (**Figure 7**). Cette positivité à large spectre reste difficile à interpréter car elle fait suspecter, soit une immunisation IgM anti-HLA à large spectre, soit une IgM anti-HLA reconnaissant un épitope porté par plusieurs billes.

Tableau 6 : Nombre de billes retrouvées positives dans les 15 sérums connus positifs IgM anti-HLA en LCT testés en dépistage Luminex®. On retrouve schématiquement deux types de profil de positivité avec des sérums pour lesquels peu de billes sont positives, et d'autres avec une large réactivité dont l'interprétation reste difficile.

Nombre de billes retrouvées positives en dépistage Luminex® IgM (21 billes)	1 à 6	7 à 11	12 à 16	17 à 21
Nombre de sérums (15 sérums testés)	9	2	3	1

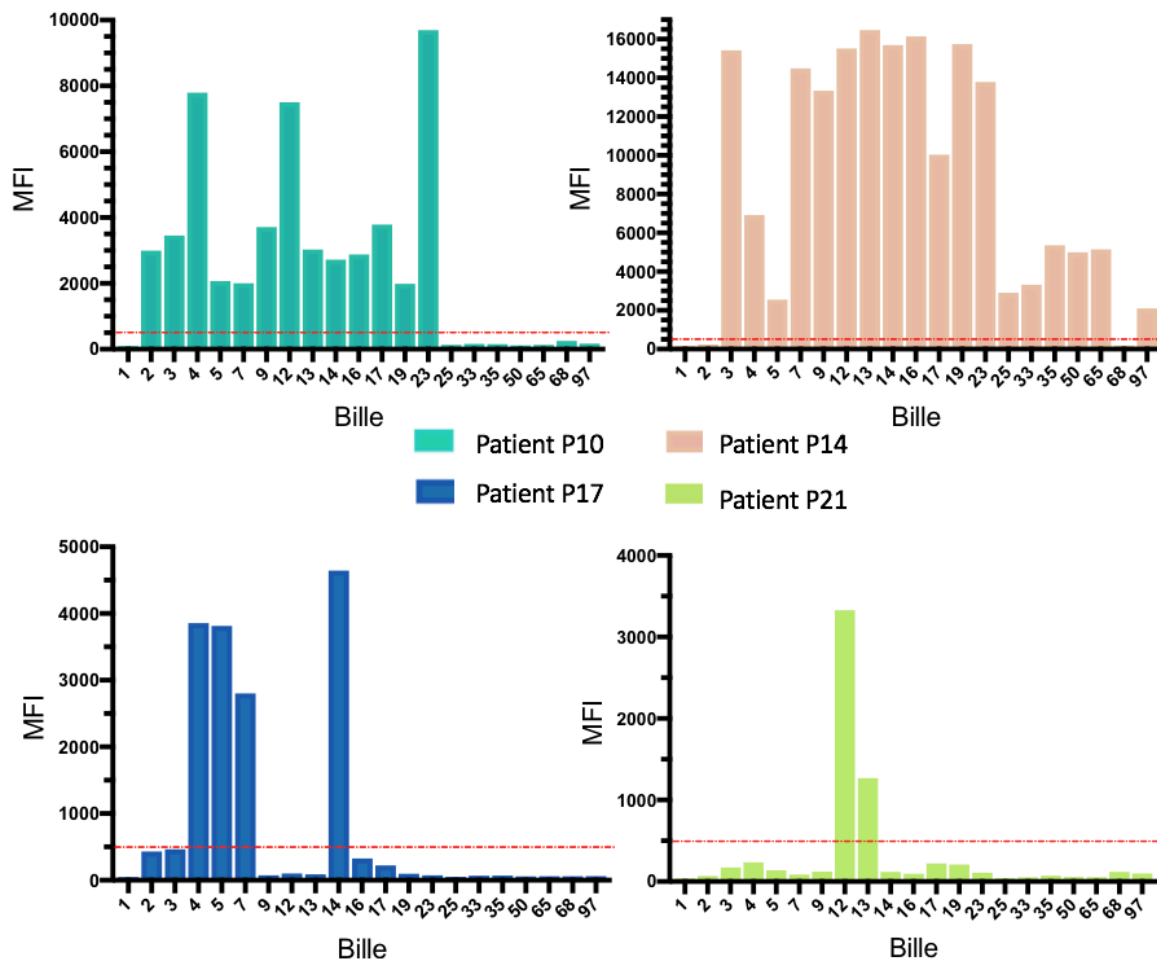


Figure 7 : Deux profils de positivité du dépistage d'IgM anti-HLA. Le test des différents sérums connus positifs IgM en LCT nous ont permis de mettre en évidence deux types de profil de positivité des IgM anti-HLA dépistées au Luminex®, soit un profil restreint avec peu de billes positives (P17 et P21), soit des profils larges avec de nombreuses billes positives dont l'interprétation reste difficile (P10 et P14).

III. Identification des anticorps IgM anti-HLA détectés en Luminex® Single Antigen

A titre exploratoire, nous avons appliqué les conditions expérimentales déterminées par notre technique de dépistage IgM Luminex® (sérum pur et anticorps dilué aux deux centièmes) à la technique Luminex® Single Antigen d'identification de la ou des spécificités anti-HLA des IgM présents dans un sérum (une seule spécificité antigénique HLA portée par chaque bille). Nous avons ainsi testé trois sérums dépistés positifs pour la présence d'IgM anti-HLA.

Pour deux (P10 et P11) des trois sérums testés, le test d'identification a permis de retrouver les mêmes spécificités identifiées par la technique LCT IgM sur panel (négativation après DTT) (données non montrées). Pour le troisième sérum (P12), le test de dépistage Luminex® IgM a été retrouvé positif, avec une fixation de l'anticorps anti-IgM sur les billes porteuses des antigènes déterminés en LCT. Mais lors de l'expérience d'identification en Luminex®

Single Antigen, on ne retrouvait pas de corrélation avec les antigènes portés par les billes positives et les antigènes identifiés antérieurement en LCT.

IV. Positivité de la bille contrôle positif du kit de dépistage

1. Premières observations

La bille n°2 (bille contrôle positif de la fonctionnalité de l'anticorps secondaire anti-IgG dans le test standard pour la détection d'anticorps anti-HLA de type IgG) a été retrouvée positive (MFI supérieure à 500) 10 fois sur 15, avec une MFI variant de 500 à plus de 10 000. Cette bille ne devrait pas être marquée par l'anticorps secondaire anti-IgM et ne devrait pas se positiver lors du test de dépistage d'IgM anti-HLA. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous avons incubé un des sérums positifs pour la bille n°2 avec du dithiothréitol (DTT), dégradant les ponts disulfures des IgM, avant de réaliser de nouveau le test (**Figure 8**). Le DTT a négativé le dépistage IgM Luminex® sur toutes les billes positives y compris la bille n°2, nous permettant de considérer que la positivité de la bille 2 est due à la présence d'IgM anti-IgG (type facteur rhumatoïde) et non pas à un manque de spécificité de notre anticorps secondaire.

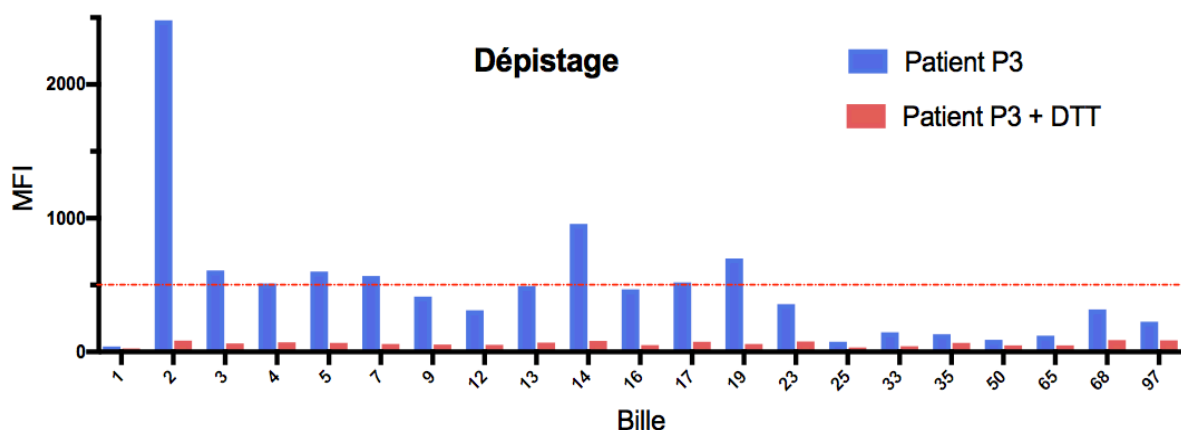


Figure 8 : Inactivation de la positivité des billes par traitement du sérum au DTT. Pour exemple, le sérum du patient P3 a été testé lors de la même expérience de dépistage Luminex® avant et après traitement par DTT. Le sérum traité ne présente plus aucune bille positive, le signal positif de la bille n°2 est bien dû à la présence d'une IgM probablement non spécifique qui reconnaît les IgG fixées sur cette bille.

2. Mettre en évidence la présence d'une IgM anti-IgG

La positivité de la bille n°2 pour certains des sérums est donc expliquée par la présence d'une IgM se fixant sur cette bille recouverte d'IgG humaines et secondairement reconnue par l'anticorps conjugué.

Un des sérums de patient testé en dépistage IgM Luminex® a été retrouvé positif uniquement pour la bille n°2, sans anticorps IgM anti-HLA. L'étude du dossier de ce patient a permis de

mettre en évidence un résultat positif pour la recherche de facteur rhumatoïde (FR). Pour la suite, ce sérum est identifié : Sérum FR+.

a) Première expérience

Pour essayer de mettre en évidence cette IgM anti-IgG, et les possibles difficultés d'interprétation associées, nous avons mélangé le sérum de ce patient FR+, avec un sérum IgG+. Pour un mélange dans les mêmes proportions (50%) de chacun des deux sérums, le test dépistage IgM Luminex® n'a pas mis en évidence de bille positive autre que la bille n°2 (Figure 9). L'hypothèse retenue est que la dilution au demi du sérum IgG+ lors de son mélange à concentration égale avec le sérum FR + entraîne une diminution de la densité d'IgG recouvrant les billes HLA ce qui ne permet pas une fixation d'IgM anti-IgG suffisante pour être détectée.

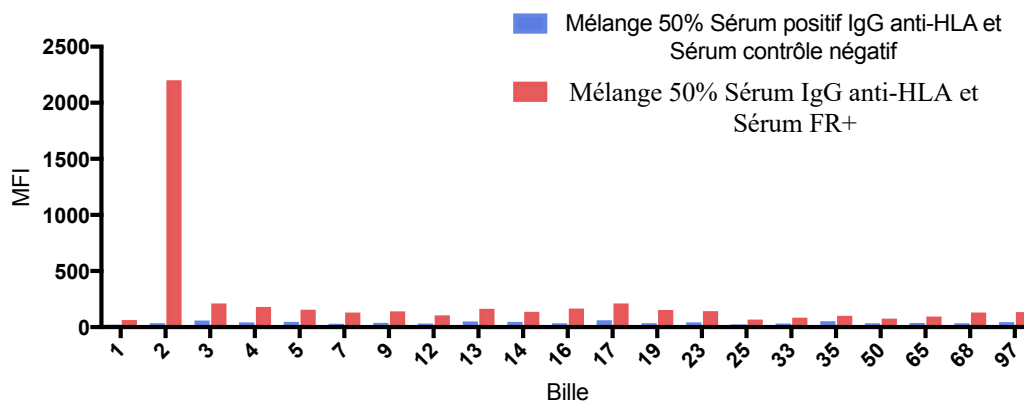


Figure 9 : Dépistage IgM Luminex® d'un mélange de 50% de sérum Bille n°2 + et d'un sérum IgG+. Le contrôle composé de 50% du sérum IgG+ et d'un contrôle négatif est négatif sur toutes les billes du kit de dépistage en Luminex®. Le mélange composé de 50% de sérum bille n°2 + et de sérum IgG+ positive la bille n°2 uniquement.

b) Test d'autres concentrations en sérum FR+

Pour tester l'hypothèse d'une densité d'IgG anti-HLA insuffisante sur les billes pour permettre une fixation de l'IgM anti-IgG détectable, d'autres proportions de mélange ont été testées. Différents sérums connus IgG anti-HLA positifs ont été testés. Ces sérums de patients transplantés rénaux avaient été identifiés comme contenant des IgG anti-HLA lors de dépistages systématiques réalisés par le laboratoire HLA. Nous avons sélectionné les sérums de 5 patients positifs en dépistage IgG Luminex® en classe I. Ces sérums sont identifiés : Sérum IgG+ A, Sérum IgG+ B, Sérum IgG+ C, Sérum IgG+ D et Sérum IgG+ E.

Ces sérums IgG+ connus ont été mélangés avec le sérum FR+ selon deux concentrations différentes :

- Soit 8/10^{ème} de sérum IgG+ et 2/10^{ème} de sérum FR+
- Soit 6/10^{ème} de sérum IgG+ et 4/10^{ème} de sérum FR+.

Les résultats sont présentés dans le **tableau 7** et la **figure 10**.

En dépistage Luminex® IgM, le sérum IgG+ C est retrouvé positif pour la bille n°2 avec une MFI à 682,2 avant même son mélange avec le sérum FR+. Ce sérum n'a donc pas été pris en compte pour l'interprétation de la suite de cette expérience.

On remarque d'abord que l'ajout de sérum FR+ est associé à une augmentation de la MFI de la bille n°2, dès le mélange composé de 2/10^{ème} de sérum FR+. Et cette augmentation est associée à la quantité de sérum FR+ puisque la MFI de cette bille est encore plus importante avec le mélange composé de 4/10^{ème} de sérum FR+.

Pour le sérum IgG+ D, le dépistage IgG Luminex® identifie la bille n°3 comme seule positive, avec une MFI à 1895,9. Le dépistage IgM Luminex® du mélange du sérum IgG+ D et FR+, la bille n°3 est retrouvée également positive, avec une MFI > 500 pour les deux mélanges. Pour ce sérum IgG+ D, le mélange au sérum FR+ semble permettre la détection en dépistage IgM Luminex® de l'anticorps anti-HLA de type IgG responsable de la positivité de la bille n°3 en dépistage IgG.

L'analyse des sérums IgG+ A, IgG+ B et IgG+ E est plus difficile. Pour le sérum IgG+ A, les cinq billes retrouvées les plus positives en dépistage IgG sont les mêmes que celles retrouvées comme ayant les MFI les plus élevées pour le dépistage IgM du mélange IgG+ A à 8/10^{ème} et FR à 2/10^{ème}. Pour l'autre dilution, le résultat est moins probant ; pour le dépistage IgM du mélange IgG+ A à 6/10^{ème} et FR à 4/10^{ème}, seulement trois des billes sont retrouvées parmi les cinq les plus positives du dépistage IgG du sérum initial pur. Pour le sérum IgG+ E, il n'y a qu'une concordance entre les billes les plus positives en dépistage IgG et les billes les plus positives en dépistage IgM après mélange avec le sérum FR+.

Lors des dépistages IgM Luminex® des mélanges des quatre sérums IgG+ (IgG+ A, IgG+ B, IgG+ C, IgG+ D) avec le sérum FR, les billes n°4, n°13 et n°17 ont été retrouvées systématiquement parmi les cinq billes possédant les MFI les plus hautes. Alors que ces trois billes n'étaient pas systématiquement parmi les cinq billes les plus positives lors des dépistages IgG des sérums avant mélange au sérum FR.

Tableau 7 : Mélange de sérums connus IgG anti-HLA + avec deux concentrations d'un sérum FR+. Les données grisées sont les données non accessibles ou non utilisées dans l'interprétation. Le sérum IgG+ A n'a pas été testé en dépistage IgM Luminex® avant mélange avec le sérum FR+, mais devant la MFI de la bille n°2 du mélange inférieur à 500, ce sérum est supposé bille n°2 négative. Le sérum IgG+ C ayant une MFI de la bille n°2 spontanément positif à 682,2, il n'a pas été pris en compte dans l'interprétation de l'expérience. Sont surlignées en vert les billes dont les MFI font parties des 5 les plus élevées en dépistage IgG Luminex® et qui sont retrouvées également parmi les 5 MFI les plus élevées en dépistage IgM Luminex® dans les mélanges sérums IgG+ et sérum FR+.

CLASSE I	Dépistage IgM Luminex								
	Dépistage IgG Luminex		Sérum IgG+	Mélange 8/10ème de sérum IgG+ et 2/10ème de sérum FR+		Mélange 6/10ème de sérum IgG+ et 4/10ème de sérum FR+			
	Les 5 billes ayant les MFI les plus élevées	MFI	MFI Bille n°2	MFI Bille n°2	Les 5 billes ayant les MFI les plus élevées	MFI	MFI Bille n°2	Les 5 billes ayant les MFI les plus élevées	MFI
Sérum IgG+ A	5	6375,4			5	240,2		5	365,6
	7	5414,0			3	160,6		3	246,6
	4	4937,0		213,3	17	152,9	414,0	17	218,8
	17	4335,1			4	143,9		9	196,8
	3	3963,9			7	143,2		14	196,7
Sérum IgG+ B	3	3532,9			3	147,7		3	175,0
	12	1504,8			17	132,3		17	165,2
	23	1271,4	245,8	292,4	4	125,6	280,1	4	144,7
	19	514,9			19	112,1		19	126,3
	17	279,6			13	104,5		13	126,0
Sérum IgG+ C	3	944,3			16	331,4		16	279,8
	19	635,3			14	241,6		3	234,7
	14	575,1	682,2	724,1	3	235,1	579,0	14	226,9
	12	337,9			4	206,5		17	208,0
	16	318,9			17	197,6		4	201,0
Sérum IgG+ D	3	1895,9			3	529,0		3	512,5
	5	132,4			17	101,9		17	151,2
	19	117,1	23,4	71,0	4	95,0	169,83	4	136,0
	7	116,4			13	87,2		13	126,4
	14	113,9			9	75,9		5	114
Sérum IgG+ E	12	1699,5			3	537,3		3	531,4
	23	1801,1			4	314,0		4	315,9
	16	1112,8	29,2	69,5	17	292,5	129	17	301,0
	14	1224,2			19	257,8		13	271,2
	3	1133,3			5	255,8		5	270,8

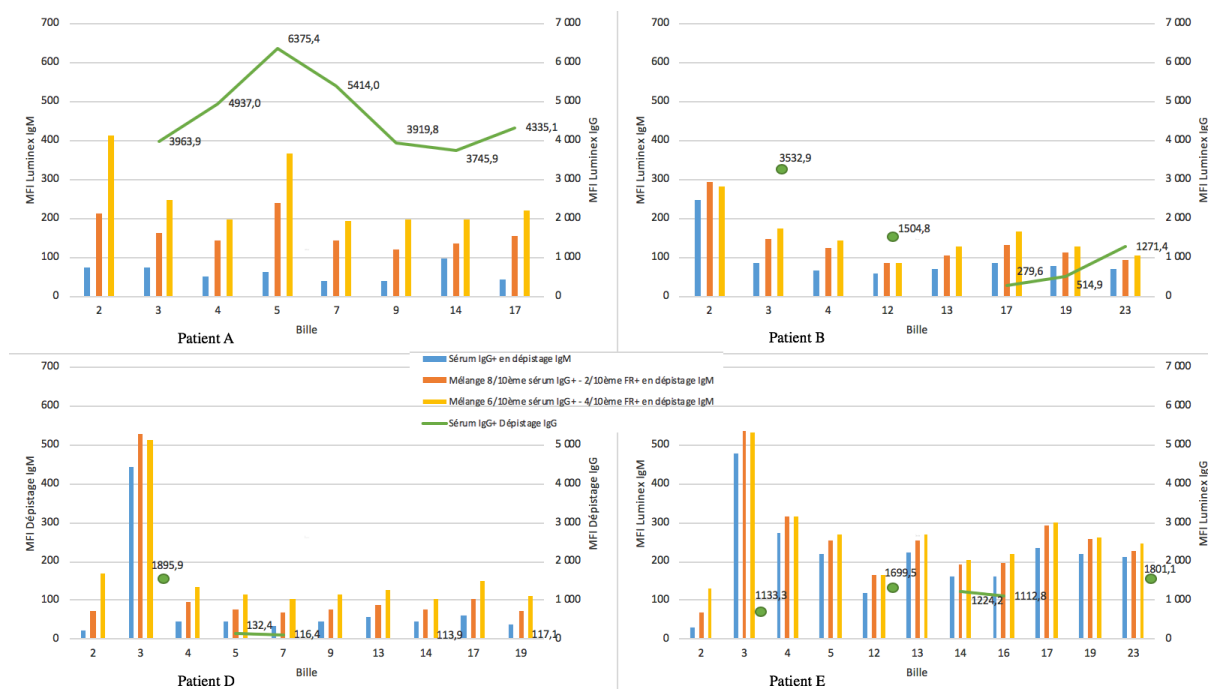


Figure 10 : Mélange de sérums IgG anti-HLA positifs avec deux concentrations d'un sérum FR+. 5 sérums positifs en IgG anti-HLA ont été mélangés avec un sérum facteur rhumatoïde + (FR+), selon deux proportions différentes : 6/10^{ème} de sérum IgG+ et 4/10^{ème} de sérum FR+, et 8/10^{ème} de sérum IgG+ et 2/10^{ème} de sérum FR+. Ces mélanges étaient ensuite testés en dépistage IgM Luminex®. L'ajout de sérum FR+ est associé à une augmentation de la MFI de la bille n°2, dès le mélange composé de 2/10^{ème} de sérum FR+. Pour le sérum IgG+ D, le dépistage IgG Luminex® identifie la bille n°3 comme seule positive, avec une MFI à 1895,9. Le dépistage IgM Luminex® du mélange du sérum IgG+ D et FR+, la bille n°3 est retrouvée également positive, avec une MFI > 500 pour les deux mélanges.

3. Éliminer un facteur confondant dont le témoin est la positivité de la bille n°2

Pour se débarrasser de doutes dans l'interprétation de dépistage d'IgM anti-HLA éventuellement faussée par la présence d'une IgM anti-IgG, nous avons testé plusieurs méthodes expérimentales afin d'éliminer soit l'IgM anti-IgG dans le sérum ou directement les IgG grâce à un prétraitement. Les méthodes retenues sont : l'utilisation d'une endopeptidase dégradant spécifiquement les IgG, l'utilisation d'un prétraitement par filtre, et la dilution des sérums. L'efficacité de ces méthodes a été évaluée principalement par leurs capacités à diminuer la MFI de la bille n°2, témoin de la présence d'une éventuelle IgM anti-IgG, sans trop altérer les signaux des autres billes du kit de dépistage.

a) Validation de l'activité de l'endopeptidase

La première méthode testée a consisté en l'utilisation d'une endopeptidase permettant la digestion des IgG spécifiquement au-dessous de la région charnière, résultant en la formation d'un fragment F(ab')₂ et d'un fragment constant. Cette enzyme agit spécifiquement sur les IgG sans action sur les IgM ou autres immunoglobulines.

Un sérum identifié antérieurement positif en anticorps IgG anti-HLA de classe I et pour lequel le dosage pondéral des IgG circulantes était disponible a été utilisé. La première étape a consisté en une dilution au demi du sérum dans du PBS, tampon salé nécessaire à l'action de l'enzyme, et afin de diminuer la concentration du sérum en IgG, initialement à 12,4g/L pour atteindre les limites autorisées pour l'utilisation de l'enzyme (0,5 à 10 mg/mL). Pour mettre en évidence l'action de l'enzyme indépendamment de l'action de la dilution sur les modifications de MFI, le même sérum a été dilué dans les mêmes proportions de PBS sans ajout de l'endopeptidase pour contrôle négatif (**Figure 11**).

En dépistage Luminex® IgG, on observe après incubation du sérum avec l'endopeptidase une négativation de toutes les billes du kit avec des MFI inférieures à 100. Le test du contrôle retrouve une diminution des MFI des billes lors de la dilution du sérum au demi dans du PBS. Cette diminution du signal s'explique par une diminution de la densité d'anticorps d'IgG anti-HLA, et donc une diminution de la fixation de l'anticorps secondaire.

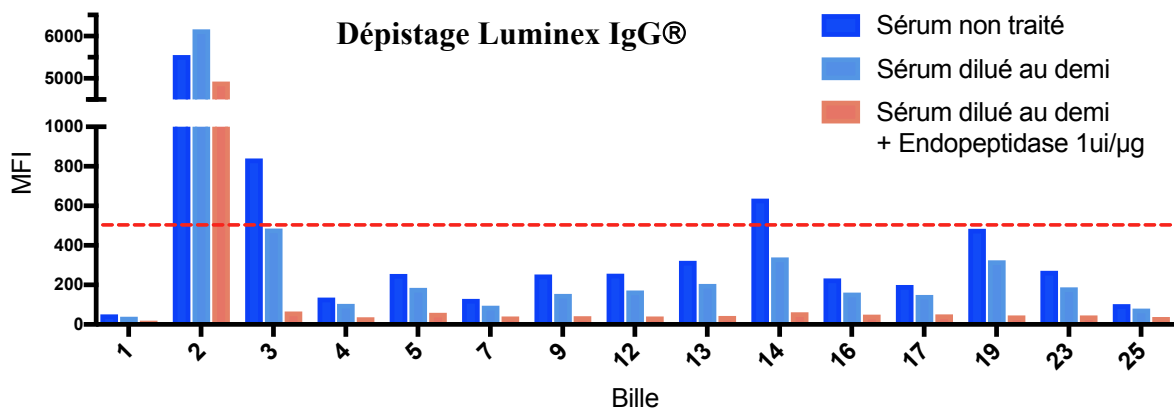


Figure 11 : Traitement d'un sérum IgG anti-HLA positif par une endopeptidase IgG spécifique. Le dépistage Luminex® IgG du sérum traité par l'endopeptidase ne retrouve que des MFI faibles < 100. Le test du sérum dilué non traité par l'enzyme retrouve une diminution modérée de la MFI des billes expliquée par la diminution de la densité des anticorps IgG sur les billes. Cette expérience permet de valider l'efficacité de l'endopeptidase dans l'élimination des IgG anti-HLA. La positivité de la bille n°2 est due à la fixation de l'anticorps secondaire anti-IgG sur la bille contrôle positif recouverte d'IgG humaines.

b) Comparaison des différentes méthodes

(1) Rationnel de l'interprétation

Ces différentes méthodes ont été testées sur des sérums positifs en dépistage Luminex® IgM pour la bille n°2 mais aussi pour au moins une autre bille du kit. Le but était d'évaluer laquelle de ces méthodes permettait une diminution du signal de la bille n°2, témoin de la présence d'un facteur confondant dans l'interprétation de la positivité du dépistage. Cependant, la MFI de la bille n°2 ne peut être considérée pour évaluer l'efficacité de l'endopeptidase. En effet, l'endopeptidase ne dégrade que les IgG, et donc ne modifie pas la fixation de l'anticorps secondaire anti-IgM sur une éventuelle IgM anti-IgG fixée sur la bille

contrôle recouverte d'IgG humaines. L'efficacité de l'endopeptidase serait identifiée par la négativation d'une bille différente de la bille contrôle après traitement du sérum par l'enzyme (**Figure 12**).

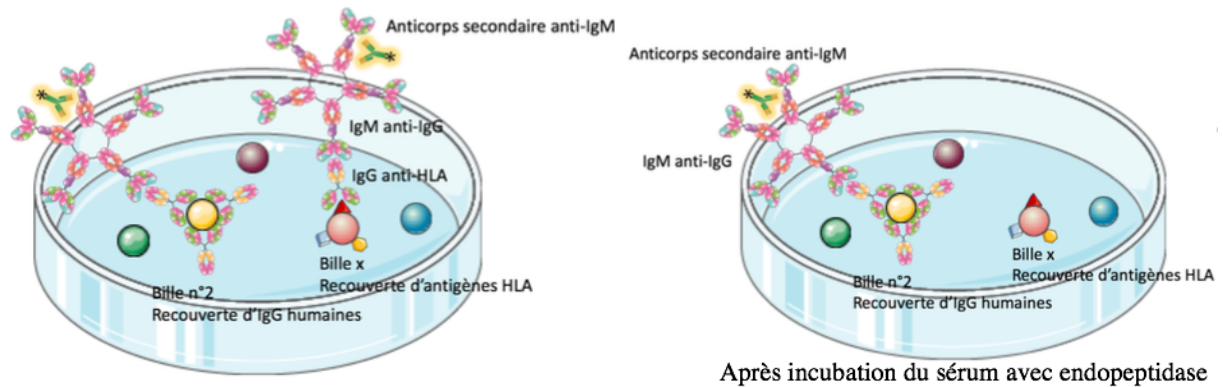


Figure 12 : Illustration de l'utilisation de l'endopeptidase et de l'interprétation de la MFI de la bille n°2. La fixation d'une IgG anti-HLA sur une bille du kit de dépistage, peut être en théorie révélée par un anticorps secondaire anti-IgM si une IgM anti-IgG a reconnu le premier anticorps. La dégradation des IgG anti-HLA par l'endopeptidase n'entraîne pas de modification de fixation d'une IgM anti-IgG sur la bille n°2, contrôle positif du kit de dépistage.

(2) Élimination de l'hypothèse d'un effet prozone

Le prétraitement par EDTA retrouve des MFI proches des MFI du sérum non traité, hormis pour la bille n°2 dont le signal est augmenté. La suspicion d'effet prozone n'est pas confirmée par les résultats obtenus pour les sérums dilués pour lesquels le signal de la bille n°2 diminue avec la dilution du sérum (**Figure 13**).

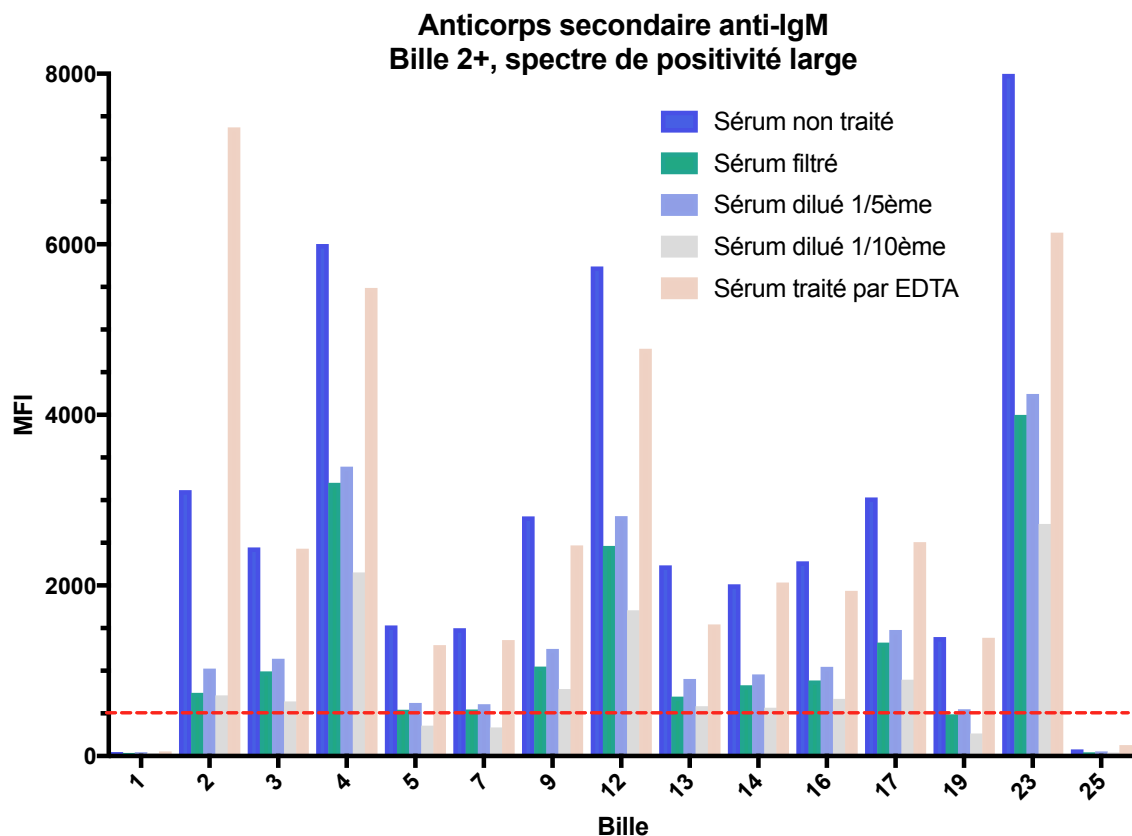


Figure 13 : Comparaison des conséquences sur les MFI de différentes méthodes de prétraitement d'un sérum testé en dépistage IgM Luminex®. Le prétraitement par EDTA du sérum entraîne une augmentation du signal de la bille n°2, on peut donc initialement suspecter un effet prozone. Cependant, les résultats de la MFI de la bille n°2 pour les dilutions à 1/5^{ème} et à 1/10^{ème} ne concordent pas avec un encombrement spatial puisque montrent une diminution de ce signal.

(3) Comparaison de l'efficacité des méthodes retenues

Quatre sérums (P7, P10, P15, P20), connus positifs pour la bille n°2 et pour d'autres billes du kit de dépistage, ont été testés non traités, après traitement par endopeptidase, après traitement par filtration (**Figure 14**). Pour 2 de ces sérums (P7, P20), les dilutions au demi, à 1/5^{ème} et à 1/10^{ème} ont été également testées. La dilution au demi était réalisée afin d'éliminer un effet simple de la dilution pour le test enzymatique (nécessitant la présence d'un tampon salé pour l'action de l'endopeptidase).

Chaque test était réalisé en double, les moyennes des 2 MFI obtenues pour chacune des billes étaient ensuite utilisées. Pour évaluer l'impact de chaque méthode, le rapport MFI initiale/MFI après traitement était calculé pour chaque bille, et la moyenne de ces rapports était calculée selon plusieurs modalités (**Tableau 8**).

Pour cette expérience, devant une limitation de la quantité disponible d'endopeptidase, la quantité utilisée n'a pas été adaptée parfaitement à la concentration en IgG de chacun des sérums. Pour rappel, l'utilisation optimale de l'enzyme est décrite pour une quantité d'une

unité d'endopeptidase pour un microgramme d'IgG. Une dose standard, équivalent à une quantité d'IgG maximale de 10g/L dans le sérum a été utilisée.

		Sérum non traité / Sérum traité par endopeptidase	Sérum non traité / sérum traité par filtration	Sérum non traité / sérum dilué à 1/2	Sérum non traité / sérum dilué à 1/5ème	Sérum non traité / sérum dilué à 1/10ème
P7	Billes n°1 à 25	0,7	1,4	1,3	2,0	3,4
	Bille n°2		1,3	2,0	4,9	11,2
	Billes avec MFI > 500 avant traitement	0,8	1,2	1,0	1,0	1,4
	Billes n°3 à 25	0,6	1,3	1,2	1,7	2,8
P10	Billes n°1 à 25	1,3	1,8			
	Bille n°2		2,5			
	Billes avec MFI > 500 avant traitement	1,3	1,7			
	Billes n°3 à 25	1,3	1,7			
P15	Billes n°1 à 25	1,3	1,8			
	Bille n°2		1,3			
	Billes avec MFI > 500 avant traitement	1,4	1,8			
	Billes n°3 à 25	1,2	1,8			
P20	Billes n°1 à 25	1,2	1,0	1,3	1,7	2,3
	Bille n°2		1,1	1,7	2,8	3,5
	Billes avec MFI > 500 avant traitement	1,1	0,9	1,2	1,5	2,2
	Billes n°3 à 25	1,1	1,0	1,3	1,6	2,2
Moyennes	Billes n°1 à 25	1,1	1,5	1,3	1,8	2,9
	Bille n°2		1,6	1,8	3,9	7,4
	Billes avec MFI > 500 avant traitement	1,2	1,6	1,2	1,5	2,2
	Billes n°3 à 25	1,1	1,5	1,2	1,6	2,5
		n=4	n=4	n=2	n=2	n=2

Tableau 8 : Moyenne selon plusieurs modalités des rapports MFI initiales / MFI post traitements de sérums positifs en dépistage Luminex® IgM. Chaque test de méthode pour chaque sérum était réalisé en double. La moyenne des MFI pour chacune des billes étaient calculées, puis rapportée à la MFI moyenne pour cette bille lors du test du sérum non traité. La moyenne de ces rapports a été calculé selon différentes modalités : de la bille n°1 à 25, bille n°2 uniquement, billes positives avant traitement, billes n°3 à 25 (donc sans les deux billes contrôles du kit).

L'activité de l'endopeptidase est probablement sous-estimée par l'utilisation d'une dose non adaptée pour chaque sérum. L'utilisation de ce prétraitement ne modifie pas les signaux des billes, que ce soit pour les billes positives avant traitement ou pour l'ensemble des billes du kit, il n'y a donc pas de risque de perte d'information à type de perte de signaux positifs.

Les dilutions, au cinquième, au dixième, dans du PBS, permettent une forte diminution du signal de la bille n°2, jusqu'à une diminution d'un rapport 11 pour un des sérums dilués (P7) au dixième. Mais cela s'accompagne d'une diminution des signaux des autres billes avec un risque de perte de signaux positifs. Nous notons que les moyennes de ces rapports ne sont réalisées que sur deux sérums et que le patient P7 montre une importante variation de la MFI de la bille n°2 avec les dilutions.

La filtration entraîne une diminution des signaux de l'ensemble des billes (bille n°2, billes positives, ensemble des billes) dans le même ordre de grandeur. Cette méthode paraît donc peu efficace pour éliminer un quelconque facteur confondant à type d'IgM anti-IgG. De plus,

devant une diminution des MFI d'environ 50%, cette méthode entraine un risque de perte de signaux positifs.

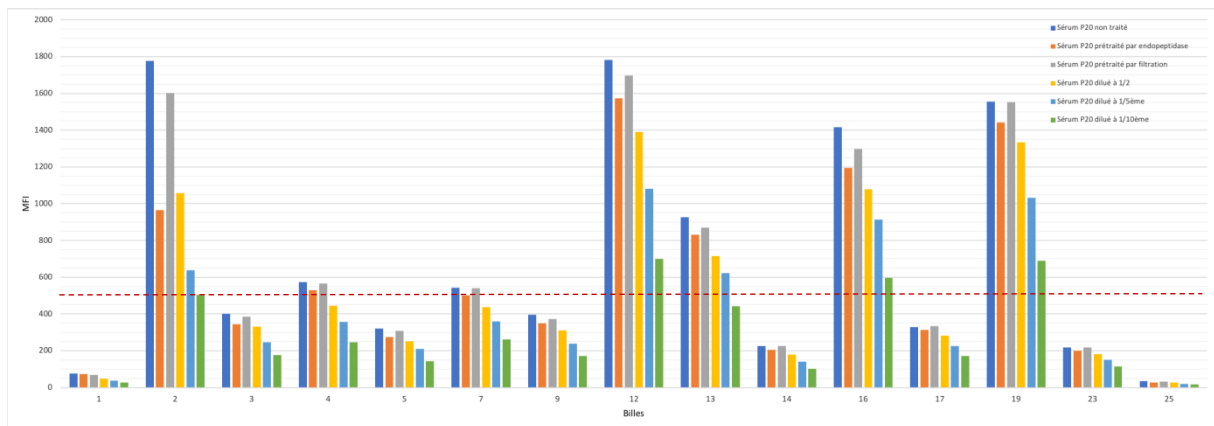


Figure 14 : Exemple : Test du Sérum P20 en dépistage Luminex® IgM : sérum non traité, sérum après traitement par endopeptidase, sérum après traitement par filtration et sérum à différentes dilutions (1/2, 1/5^{ème}, 1/10^{ème}).

B- Stimulation polyclonale de lymphocytes B

Pour tenter de mieux comprendre la cinétique d'immunisation et d'établir une corrélation humorale et cellulaire, une expérience de stimulation polyclonale de lymphocytes B en culture a été mise au point. La stimulation des lymphocytes B mémoires permet l'induction de plasmablastes, et ainsi de comparer les immunoglobulines sécrétées par les lymphocytes B stimulés aux immunoglobulines retrouvées à l'état basal chez les patients.

I. Mise au point de stimulation polyclonale de lymphocytes B en culture

La mise au point de l'expérience de stimulation polyclonale de lymphocytes B en culture a été réalisée sur les PBMC de donneurs sains, cinq ont reçu une stimulation complète (P1, P2, P3, P4 et P5), quatre ont servi de témoin négatifs (TN1, TN2, TN3 et TN4). Cette mise au point a été réalisée lors de deux expériences dont les résultats ont été regroupés pour l'analyse. A J0, J8 et J10, un marquage des sous-populations B en cytométrie en flux a permis de déterminer la proportion des différentes populations étudiées. Lors de la première expérience, ce marquage était également réalisé à J3 et J6. Les plasmablastes (CD19⁺CD38^{high}IgD⁻) représentaient à J0 un faible pourcentage des lymphocytes B totaux circulants : 0,8±0,5%, les lymphocytes B naïfs (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) : 55,7±10,9% et les lymphocytes B mémoires (CD19⁺CD27⁺IgD⁻CD38⁻) : 13,4±3,8%.

L'évolution du pourcentage des plasmablastes parmi les cellules CD19⁺ selon les conditions de culture est illustrée dans la **Figure 15**. Nous avons observé une augmentation du pourcentage de plasmablastes dès J6 après stimulation polyclonale des lymphocytes B (P1 et P2), avec un pic à 37,6% et 32,8% à J10 pour P1 et P5, et à J8 pour P2, P3 et P4 avec respectivement 16,3%, 24,8% et 13,5%. Dans les cultures contrôles, les proportions de

lymphocytes B naïfs sont restés stables, à $57\pm 7\%$, $50,6\pm 26,8\%$ et $48,9\pm 25,3$ respectivement à J0, J8 et J10. Il en est de même pour les lymphocytes B mémoires, stables à $11,1\pm 8,1\%$, $11,3\pm 9,2\%$, $14,8\pm 1,2\%$ à J0, J8 et J10 ainsi que pour le pourcentage de plasmablastes parmi la population B totale inférieur à 5% à tous les temps de culture étudiés (J3, J6, J8, J10).

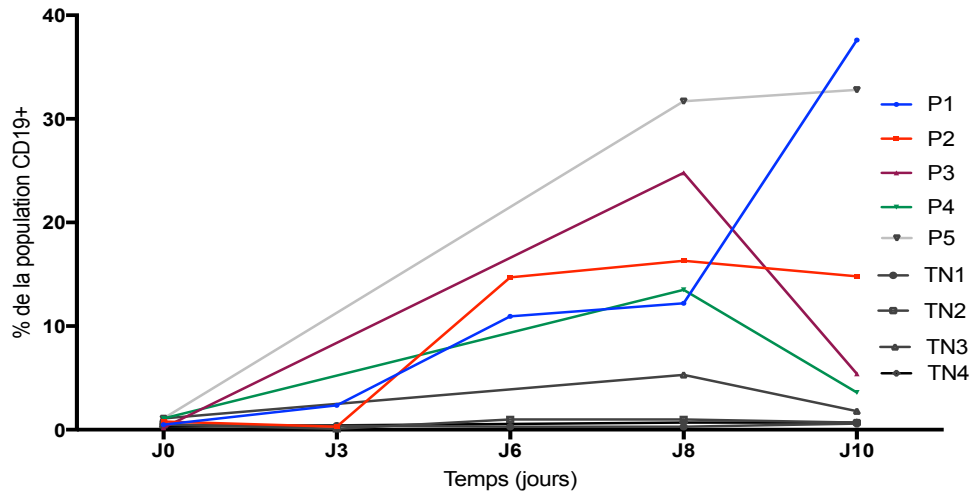


Figure 15: Suivi du pourcentage de plasmablastes ($CD19^+CD38^{high}IgD$) dans la population totale de lymphocytes B ($CD19^+$). On observe une augmentation du pourcentage de plasmablastes dès J6 après stimulation polyclonale des lymphocytes B (P1, P2) alors que les témoins non stimulés (TN1 à TN4) conservent un pourcentage de la population B totale de plasmablastes inférieur à 5% à tous les temps de culture étudiés (J3, J6, J8, J10).

La proportion de cellules vivantes, dont le marquage était réalisé grâce au FVD, était chez les donneurs stimulés de $45,2\pm 9,6\%$, $39,5\pm 7,4\%$ et $37,5\pm 10\%$ respectivement à J0, J8 et J10, vs $46,6\pm 8,5\%$, $49,9\pm 12,8\%$ et $45,2\pm 9,8\%$ chez les témoins négatifs pour les mêmes temps de culture. Les différences aux trois temps de culture entre ces deux groupes n'étaient pas significatives ($p>0,999$ à J0, $p=0,2857$ à J8 et J10).

1. Analyse des résultats de phénotypage cellulaire

Parmi la population $CD19^+$ totale, après 8 jours de stimulation polyclonale, le pourcentage de plasmablastes augmentait significativement comparé à celui des témoins ($+23,8\pm 7,3\%$ vs $+1,2\pm 2\%$; $p=0,0159$) (**Figure 16A**). La même différence a été observée après 10 jours de stimulation entre les donneurs stimulés et témoins ($+22,8\pm 7,2\%$ vs $+0,6\pm 1,7\%$, $p=0,0159$) (données non montrées). Pour les lymphocytes B naïfs, les variations de pourcentage n'étaient pas statistiquement significatives, ni à J8 ($-33,1\pm 15\%$ vs $-6,4\pm 19,2\%$; $p=0,1111$, respectivement pour les donneurs stimulés et témoins négatifs) (**Figure 16B**), ni à J10 ($-30,1\pm 17,8\%$ vs $-8,1\pm 17,8\%$; $p=0,1111$, respectivement pour les donneurs stimulés et témoins négatifs) (données non montrées). Pour les lymphocytes B mémoires, les variations de pourcentage n'étaient pas statistiquement significatives ni à J8 ($-5,7\pm 5,9\%$ vs $-3,7\pm 8,7\%$; $p=0,9048$, respectivement pour les donneurs stimulés et témoins négatifs) (**Figure 16C**), ni à

J10 ($-5,7\pm 7,9\%$ vs $-3,7\pm 8,7\%$; $p=0,9048$, respectivement pour les donneurs stimulés et témoins négatifs) (données non montrées).

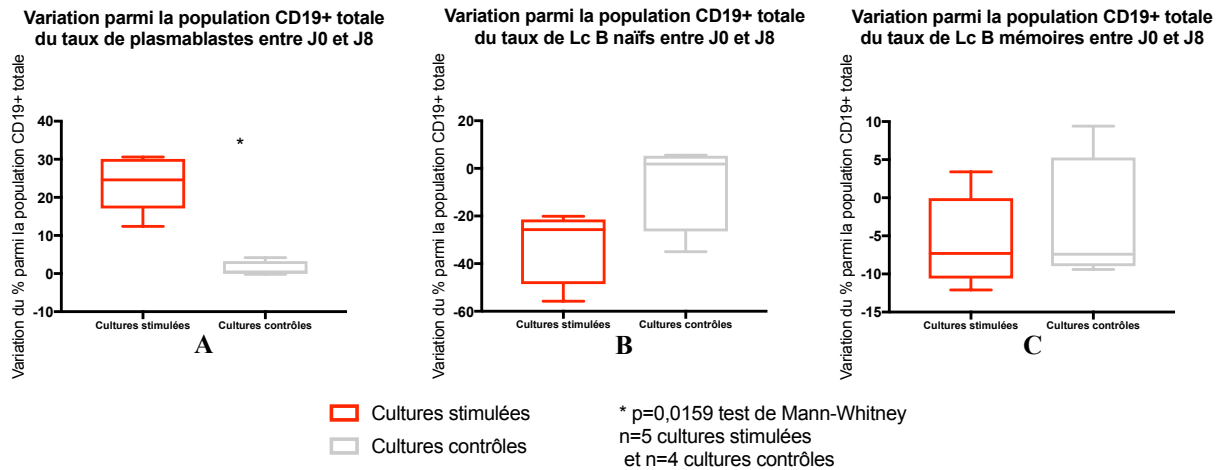


Figure 16 : Variation parmi la population CD19+ totale du pourcentage des plasmablastes ($CD19^+ CD38^{high} IgD^-$), des lymphocytes B naïfs ($CD19^+ CD27^- IgD^+$) et des lymphocytes B mémoires ($CD19^+ CD27^+ IgD^- CD38^+$) entre J0 et J8. Après 8 jours de stimulation polyclonale, le pourcentage de plasmablastes augmentait de $22,8\pm 7,2\%$, alors que chez les témoins ce pourcentage restait stable ($+22,8\pm 7,2\%$ vs $+0,6\pm 1,7\%$, $p=0,0159$) (A). Pour les lymphocytes B naïfs (B), les variations de pourcentage n'étaient pas statistiquement significatives ($-33,1\pm 15\%$ vs $-6,4\pm 19,2\%$; $p=0,1111$, respectivement pour les donneurs stimulés et témoins négatifs), de même pour les lymphocytes B mémoires (C) ($-5,7\pm 5,9\%$ vs $-3,7\pm 8,7\%$; $p=0,9048$, respectivement pour les donneurs stimulés et témoins négatifs).

2. Dosage des immunoglobulines dans les surnageants de culture

Pour mesurer la capacité de production d'anticorps par les plasmablastes dans les différentes conditions de cultures, nous avons réalisé un dosage pondéral des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM) par technique de néphélométrie réalisée en routine au laboratoire de biochimie (Dr Lakomy et Dr François, service de biochimie, CHU Dijon) dans un des surnageants de culture (P1, à J8, 22,8% de plasmablastes). Cette technique n'a pas permis de détecter d'immunoglobulines dans les surnageants (données non montrées).

II. Culture de PBMC de patients transplantés

Devant la capacité d'induction de plasmablastes réalisée sur PBMC de donneurs sains, le même protocole de stimulation polyclonale des lymphocytes B a ensuite été réalisé sur des PBMC de patients transplantés. Sept de ces patients transplantés sont connus comme ayant développé en post-transplantation des DSA anti-HLA, et la sélection de ces patients a été précisé antérieurement. Trois patients nommés « témoins » sont également des patients transplantés rénaux mais dont le suivi au long cours n'a jamais mis en évidence de DSA IgG anti-HLA *de novo*. Les PBMC de deux donneurs sains, repris de l'expérience de mise au point, ont été utilisées comme contrôle négatif (culture sans stimulation polyclonale) et contrôle positif (culture avec stimulation polyclonale).

Devant la difficulté au moment de la décongélation des PBMC d'obtenir un nombre de cellules suffisant pour la majorité des patients permettant de tester les deux conditions de durée de culture de 8 et 10 jours, les patients ont été répartis au hasard sur les deux durées de culture.

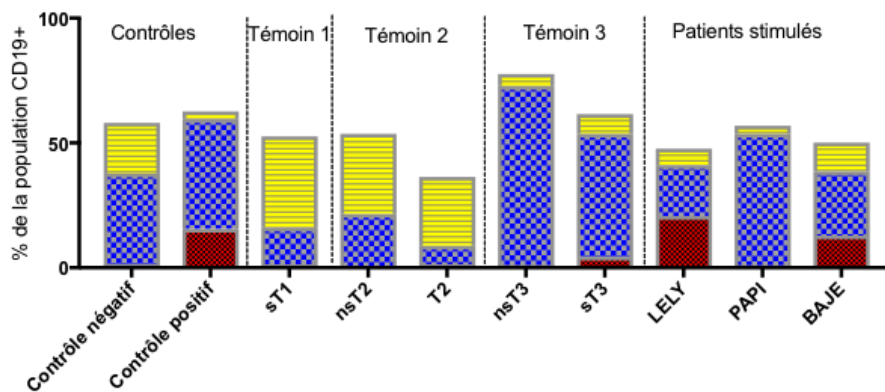
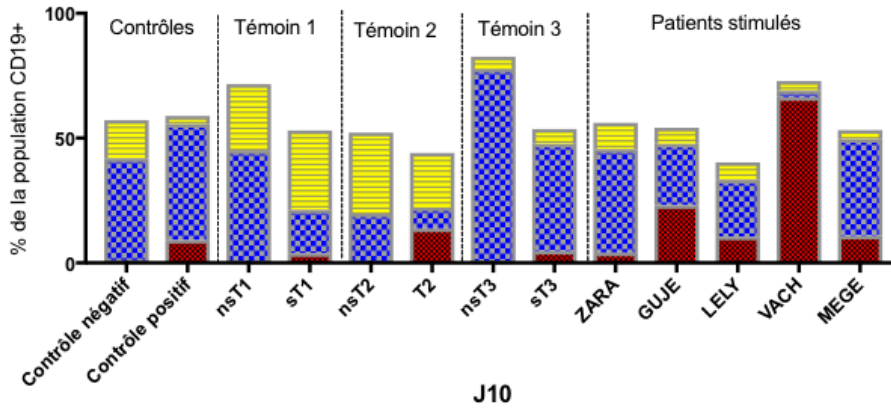
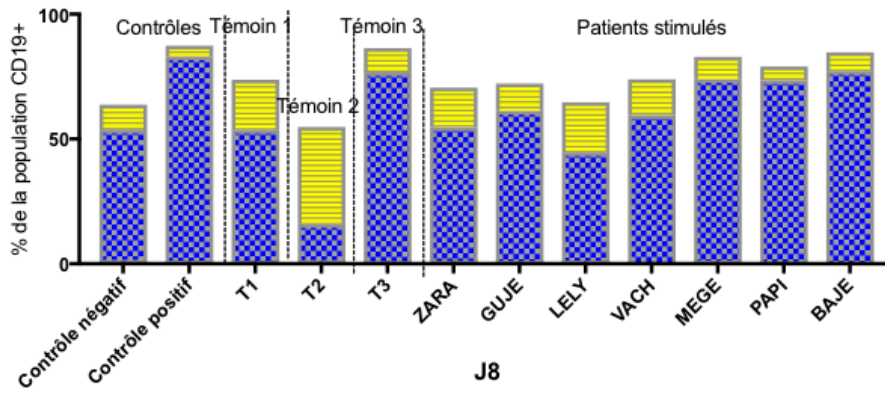
1. Résultats du phénotypage cellulaire

A J0, le pourcentage de plasmablastes chez les patients (n=7) était de $0,5 \pm 0,5\%$, de lymphocytes B mémoires de $11,9 \pm 5,1\%$, et de lymphocytes B naïfs de $62,9 \pm 12,1\%$. Pour les témoins (n=3), le pourcentage de plasmablastes était de $0,7 \pm 0,5\%$, de lymphocytes B mémoires de $22,9 \pm 14\%$ et de lymphocytes B naïfs de $48 \pm 31\%$. Il n'y avait pas de différence significative pour ces trois populations entre les témoins et les patients. Après 8 jours de stimulation polyclonale, le pourcentage de plasmablastes a augmenté de $22,3 \pm 25,6\%$ dans le groupe des patients, dans le groupe des témoins non stimulés ce pourcentage a diminué de $0,6 \pm 0,6\%$ ($p=0,0357$), et dans le groupe des témoins stimulés, le taux augmente de $6,8 \pm 5\%$ ($p=0,5714$). Pour les lymphocytes B naïfs, le pourcentage a diminué de $32,7 \pm 16,9\%$ dans le groupe patients (vs $-0,7 \pm 7\%$ et $+10,3 \pm 22,5\%$; $p=0,0357$, respectivement pour les témoins non stimulés et les témoins stimulés). Pour les lymphocytes B mémoires, la variation était de $-7,7 \pm 3,8\%$ dans le groupe patients stimulés, $-1,6 \pm 7\%$ dans le groupe témoins non stimulés et $+7,9 \pm 11,4\%$ dans le groupe témoins stimulés ($p=0,3929$, et $p=0,0714$ respectivement). A J10, la variation au sein de la population B totale (CD19+) dans les trois groupes des plasmablastes ne mettait pas en évidence de différences significatives (données non montrées). (**Figures 17 et 18**).

2. Dépistage d'anticorps anti-HLA dans les surnageants de culture

Le dépistage par technologie LUMINEX® d'anticorps anti-HLA de type IgG et IgM a été réalisé dans les surnageants de culture prélevés à J8 et/ou J10 pour toutes les cultures : PBMC de patients, PBMC de témoins stimulés et PBMC de témoins non stimulés. Les protocoles utilisés sont ceux décrit dans la partie Matériel et Méthode, les surnageants ont été centrifugé et utilisé à la place des sérums habituellement testés.

Malheureusement, pour tous les surnageants testés, aucun anticorps n'a été dépisté ni par l'anticorps secondaire anti-IgM ni par l'anticorps secondaire anti-IgG.



■ Lymphocytes B mémoires : CD19+, CD27+, IgD-, CD38-

■ Lymphocytes B naïfs : CD19+ CD27- IgD+

■ Plasmablastes : CD19+, CD38High, IgD-

Figure 17 : Proportion des populations suivies parmi la population B totale à J0 et aux différents temps de culture J8 et J10. Première colonne : contrôle négatif (culture de PBMC de donneurs sains non stimulées), 2^{ème} colonne : contrôle positif (culture de PBMC de donneurs sains stimulés), puis 3 témoins (pour J8 et J10 chaque témoin est cultivé sans et avec stimulation), puis 7 patients transplantés rénaux. On retrouve une induction de plasmablastes dans toutes les cultures stimulées.

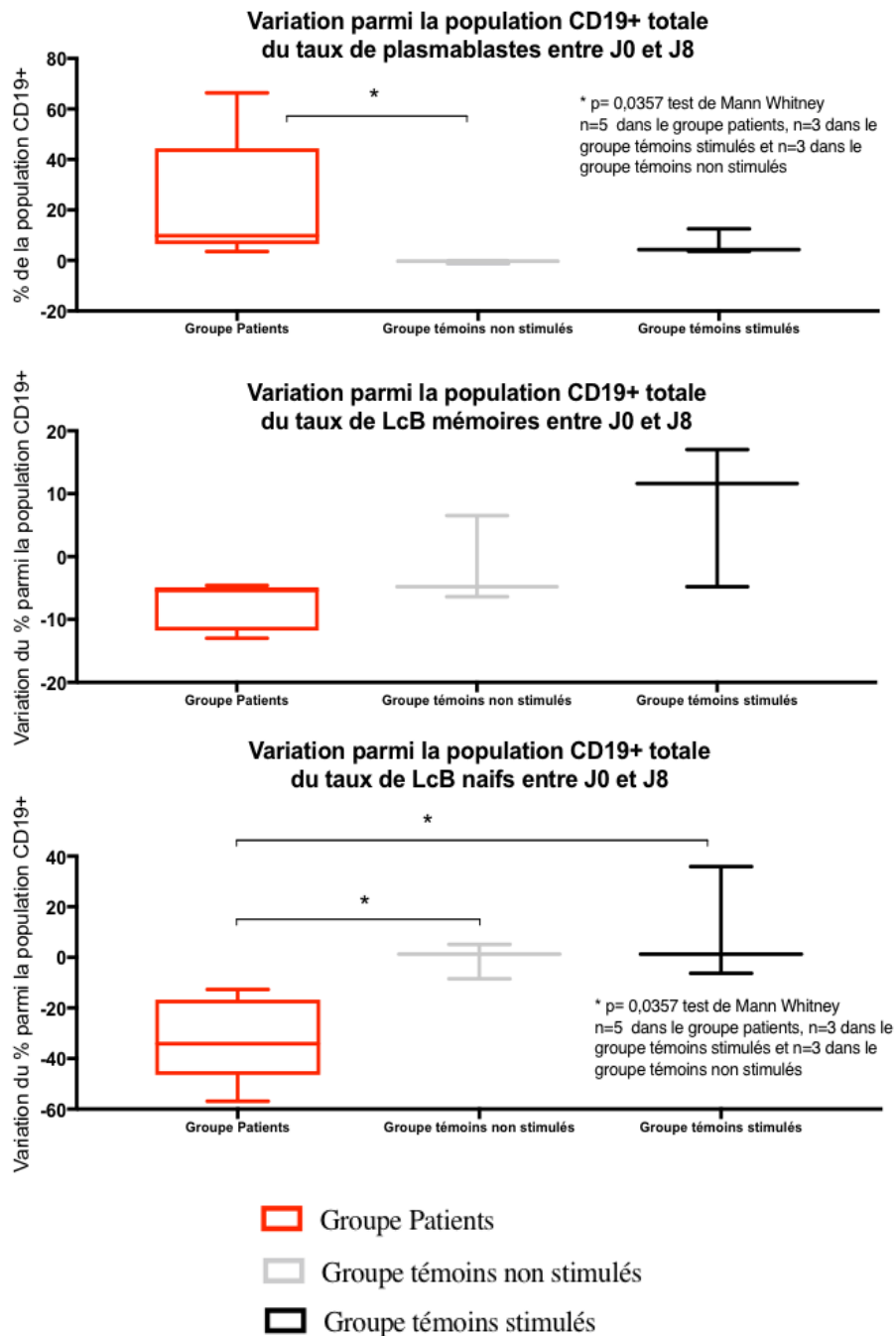


Figure 18 : Variation des pourcentages parmi la population B totale (CD19+) des populations suivies entre J0 et J8. Après 8 jours de stimulation polyclonale, le pourcentage de plasmablastes a augmenté de $22,3 \pm 25,6\%$ dans le groupe des patients et de $6,8 \pm 5\%$ ($p=0,5714$) dans le groupe des témoins stimulés mais a diminué de $0,6 \pm 0,6\%$ ($p=0,0357$) dans le groupe des témoins non stimulés. Pour les lymphocytes B naïfs, le pourcentage a diminué de $32,7 \pm 16,9\%$ dans le groupe patients (vs $-0,7 \pm 7\%$ et $+10,3 \pm 22,5\%$; $p=0,037$, respectivement pour les témoins non stimulés et les témoins stimulés). Pour les lymphocytes B mémoires, la variation était de $-7,7 \pm 3,8$ dans le groupe patients stimulés, $-1,6 \pm 7\%$ dans le groupe témoins non stimulés et $+7,9 \pm 11,4\%$ dans le groupe témoins stimulés ($p=0,3929$, et $p=0,0714$ respectivement).

DISCUSSION

Nous avons mis au point un test Luminex® de dépistage des IgM anti-HLA pour lequel l'évaluation de plusieurs conditions a déterminé celle permettant la meilleure sensibilité associée à une faible variabilité. Ce test est fiable, les 15 sérums connus comme étant IgM anti-HLA positifs en LCT testés en dépistage Luminex® IgM ont été retrouvés positifs. Le test en Luminex® a permis d'identifier la spécificité anti-HLA caractérisée en LCT sur panel pour 2 des 3 patients pour lesquels cette donnée nous était disponible. Les reproductibilités intra- et inter-expériences sont satisfaisantes, avec des coefficients de variation inférieurs à 15%.

L'enjeu majeur de la technique Luminex® en routine de transplantation, est l'identification de la spécificité anti-HLA des anticorps. Or, du fait de certains de nos résultats, l'interprétation de la spécificité des IgM anti-HLA détectées en Luminex s'avère difficile.

D'abord, on retrouve lors du test Luminex® de dépistage des 15 sérums, deux profils de positivité : soit quelques billes positives, soit un grand nombre de billes positives (33% des sérums présentaient une positivité de plus de 10 billes). L'interprétation de ces profils à large positivité est difficile, car cela signifierait la présence d'une IgM polypécifique reconnaissant de nombreux antigènes HLA. Le suivi immunologique de ces patients et notamment l'apparition ou non d'IgG anti-HLA ainsi que les antigènes ciblés par ces anticorps pourraient aider sur la compréhension de ces profils.

Ensuite, 10 sur les 15 sérums testés présentaient une positivité de la bille n°2, bille contrôle positif de la fonctionnalité de l'anticorps secondaire anti-IgG dans le test standard. L'inactivation de cette positivité par le DTT signe la présence d'une IgM reconnue par l'anticorps secondaire, probablement une IgM anti-IgG de type facteur rhumatoïde. La présence d'une telle IgM anti-IgG entraîne une difficulté supplémentaire pour l'interprétation des résultats du dépistage Luminex® IgM. Chez les patients dont la bille n°2 est négative, la détection sur d'autres billes d'IgM anti-HLA est simple d'interprétation. Pour les patients dont la bille n°2 est positive parmi d'autres, on ne peut pas directement conclure à la présence d'IgM anti-HLA car il est possible qu'il s'agisse d'anticorps anti-HLA de type IgG, eux même reconnus par une IgM anti-IgG secondairement dévoilée par l'anticorps secondaire (**Figure 19**).

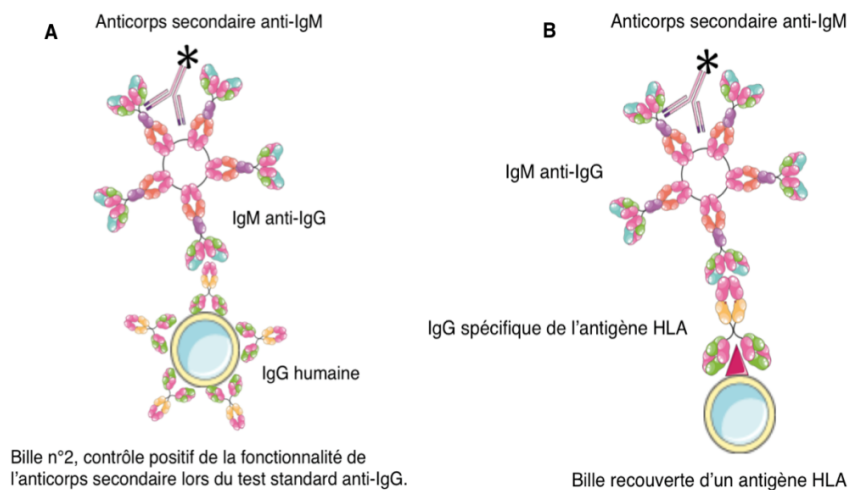


Figure 19 : Difficultés d'interprétation des tests Luminex® lors de la présence d'une bille n°2 positive du fait de la présence d'une IgM anti-IgG. A) La bille n°2 est recouverte d'IgG humaines, c'est la bille contrôle positif lors du test standard de dépistage d'IgG anti-HLA qui valide la fonctionnalité de l'anticorps secondaire anti-IgG. La positivité de cette bille pour le test de certains de nos sérums en IgM, et son inactivation par DTT témoigne d'une IgM reconnue par notre anticorps secondaire. B) La présence d'une IgM anti-IgG peut être un biais lors du dépistage en Luminex® IgM chez un patient porteur de DSA IgG anti-HLA spécifique et mimer la présence d'IgM anti-HLA.

A la lumière de cette observation, les résultats d'études antérieures observant une persistance d'IgM anti-HLA, ou une coexistence au long cours d'IgM et d'IgG anti-HLA détectés par Luminex® sont remis en cause ^{21,28}. S'agit-il vraiment d'une durabilité des IgM anti-HLA ou est-ce dû à une IgM anti-IgG reconnue par l'anticorps secondaire anti-IgM ? Sur le plan physiopathologique, la persistance prolongée d'une IgM anti-HLA dans un contexte d'allo-immunisation n'est pas compatible avec l'histoire naturelle d'une réponse immunitaire humorale. L'évolution classique de cette réponse étant le passage d'une sécrétion IgM à une sécrétion IgG par les plasmocytes après switch isotypique.

Plusieurs solutions ont été testées pour s'affranchir de cet éventuel biais lié à la présence d'une IgM anti-IgG : l'utilisation d'une endopeptidase dégradant spécifiquement les IgG, le prétraitement des sérums testés par filtration ou par dilution. Malheureusement, du fait de limitation technique (nombre de sérums restreints, quantité de certains sérums insuffisante pour effectuer tous les tests, quantité d'endopeptidase insuffisante ou dosage d'IgG dans le sérum du patient indisponible), il est difficile de tirer des conclusions de ces différentes expériences.

L'endopeptidase semble efficace pour éliminer les IgG d'un sérum. Mais nous n'avons pas parmi ceux testés identifié de sérum pour lequel le traitement par endopeptidase a modifié la positivité d'une bille HLA éventuellement causée par une IgG anti-HLA reconnue par une IgM anti-IgG.

L'utilisation du filtre a montré différents résultats selon les sérums testés. Pour certains sérums, seul le signal de la bille n°2 était modifié, avec une diminution allant de 25 à 400%. Parfois avec une diminution du signal des autres billes, positives ou non, dans un ordre de grandeur proche ou non avec celui de la bille n°2. D'autres sérums voyaient les MFI des billes 3 à 25 modifiées sans modification de la MFI de la bille n°2. Ces résultats restent donc très difficilement interprétables. Mais le faible nombre de sérums testés avec le filtre (n = 4) est très probablement responsable de cette difficulté d'interprétation. Une autre interprétation est que tous les sérums n'étaient pas équivalents sur la composition : présence ou non d'IgG anti-HLA et d'IgM anti-IgG et donc n'ont pas été modifiés de la même façon par l'utilisation de ce filtre. Sur le plan technique, les quantités de sérums disponibles étant souvent très faibles, l'utilisation du filtre n'était pas toujours optimale sur les volumes de sérum utilisables.

Il en est de même pour l'interprétation des différentes expériences effectuées pour les dilutions.

Pour avancer sur ces différentes méthodes, le test d'une grande quantité de sérums est nécessaire. Ces sérums devront être disponibles en quantité suffisante pour permettre l'utilisation optimale des différentes méthodes, ainsi que caractérisés précisément notamment sur le taux d'IgG contenu dans ces sérums.

Une démonstration inverse a également été essayée : induire un dépistage Luminex® IgM positif en ajoutant à un sérum connu positif en dépistage Luminex® IgG un sérum facteur rhumatoïde positif. Ces expériences restent également difficiles d'interprétation.

Dans 50% des cas, l'ajout d'un facteur rhumatoïde à un sérum positif en IgG anti-HLA permettait d'obtenir en dépistage IgM Luminex® les MFI les plus élevées pour les mêmes billes que le dépistage IgG Luminex® alors que le dépistage en IgM du sérum seul était négatif.

Cependant, le sérum FR+ utilisé était celui d'un unique patient. Le patient à l'origine de ce prélèvement a bénéficié dans son histoire médicale de trois tests de dépistage du FR, dont un s'est révélé négatif. Renouveler les différents tests réalisés (mélange sérum IgG+ et sérum FR+) avec des sérums plus fortement positifs en FR pourraient permettre d'infirmier ou de confirmer cette théorie. De plus, utiliser un sérum plus fortement positif en FR permettrait si l'hypothèse se vérifie d'atteindre en dépistage IgM Luminex® des MFI plus hautes permettant une interprétation plus sûre. Dans nos expériences le seuil arbitraire de 500 était très rarement atteint.

Dans les situations où l'ajout de facteur rhumatoïde entraîne la positivité d'autres billes que celles retrouvées positives en dépistage IgG Luminex®, on peut également questionner une

variabilité interindividuelle sur les antigènes HLA reconnus par ce facteur rhumatoïde. Dans nos expériences, les billes n°4, 13 et 17 étaient positivées dans 50 à 100% des cas par le mélange du sérum IgG+ avec le sérum FR+ (ces trois billes étant porteuses d'antigènes HLA appartenant au groupe Bw6). Tous les FR ne sont pas équivalents sur les antigènes reconnus. L'utilisation d'un autre sérum FR+ pourrait éventuellement avoir des conséquences différentes sur les billes positives.

Sur un plan plus clinique, on peut penser qu'un patient possédant des IgG anti-HLA ainsi qu'un FR est à risque de présenter plus de lésions de rejet humoral par la fixation additionnelle des IgM anti-IgG à même de déclencher une réponse lésionnelle. Ou à l'inverse, un FR peut-il protéger contre une activation du complément par des IgG anti-HLA ?

Un travail récent de S. See et coll.²⁹ en 2018 retrouve que les patients porteurs d'anticorps naturels de type IgG ainsi que de DSA IgG présentaient la survie de greffon rénal la plus altérée (66,8% de survie à 7 ans), significativement différente du groupe ne possédant aucun des deux types d'anticorps (91,1% à 7 ans) ou un seul des deux types. Ceci suggérant un possible effet potentialisateur de deux types d'anticorps dans leur contribution à la perte du greffon. Il faut cependant modérer ces résultats en précisant que le groupe de patients ayant des anticorps naturels IgG et des DSA IgG comportait plus de deuxième greffe, de donneurs à critères élargis que le groupe contrôle³⁰. Dans cette étude, il s'agissait d'IgG naturels de type IgG et non pas de facteur rhumatoïde plus fréquemment de type IgM.

Notre test de dépistage des IgM anti-HLA semble fonctionnel pour les antigènes HLA de classe I au vu des sérums retrouvés positifs en Luminex® et les corrélations avec les données antérieures de LCT. Pour la classe II, nous ne disposons pas d'autres techniques permettant une validation des résultats obtenus en Luminex®, notamment par des sérums positifs en IgM classe II en LCT. Si un sérum était dépisté positif en Luminex® IgM en classe II (bille n°25, 33, 35, 50, 65), il faudrait le tester en LCT sur un panel, après absorption sur plaquettes afin d'éliminer les anticorps classe I pouvant positiver la LCT. Et, cette validation en LCT n'aiderait qu'en cas de positivité, puisque du fait de la différence de sensibilité, un résultat positif observé au Luminex® n'est pas toujours retrouvé en LCT.

La limite de cette technique Luminex® reste principalement la difficulté d'établir un seuil de significativité. Dans le cadre de nos objectifs, la mise au point des seuils de positivité est nécessaire. Les tests de nombreux sérums issus de donneurs de sexe masculin, sans antécédent d'événements immunisant notamment, permettront de déterminer un bruit de fond moyen utilisable comme référence, et ainsi déterminer les seuils de positivité pour chaque bille.

La mise au point d'un test d'identification par Single Antigen est également à réaliser par la même démarche. A condition, de s'affranchir simplement du « facteur rhumatoïde » observé dans nos expériences, afin de pouvoir proposer un test de routine réalisable en pratique.

L'élaboration de la stimulation polyclonale des lymphocytes B permet d'étudier le versant cellulaire de la réponse humorale. Chez un patient possédant des IgM anti-HLA circulantes, la détection d'IgG dans le surnageant de culture témoignera d'un switch isotypique déjà survenu. Il s'agit de disposer d'outils de compréhension de la cinétique d'immunisation en transplantation rénale pour éventuellement ajuster les thérapeutiques ciblées sur les cellules responsables et également préciser le timing de ces thérapeutiques.

Le protocole de l'article de Snanoudj et coll.²⁴, inspiré de l'article de Crotty et coll.²⁵, qui a été utilisé pour ce projet, permettait de mettre en évidence dans une cohorte de patients insuffisants rénaux chroniques en hémodialyse en attente de transplantation des niveaux d'immunisation différents corrélés aux évènements immunisants rencontrés par les individus de la population. L'étude des anticorps présents dans les surnageants identifiait l'immunisation contre des antigènes non reconnus par les anticorps présents dans le sérum, où alors contre les mêmes antigènes mais avec une hiérarchie de force d'immunisation, évaluée par la MFI, différente entre les anticorps présents dans les surnageants et ceux présents dans le sérum prélevés le même jour que les PBMC utilisées pour la culture et la stimulation polyclonale. Une technique ELISPOT permettait également le suivi des mBC alloréactifs spécifiques d'antigènes HLA. Ces mBC ne sont détectées que chez les patients avec des antécédents immunisants. Ce travail a été choisi comme modèle, du fait de sa capacité à révéler le versant cellulaire de l'immunité humorale anti-HLA porté par les mBC, et sous-estimé par l'évaluation seule du sérum.

On retrouve des résultats similaires à ceux présentés dans l'article de Snanoudj et coll. avec une induction de plasmablastes lors de la culture de PBMC et stimulation polyclonale de donneurs sains mais également de patients transplantés. Malheureusement, le nombre limité de cellules de patients disponibles dans notre cohorte n'a pas permis d'étudier comme souhaiter les deux temps de culture J8 et J10. L'analyse du contenu du surnageant sera plus précise sur le temps de culture à sélectionner, en effet, la finalité est le dépistage des anticorps anti-HLA dans le surnageant, ce qui n'est peut-être pas exactement corrélé au pourcentage de plasmablastes.

La tentative de détection des immunoglobulines dans un des surnageants de culture de donneurs sains (P1, surnageant d'une culture stoppée à J8, plasmablastes à 22,8% des lymphocytes B totaux) par néphélométrie n'a pas permis de détection, probablement du fait d'un manque de sensibilité de technique. L'analyse par Luminex® des surnageants de culture

des PBMC de patients n'a de la même manière pas permis de détecter d'anticorps anti-HLA que ce soit des IgG ou des IgM. Ce résultat est dû, soit à un manque de sensibilité de la technique de mesure pour le dosage dans le surnageant cellulaire, soit à une absence d'immunoglobulines dans le surnageant et donc un échec de notre expérience. Mais a priori, du fait de l'exercice comparable et des résultats similaires sur le pourcentage de plasmablastes obtenus après stimulation, ce protocole de stimulation devrait nous permettre de détecter des anticorps dans le surnageant.

Les deux explications principales retenues nous sont données par la comparaison avec le protocole réalisé dans l'article de Snanoudj. Tout d'abord le nombre de cellules stimulées paraît insuffisant, pour la majorité des patients testés nous n'avions que 5 millions de PBMC disponibles après décongélation. Enfin, une étape de concentration des surnageants par ultracentrifugation via un filtre était réalisée, ce que nous n'avons pas reproduit lors du test de nos surnageants de culture.

L'étude des différentes populations de lymphocytes B a nécessité initialement l'identification des marqueurs considérés comme spécifiques. L'expression du CD19, utilisé classiquement comme marqueur des lymphocytes B circulants^{26,31}, est également décrit comme perdu au stade terminal de différenciation des plasmocytes³². Une des améliorations de notre phénotypage serait de rajouter certains marqueurs. Le CD20, généralement co-exprimé avec le CD19, serait un autre marqueur des plasmablastes. Ce CD20 est également perdu au stade terminal de différenciation du plasmablaste en plasmocyte, et l'association CD20-CD27-CD138 pourrait être utilisée pour dissocier les plasmocytes et les plasmablastes. Ceci pourrait expliquer la diminution des plasmablastes dans nos expériences entre J8 et J10 par l'acquisition d'un phénotype terminal non détecté par l'association des marqueurs de surface réalisée.

PERSPECTIVES

Le dépistage en LCT d'une IgM cytotoxique est banal en routine du fait de la fréquence d'anticorps polyspécifique. Le manque de spécificité des IgM et donc la difficulté d'identifier l'antigène ciblé rend leur interprétation difficile. En transplantation rénale, les études disponibles sur les IgM anti-HLA retrouvent des résultats surprenants notamment la persistance d'IgM au long cours, la coexistence d'IgM et d'IgG dirigées contre le même antigène.

Comme attendu, la mise au point d'un test Luminex® de dépistage des IgM n'est pas qu'un simple transfert de la technique utilisée pour les IgG, avec probablement de nombreuses interférences secondaires à ce manque de spécificité ainsi qu'à l'existence d'IgM circulantes de type facteur rhumatoïde chez certains patients. Certaines solutions simples d'utilisation en routine semblent utilisables sur le plan technique, notamment l'utilisation d'enzyme dégradant spécifiquement les IgG. Mais ces méthodes doivent encore être validées sur un nombre plus important de sérums de patients. Une limite également économique est à prendre en compte considérant la quantité d'enzyme nécessaire pour le traitement des sérums.

Par la suite, la recherche systématique d'IgM anti-HLA sur les sérums d'une cohorte de patients transplantés précisera le délai d'apparition de ces IgM, les facteurs favorisants, l'existence de lésions histologiques associées, le suivi sérologique et notamment la réalisation d'un switch IgG. Le développement d'un prétraitement standardisé éliminant les IgG des sérums permettra de simplifier l'interprétation des sérums positivant la bille contrôle positive en dépistage Luminex® IgM. La comparaison des immunoglobulines circulantes à celles obtenues par la stimulation de lymphocytes B, renseignera peut-être sur une fenêtre de temps permettant l'usage de thérapeutiques stoppant le processus d'immunisation. Ceci nécessite le développement d'un phénotypage plus précis utilisant des marqueurs supplémentaires ainsi que le développement d'une méthode de concentration des anticorps dans les surnageants de culture permettant une meilleure détection.

CONCLUSIONS

En transplantation rénale, l'immunisation humorale dirigée contre le donneur n'est analysée que par l'étude des IgG anti-HLA. Devant l'impact majeur des DSA IgG sur la survie de la transplantation rénale et le manque actuel d'efficacité des traitements pour prévenir les lésions liées à ces anticorps, la prévention de l'apparition de ces DSA est une priorité dans la prise en charge des patients transplantés. Les patients DSA IgM⁺ et DSA IgG⁻ n'ont théoriquement pas développé de plasmocytes à longue durée de vie, ni de lymphocyte B mémoires. Cette fenêtre de temps avant le switch lymphocytaire paraît optimale pour l'utilisation de thérapeutiques dirigées contre les lymphocytes B susceptibles de stopper le processus d'immunisation avant le stade de production d'IgG anti-HLA

Nous avons mis au point un test de détection des IgM fiable reproductible sur des échantillons connus. En revanche son utilisation en clinique apparaît complexe car dans un nombre important de sérum nous détectons une activité IgM anti-IgG qui interfère probablement avec le test et qui semble complexe à éliminer en routine.

Pour essayer de caractériser les lymphocytes B de patients immunisés, nous avons stimulé les lymphocytes B circulants de patients immunisés et non immunisés puis analysé le phénotype des cellules obtenues et recherché des anticorps anti-HLA dans le surnageant. Nous avons montré que la stimulation polyclonale induisait plus de plasmablastes chez les patients immunisés. En revanche la technique utilisée s'est avérée insuffisamment sensible pour détecter des anticorps dans le surnageant.

Dans un objectif d'amélioration de survie des greffons rénaux, l'idéal serait de permettre de détecter très précocement, en amont de la détection sérique d'IgG anti-donneur, une réponse B allogénique.

Le Président du jury,

Pr. JM Rebiou



Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 6 MARS 2019
Le Doyen

Pr. M. MAYNADIÉ



BIBLIOGRAPHIE

1. Tait BD. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients – Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front. Immunol.* 2016;7:.
2. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 2012;12(2):388–399.
3. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat. Rev. Nephrol.* 2012;8(6):348.
4. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 2003;349(24):2326–2333.
5. Loupy A, Haas M, Solez K, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am. J. Transplant.* 2017;17(1):28–41.
6. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation.* 2013;95(3):410–417.
7. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 2009;9(11):2532–2541.
8. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Rates and determinants of progression to graft failure in kidney allograft recipients with de novo donor-specific antibody. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 2015;15(11):2921–2930.
9. Macklin PS, Morris PJ, Knight SR. A systematic review of the use of rituximab for the treatment of antibody-mediated renal transplant rejection. *Transplant. Rev. Orlando Fla.* 2017;31(2):87–95.
10. Galián JA, Mrowiec A, Muro M. Molecular targets on B-cells to prevent and treat antibody-mediated rejection in organ transplantation. Present and Future. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2016;20(7):859–867.
11. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science.* 1996;272(5258):54–60.
12. Thaunat O, Koenig A, Leibler C, Grimbert P. Effect of Immunosuppressive Drugs on Humoral Allosensitization after Kidney Transplant. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016;27(7):1890–1900.
13. Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science.* 2011;331(6021):1203–1207.
14. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 2009;10(12):1292–1299.
15. Luque S, Lúcia M, Bestard O. Refinement of humoral immune monitoring in kidney transplantation: the role of “hidden” alloreactive memory B cells. *Transpl. Int.* 2017;30(10):955–968.
16. Han M, Rogers JA, Lavingia B, Stastny P. Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro. *Hum. Immunol.* 2009;70(1):29–34.
17. Lucia M. Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int.* 2015;88(4):874–887.
18. Purtha WE, Tedder TF, Johnson S, Bhattacharya D, Diamond MS. Memory B cells, but not long-lived plasma cells, possess antigen specificities for viral escape mutants. *J. Exp. Med.* 2011;208(13):2599–2606.
19. Kamburova EG, Koenen HJPM, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I. In vitro effects of

- rituximab on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 2012;12(2):341–350.
20. Stastny P, Ring S, Lu C, et al. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Hum. Immunol.* 2009;70(8):600–604.
 21. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. *Transplantation.* 2014;97(5):494–501.
 22. Masson E, Vidal C, Deschamps M, et al. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum. Immunol.* 2013;74(8):946–951.
 23. Visentin J. Propriétés des anticorps anti-HLA en transplantation d’organes. 2016;
 24. Snanoudj R, Claas FHJ, Heidt S, et al. Restricted specificity of peripheral alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant. *Kidney Int.* 2015;87(6):1230–1240.
 25. Crotty S. Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J. Immunol. Methods.* 2004;286(1–2):111–122.
 26. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1–Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjögren’s Syndrome. *J. Immunol.* 2001;167(7):3610–3618.
 27. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat. Rev. Immunol.* 2012;12(3):191–200.
 28. Bamoulid J, Roodenburg A, Staeck O, et al. IgM Donor Specific Antibodies Are Frequently Associated with C1q-binding DnDSA in Renal Transplant Recipients. *ATC Abstr.* 2016;
 29. See SB, Aubert O, Loupy A, et al. Post-Transplant Natural Antibodies Associate with Kidney Allograft Injury and Reduced Long-Term Survival. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018;ASN.2017111157.
 30. Del Bello A, Kamar N. Do natural antibodies have a detrimental effect after kidney transplantation? *Ann. Transl. Med.* 2018;6(16):.
 31. Clavarino G, Delouche N, Vettier C, et al. Novel Strategy for Phenotypic Characterization of Human B Lymphocytes from Precursors to Effector Cells by Flow Cytometry. *PLOS ONE.* 2016;11(9):e0162209.
 32. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp. Hematol. Oncol.* 2012;1:36.

TITRE DE LA THESE : IgM anti-HLA : Sérologie et synthèse lymphocytaire en transplantation rénale.

Auteur : Charline Baudoin

Résumé :

Introduction : En transplantation rénale, bien qu'elle soit une des principales causes de rejet aigu et surtout de rejet chronique, la réponse tumorale n'est analysée que par l'étude des IgG anti-HLA. Les IgM anti-HLA bien que plus précoces, mais probablement plus difficiles à rechercher, ne sont que peu ou pas étudiées. En raison du faible nombre de lymphocytes B circulants, l'étude des cellules sécrétant les anticorps n'est que balbutiante.

Méthode : En utilisant des sérums connus historiquement positifs en IgM par technique de lymphocytotoxicité, nous avons modifié la technique de dépistage d'IgG anti-HLA par technique Luminex®, et testé différentes conditions expérimentales. Parallèlement, nous avons mis au point une étude du phénotype des lymphocytes B des patients immunisés après stimulation polyclonale des lymphocytes B circulants.

Résultats : Notre test de dépistage d'IgM anti-HLA par technique Luminex® est fiable et reproductible, avec des coefficients de variation intra et inter expérience inférieurs à 15%. La présence d'une IgM anti-IgG peut chez certains patients rendre difficile l'interprétation de ce dépistage d'IgM anti-HLA. Huit jours de stimulation polyclonale de lymphocytes B de patients transplantés induisent une augmentation significative du pourcentage de plasmablastes ($22,3 \pm 25,6\%$ vs $0,6 \pm 0,6\%$ dans le groupe témoins non stimulés constitué de patients transplantés sans IgG anti-HLA ; $p=0,0357$). L'identification par technique Luminex® Single Antigen des anticorps (IgG et/ou IgM) présents dans les surnageants de ces cultures doit encore être comparée aux spécificités connus des anticorps présents dans le sérum des patients.

Conclusion : La mise au point d'un nouveau test de dépistage des IgM anti-HLA par technique Luminex® reste à améliorer, notamment chez les patients porteurs d'une IgM anti-IgG. La réalisation concomitante d'un test cellulaire de stimulation des lymphocytes B circulants pourrait fournir des données complémentaires sur la cinétique et l'ampleur de l'immunisation des patients.

Mots-clés : Transplantation rénale, Immunité humorale, Anticorps anti-HLA, IgM, Lymphocyte B.