

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA-1-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master II

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème

Etude des histocompatibilités des gènes HLA dans le rejet de greffe

Présentée par :

M^{elle} Aicha Hamouda

Devant le jury composé de :

Mme Benchabane.

Mme Zerouti.

Mr Charglaine K.

Mme HAMZI W.

MCB USDB1

MAA USDB1

Docteur USDB1

MCB USDB1

Présidente

Examinatrice

Promoteur

Co-promotrice

Année Universitaire : 2020-2021

Remerciements

El hamdoulillah de m'avoir accordé la force et de m'avoir guidé tout au long de la réalisation de ce travail, j'espère que ce travail sera une cause pour avoir votre satisfaction.

*Aux personnes les plus chères au monde, à mes très chers parents **Mibarki Habiba** et **Hamouda Redouane***

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma profonde gratitude pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

Que ce travail soit le fruit de vos prières et sacrifices, et qu'Allah tout puissant vous accorde le paradis et vous procure santé, bonheur et longue vie.

*A mes frères **Hicham** et **Rayane, Mohamed***

Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence, votre amour pour donner du sens à notre vie de famille.

*A mes amies **Maalem Soulef** et **Oussrir Akida,***

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs sur qui je peux compter.

*A mes grands-parents **Kathir** et **Mira, Moustapha** et **Aicha***

*A ma tante **Fatima Zohra** et mes oncles*

Pour tout l'amour que tu m'apportes, pour ton soutien indéfectible depuis mon enfance, pour tout ce que nous avons construit et pour tout ce que nous construirons.

Parce que je t'aime

Je vous dis Merci

À mes professeurs et mes maîtres de stage ;

À tous celles et ceux qui m'ont permis de m'ouvrir sur le monde biologie

*Nous remercions également notre enseignante **Mme Zerouti,** pour l'intérêt qu'elle est bien voulue manifester en acceptant de participer à ce jury en tant qu'examinatrice.*

***Au Docteur Hamzi Wahiba** , pour ton expertise, ton efficacité et ton implication dans ce travail, pour ton encadrement au cours de mon master 2*

***Dr: Chergeulaine Khaled** Pour avoir accepté d'être promoteur de ma mémoire, pour ton encadrement et ton implication dans ce travail*

*A mes adorables amies **Samia Ibtissam Khawter** **Rania Fatma** et **Naouale,***

Je vous remercie pour votre amitié et pour tous les moments inoubliables qu'on a passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

REMERCIEMENTS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES GRAPHS	
LISTE DES ABRIVATIONS	
GLOSSAIRE	
RESUME	
<u>PARTIE B I BIOGRAPHIQUE</u>	

I. Introduction.....	1
-----------------------------	----------

CHAPITRE 1 :
Système HLA

I. Découverte du CMH.....	4
II. Définition et structure.....	5
III. Cartographie.....	6
1. Structure des gènes classe I.....	7
2. Expression des molécules de classe I	8
2.1. Structure des gènes classe II	11
2.2. Expression des molécules de classe II.....	13
3. Nomenclature HLA	
IV. Caractéristiques du système HLA	16
1. Polymorphisme :.....	16
V. Immunisation anti-HLA.....	17
1. La grossesse	17
2. La transfusion.....	17
3. La transplantation d'organes.....	17
VI. Physiopathologie.....	18
1.1.Mécanisme d'allo-réactivité indirecte.....	19
1.2.Mécanisme d'allo-réactivité directe.....	19
1.3.Mécanisme d'allo-réactivité semi-directe.....	19

CHAPITRE 2 :

Rejet des greffes Physiopathologie du rejet humoral

I. Les principaux acteurs intervenant dans le rejet de greffe.....	22
1. Immunité innée.....	22
2. Immunité adaptative.....	23
2.1.Reconnaissance allogénique.....	24
2.2.Activation des lymphocytes T CD4+.....	25
2.3.Infiltration du greffon par les cellules activées.....	25
2.4.Agression du parenchyme.....	25
II. Pathogénicité des anticorps anti-HLA	26
III. Anticorps anti-HLA après transplantation rénale.....	28
1. Rejet aigu.....	28
1.1. Le rejet médié par des lymphocytes T.....	29
1.2. Le rejet médié par anticorps.....	30
2. Rejet chronique.....	32

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I :

MATERIEL ET METHODES

I-Objectif	34
II-Description de l'étude	34
III-Matériel et méthodes	34
1-Matériel	35
1-1-Matériels biologiques.....	35
1-2-Matériel non biologiques.....	35
1-2-1-Autres matériel et verreries utilisés au laboratoire.....	35
1-2-2-Matériel informatiques	35
2-Méthodes.	36
2-1-Recueil des données	36
2-2-Prélèvement.....	36
2-3-Techniques de séparation des lymphocytes.....	36
2-4-Etude de polymorphisme HLA.....	37
2-4-1-Technique sérologique	37
2-4-2-Technique de biologie moléculaire	39
2-5-Extraction d'ADN à partir du sang périphérique.....	42
2-6-Techniques de recherche des anticorps anti-HLA de classe I et II.....	43
2-6-1-Technique immunoenzymatique ELISA.....	43
2-6-2Technique de Cross match par Lymphocytotoxicité.....	44

CHAPITRE II :

RESULTATS

I. Caractéristiques démographiques de la population algérienne étudiée	46
II. Caractéristiques biologiques de la population algérienne étudiée.....	47
III. Etude du polymorphisme HLA chez la population algérienne étudiée.....	55
DISCUSSION.....	63
CONCLUSION.....	68
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1: structure des molécules de CMH de classe I et II	6
Figure 2: Carte physique de la région chromosomique(HLA).....	7
Figure 3 : Représentation schématique des gènes de classe Ia du CMH, des ARNm transcrits et des protéines obtenues.....	8
Figure 4 : Schéma d'apprêtement des protéines endogènes par les molécules HLA de classe I et présentation croisée de protéines exogènes.....	11
Figure 5 : Représentation schématique des gènes de classe II du CMH, de l'ARNm transcrit et des protéines obtenues.....	12
Figure 6 : Schéma d'apprêtement des protéines exogènes par une molécule HLA de classe II.....	14
Figure 7 : Nomenclature des allèles HLA.....	15
Figure 8 : Répartition du nombre d'allèles nommés depuis 1987 jusqu'au mars 2019.....	16
Figure 9 : Transmission parental des haplotypes HLA.....	16
Figure 10: Trois modes de présentation	18
Figure 11: L'ischémie et la répercussion du rein génèrent des dérivés de l'oxygène.....	22
Figure 12: Les lésions engendrées lors de l'ischémie et de la réperfusion du rein initient les mécanismes de l'immunité innée.....	23
Figure 13 : Physiopathologie des rejets de greffe « adaptatifs » et du rejet « inné » induit par le missing self, dans le cas d'une transplantation rénale.....	26
Figure 14 : Mécanismes d'agression du greffon par les anticorps anti-HLA.....	28
Figure 15 : Rejet humoral aigu rénal.....	29
Figure 16 : Rejet aigu cellulaire.....	30
Figure 17 : Rejet aigu médié par anticorps.....	32
Figure 18 : schéma adapté des mécanismes lésionnels de rejet médié par les AC.....	32
Figure 19 : le résultat de séparation par technique de Ficoll.....	36
Figure 20 : Principe d'une réaction positive en microlymphocytotoxicité.....	38
Figure 21 : Principe d'une réaction négative en microlymphocytotoxicité.....	38
Figure 23: Les principales étapes de la réaction de PCR.....	40
Figure 24 : Etapes d'électrophorèse sur gel d'agarose.....	41
Figure 25 : Lecture du gel d'agarose.....	42
Figure 26 : Interprétation des résultats d'ELISA par le logiciel HLA fusion.....	44
Figure 27: Différentes techniques de détection des anticorps anti-HLA.....	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre d'allèles pour les gènes (LA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 décrits en Juin 2017.....	14
Tableau 2 : Répartition du nombre des gènes d'allèles, des protéines nommées depuis 1987 jusqu'au mars 2019.....	26
Tableau 3 : Score selon l'échelle standard ASHI.....	39
Tableau 4 : Répartition de 359 patients selon les résultats de la recherche des allo AC anti HLA de classe 1.....	48
Tableau 5 : Répartition de 359 patients selon les résultats de la recherche des allo AC anti HLA de classe 2.....	48
Tableau 6 : Comparaison les résultats de la recherche des allo AC anti HLA de classe 1 et classe 2.....	48
Tableau 7 : Comparaison les résultats de cross match de donneur 1et 2 selon les AC anti HLA de classe 1et 2.....	49
Tableau 8 : Répartition des patients selon le nombre de greffe par années.....	51
Tableau 9 : Répartition de 460 sujets typés par année.....	52
Tableau 10 : Fréquences des allèles HLA-C chez 172 sujets.....	54
Tableau 11 : Fréquences des allèles HLA-DR chez 408 sujets.....	55
Tableau 12 : Fréquences des allèles HLA-DQ chez 408 sujets.....	55
Tableau 13 : Fréquences des haplotypes A/B retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.....	57
Tableau 14 : Fréquences des haplotypes B/C retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.....	59
Tableau 15 : Fréquences des haplotypes DR/DQ retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.....	60
Tableau 16 : Fréquences des haplotypes A/B/DR retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.....	61
Tableau 17 : Fréquences des haplotypes A/B/DR/DQ retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.....	61
Tableau 18 : Fréquences des haplotypes B/C/DR retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.....	62

LISTE DES GRAPHE:

Graphe 01: Répartition de 359 patients dans le cadre de la transplantation rénale selon le service demandeur	46
Graphe 02 : Répartition des sujets selon le sexe.....	47
Graphe 03: Répartition des sujets selon l'âge.....	47
Graphe 04: Comparaison les résultats de la recherche des allo AC anti HLA(+) de classe 1 et classe 2.....	49
Graphe 05: Répartition des allo AC anti HLA des sujet selon AC anti HLA(+)	49
Graphe 06: Répartition de la population étudiée selon le typage HLA de donneur1.....	50
Graphe 7 : Répartition des 28 sujets selon le typage HLA de donneur2.....	50
Graphe 8: Comparaison cross match positif et négatif selon type HLA.....	51
Graphe9: Répartition des patients pour chaque années selon les résultats du cross match(-) D1 et l'année de greffe, AC anti HLA.....	52
Graphe 10 : Répartition de la population étudiée selon la classe HLA typée.....	52
Graphe11: Répartition de la population étudiée selon le locus HLA typée.....	53
Graphe 12 : Fréquences des allèles HLA-A chez 460 sujets.....	53
Graphe13: Fréquences des allèles HLA-B chez 459 sujets.....	54

Liste Des Abréviations

AE: Elution buffer.

AO/BE: Acridine orange/ Bromure d'éthidium

ASHI: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.

AW: Wash buffer

BET (TBE) : Tampon Tri borate EDTA

CAC: Centre anti-cancéreux

CDC : Microlymphocytotoxicité Complément Dépendante.

CHU : Centre Hospitalo-universitaire.

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène.

CXM: Cross match.

CXM D1: Cross match donneur 1.

CXM D2: Cross match donneur 2.

dNTP: Désoxynucléotides triphosphates.

DSA : Donor Specific Antibodies

TNF: le Tumor Necrosis Factor

IMGT: The international ImMunoGeneTics information system

SBT: Sequencing Based Typing

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCR-SSP: Single Specific Primer

PCR-SSO: Sequence Specific Oligonucleotide probes

NGS: New Generation Sequencing

OLS: les organes lymphoïdes secondaires

KIR: Killer cell Ig-like Receptor

NK: Natural Killer

IMGT: Im Muno Gene Tics

BCR: B Cell Receptor

DSA: Donor Specific Antibody

ADCC: Antibody dependent cellular cytotoxicity

MAC: complexe d'attaque membranaire

CF: cytométrie de flux

MAP: la protéine cofacteur de membrane

DAF: le facteur d'accélération de dissociation

RE: le réticulum endoplasmique

TCR: T cell Receptor

ROS: Les Reactive Oxygen Species

DAMPs: Damage Associated molecular patterns

TLR: Toll Like Receptors

CDi: cellule dendritique immature

CDm: cellule dendritique mature

PNN: polynucléaire neutrophile

TDTH: lymphocyte T implique' dans l'hypersensibilité

HSP: Heat Shock Protein

ADCC: L'Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

NFAT: le nuclear Activating factor

ICAM: molécules de la superfamille des immunoglobulines

GLOSSAIRE

Allo-anticorps : anticorps produit entre individus non identiques appartenant à une même espèce.

Allo-antigènes : molécule variable selon les individus d'une même espèce (exemple : système ABO).

Crossing-over : un phénomène génétique qui a lieu lors de la méiose.

Haplotype : est un groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble.

Hétérodimère : protéine composée de deux sous-unités différentes.

Hétérozygote : pour un gène ou un locus donné, exprime deux allèles différents.

Histocompatibilité : compatibilité entre les tissus d'un greffon et ceux d'un hôte, étroitement liée à leur appartenance à des groupes tissulaires génétiquement définis.

Homozygote : pour un gène ou un locus donné, exprime un seul allèle en double.

Immunosuppresseurs : des médicaments utilisés dans le traitement immunosuppresseur pour inhiber ou prévenir l'activité du système immunitaire.

Loci : pluriel de locus.

Multigénique : comportant plusieurs gènes au sein d'un même génome.

Non-soi : correspond à l'ensemble des molécules dont la synthèse ne résulte pas de l'information génétique propre à l'organisme et qui sont reconnues comme étrangères par le système immunitaire.

Phénotype : manifestation apparente de la constitution du génome.

Soi : correspond à l'ensemble des molécules résultant de l'expression des gènes d'un individu.

Protéasome: Le protéasome se présente sous la forme d'un gros cylindre, les sites catalytiques étant présents à l'intérieur du cylindre; Le protéasome génère en général des peptides qui font entre 8 et 10 acides amines, ce qui convient très bien pour la molécule HLA de classe I.

Le complexe majeur d'histocompatibilité HLA est un complexe immun génique de plus de 200 gènes, qui régit les lois de l'histocompatibilité et qui est impliqué dans la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T. Ce système est caractérisé par son extrême polymorphisme propre à un individu issu d'une population donnée qui pourra elle aussi être caractérisée par une série de spécificités HLA.

Notre étude est une analyse rétrospective portant 460 patients algériens recrutés principalement dans le cadre de la transplantation rénale et dans le cadre de la recherche d'une association HLA et maladies au niveau de l'unité d'immunologie Hassiba Ben Bouali du CHU de BLIDA entre 2009 et 2016.

Le but de notre étude est d'évaluer la fréquence de la prévalence des anticorps anti-HLA chez les patients en attente de greffe rénale au CHU de Blida. IL s'agit d'une étude rétrospective incluant tous les patients ayant bénéficié des greffe rénale de 2009 jusqu'à 2016 par les méthodes suivantes :

D'abord technique de séparation des lymphocytes ensuite l'extraction d'ADN à partir du sang périphérique après Etude de polymorphisme HLA par les deux techniques sérologique et biologie moléculaire concernant la recherche des anticorps anti-HLA de classe I et II en utilise deux techniques premièrement immunoenzymatique ELISA, deuxièmes Cross match par lymphocytotoxicité

Nos résultats montrent que les allèles HLA les plus fréquemment retrouvés au sein de la population algérienne sont : HLA-A*2, A*1, HLA-B*44, HLA-B*51, HLA-C*7, HLA-C*6,

HLA DR*52, HLADR*4, HLA-DQ*2.

Pour les allèles les moins fréquents sont : HLA-A*66, HLA- A*74, HLA-B*55, HLA-B*78, HLA-C*9, HLA-C*1, HLA- DR*23 et HLA- DQ*9.

Pour les haplotypes les plus fréquents dans notre population étudiée nous avons trouvé : A2 B53 A30 B44 A2 B50 DR4 DQ2 B49 C7, B14 C19, B14 C8 DR1, DR7 DQ2 et DR52 DQ32.

Notre travail a permis de définir les allèles HLA et les haplotypes les plus fréquemment rencontrés en Algérie et de les comparer avec ceux retrouvés chez d'autres populations Algérien, Tunisienne et Mauritanien.

معقد التوافق النسيجي الرئيسي HLA هو مركب جيني مناعي يتكون من أكثر من 200 جين ، والذي يحكم قوانين التوافق النسيجي و يشارك في تقديم الببتيدات المستضدية إلى الخلايا الليمفاوية التائية. يتميز هذا النظام بتعدد أشكاله الخاص بفرد من a مجموعة معينة يمكن أن تتميز أيضاً بسلسلة من خصائص HLA.

دراستنا عبارة عن تحليل بأثر رجعي لـ 460 مريضاً جزائرياً تم تجنيدهم بشكل أساسي في إطار زراعة الكلى وفي إطار البحث عن ارتباط HLA والأمراض على مستوى وحدة المناعة في مستشفى حسيبة بن بوعلي في BLIDA CHU بين عامي 2009 و 2016.

الهدف من دراستنا هو تقييم مدى انتشار الأجسام المضادة لـ HLA في المرضى الذين ينتظرون عمليات زرع الكلى في مستشفى جامعة البليدة. هذه دراسة تشمل جميع المرضى الذين خضعوا لعمليات زرع الكلى من عام 2009 إلى 2016 بالطرق التالية:

أولاً وقبل كل شيء ، تقنية فصل الخلايا الليمفاوية ثم استخراج الحمض النووي من الدم المحيطي بعد دراسة تعدد الأشكال HLA بواسطة تقنيات البيولوجيا المصلية والجزيئية المتعلقة بالبحث عن الأجسام المضادة من الصنف الأول والثاني من HLA باستخدام تقنيتين الأولى ELISA الإنزيمية المناعية ، والمطابقة المتقاطعة الثانية عن طريق السمية اللمفاوية تظهر نتائجنا أن أليلات الأكثر شيوعاً في السكان الجزائريين هي:

HLA-A*2, A*1, HLA-B*44, HLA-B*51, HLA-C*7, HLA-C*6, HLA DR*52, HLADR*4, HLA-DQ*2.

بالنسبة للأليلات الأقل شيوعاً هي:

HLA-A*66, HLA- A*74, HLA-B*55, HLA-B*78, HLA-C*9, HLA-C*1, HLA- DR*23 et HLA- DQ*9.

بالنسبة للأنماط الفردانية الأكثر شيوعاً في مجتمع دراستنا ، وجدنا:

A2 B53 A30 B44 A2 B50 DR4 DQ2 B49 C7, B14 C19, B14 C8 DR1, DR7 DQ2 et DR52 DQ32.

مكّن عملنا من تحديد أليلات HLA والأنماط الفردانية الأكثر شيوعاً في الجزائر ومقارنتها بتلك الموجودة في السكان الجزائريين والتونسيين والموريتانيين الآخرين.

الكلمات المفتاحية: HLA ، الزرع ، تعدد الأشكال ، الجزائر ، الأليلات ، الأنماط الفردانية

Abstract

HLA major histocompatibility complex is an immune gene complex of more than 200 genes, which governs the laws of histocompatibility and which is involved in the presentation of antigenic peptides to T lymphocytes. This system is characterized by its extreme polymorphism specific to an individual from a given population which can also be characterized by a series of HLA specificities.

Our study is a retrospective analysis of 460 Algerian patients recruited mainly within the framework of renal transplantation and within the framework of the search for an association of HLA and diseases at the level of the Hassiba Ben Bouali immunology unit of the CHU of BLIDA between 2009 and 2016.

The aim of our study is to assess the frequency of the prevalence of anti-HLA antibodies in patients awaiting kidney transplants at the Blida University Hospital. This is a retrospective study including all patients who underwent renal transplants from 2009 to 2016 by the following methods:

First of all, lymphocyte separation technique then DNA extraction from peripheral blood after HLA polymorphism study by both serological and molecular biology techniques concerning the search for anti-HLA class I and II antibodies using two techniques first immunoenzymatic ELISA, second cross match by lymphocytotoxicity.

Our results show that the HLA alleles most frequently found in the Algerian population are: HLA-A * 2, A * 1, HLA-B * 44, HLA-B * 51, HLA-C * 7, HLA-C * 6, HLA DR * 52, HLADR * 4, HLA-DQ * 2.

For the less frequent alleles are: HLA-A * 66, HLA- A * 74, HLA-B * 55, HLA-B * 78, HLA-C * 9, HLA-C * 1, HLA- DR * 23 and HLA- DQ * 9.

For the most frequent haplotypes in our study population we found: A2 B53 A30 B44 A2 B50 DR4 DQ2 B49 C7, B14 C19, B14 C8 DR1, DR7 DQ2 and DR52 DQ32.

Our work made it possible to define the HLA alleles and haplotypes most frequently encountered in Algeria and to compare them with those found in other Algerian, Tunisian and Mauritanian populations.

Keywords: HLA, transplantation, polymorphism, Algeria, alleles, haplotypes

I. Introduction :

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

Le rejet fait suite à l'introduction, chez un receveur, d'un greffon génétiquement différent. Il représente encore, à l'heure actuelle, un obstacle majeur en transplantation rénale et traduit une réaction immunitaire protectrice normale d'un receveur vis-à-vis d'un antigène étranger. Cette réaction, qui met en jeu de nombreux mécanismes de l'immunité innée et adaptative, entraîne des lésions du parenchyme rénal pouvant évoluer jusqu'à la destruction totale du greffon et la perte de sa fonction. Plusieurs moyens sont actuellement utilisés pour réduire l'action du système immunitaire et diminuer ainsi le risque de rejet. (**Elsevier Masson., 2010**)

On décrit plusieurs systèmes d'histocompatibilités : le système du groupe sanguin ABO fortement antigénique le complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) les antigènes mineurs d'histocompatibilités : super antigènes, ou peptides associés à des molécules CMH du donneur (présentation directe) ou du receveur (présentation indirecte) à les protéines MICNMIIB ; Ces systèmes d'histocompatibilité sont à l'origine des réactions de rejets, complications immunologiques de la transplantation, suspectée cliniquement et biologiquement, puis confirmée en histologie. D'un point de vue clinique, on décrit différents types de rejet : hyperaigu, aigu et chronique. (**Steven K. Takemoto et al.,2004**)

Le champ d'application de l'exploration du système **HLA** est extrêmement étendu et ceci s'explique par son rôle dans le contrôle et le développement des réponses immunitaires essentiellement de type spécifique. Il faut, cependant, reconnaître qu'en pratique courante, c'est avant tout le domaine de la transplantation et à un moindre degré celui de la susceptibilité génétique aux maladies auto-immunes qui constituent l'activité principale des laboratoires d'histocompatibilité.

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

Le polymorphisme du système HLA est généré par les mutations et les conversions géniques. L'étude de ce dernier s'intéresse aux origines et aux mouvements migratoires des différentes populations, qui ont influencé la diversité génétique, la distribution et la fréquence des différents allèles et haplotypes de ces populations.



***Recherche
Bibliographique***

Chapitre 1 : Système HLA

I. Découverte du CMH :

L'existence du **CMH** a d'abord été évoquée chez la souris, par **Peter Görer**, en **1936**.

Des réactions d'agglutinations d'érythrocytes de souris par des sérums de lapin préalablement immunisés par des érythrocytes murins ont permis de suggérer l'existence d'allo-antigènes en surface cellulaire. Snell observa par la suite que le rejet du greffon chez la souris était associé à une incompatibilité au niveau des allo-antigènes précédemment définis par Görer.

C'est ainsi qu'il décrit pour la première fois le Complexe Majeur d'Histocompatibilité murin, nommé «H2» en l'honneur de l'antigène II découvert par Görer. (**J. Klein.,2001**)

C'est donc sa capacité d'induire une forte réponse immunitaire allogénique, responsable du rejet de greffe, qui le fait connaître dans un premier temps et qui lui fait mériter son nom. Son rôle majeur dans la réponse immunitaire et dans l'éducation des lymphocytes T par la présentation des antigènes, n'a été découvert que 30 ans après.

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de l'homme fut découvert en **1952** par **Jean Dausset**, récompensé du prix Nobel de médecine en **1980**.

Son nom de système **HLA** symbolise le groupe sanguin leucocytaire mis en évidence par l'agglutination de leucocytes par des sérums de sujets immunisés à l'occasion de transfusions sanguines.

En effet, après ses études de médecine à Paris, Jean Dausset porta un grand intérêt aux patients polytransfusés et leucopéniques, chez qui il découvrit l'existence d'anticorps anti-leucocytes, d'abord soupçonnés d'auto-anticorps.

Il démontra rapidement qu'il s'agissait en fait d'une allo-immunisation générée par les nombreuses transfusions. Ce n'est pourtant que six ans plus tard, en **1958**, que le premier antigène du **CMH** humain **MAC (HLA-A2)** est décrit.

A cette époque, des expériences ont été réalisées à partir du sérum d'un patient qui avait reçu des transfusions d'un unique donneur.

Elles permirent de constater que les anticorps développés par ce patient réagissaient avec les leucocytes de la moitié d'une population de donneurs volontaires. Les noms des trois premiers donneurs avec qui le sérum n'a montré aucune réaction sont à l'origine de l'acronyme **MAC**. (**E. D. Carosella.,2009**)

La technique sérologique de lymphocytotoxicité complément-dépendante va ensuite être développée et permettra la découverte de nouveaux antigènes qui révèlent alors progressivement le grand polymorphisme du système HLA.

La classe II fut caractérisée plus tardivement, par des réactions lymphocytaires mixtes.

En 1968, Jean Dausset évoque la possibilité d'une relation étroite entre les groupages **HLA** et la susceptibilité génétique à développer certaines maladies.

Le concept de médecine prédictive entraîne alors la nécessité d'établir la carte génétique, en particulier du système **HLA**, localisé quelques années plus tôt sur **le bras court du chromosome 6**. Des centaines de laboratoires dans le monde entier sont enthousiasmés par ce projet ce qui permit des progrès rapides en biologie moléculaire et une description de plus en plus précise du **CMH**, au niveau génétique. (**Carosella ED et al.,2009**)

II. Définition et structure du HLA :

Le **CMH** code pour des molécules de structure moléculaires **HLA** et aussi pour des molécules qui servent à la fixation des peptides antigéniques.

Le locus génétique invisible dans le rejet des organes étrangers est connu comme le principal complexe d'histocompatibilité CMH. Chez l'homme, est une région du génome qui s'étend sur 7,6 mégabases située sur le bras court du chromosome 6. Sa carte génétique établie en 1993 révèle plus de 250 gènes dont seul 60% d'entre eux seraient exprimés. (**Shiina T et al., 1999**)

Les molécules de classe I et de classe II se ressemblent beaucoup.

On dit que ces molécules appartiennent à la superfamille des Immunoglobulines (ce sont souvent des molécules qui sont impliquées dans les réponses immunitaires et qui sont organisées en domaines extracellulaires d'à peu près 100 acides aminés globulaires: on en a trois pour la chaîne α de classe I, deux pour la chaîne α de classe II et deux pour la chaîne β de classe II; on a également un domaine intra membranaire et un domaine intra cytoplasmique).

1-Structure du CMH I

Hétérodimère => Association non covalente de deux chaînes polypeptidiques:

Leur structure tridimensionnelle Chaîne lourde α 1 et 2 constituent le sillon peptidique «peptide binding groove» avec deux hélices α encadrant un plancher de feuillet β . (**45 KDa**) transmembranaire, polymorphe constituée de trois domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, et $\alpha 3$, glycosylée, codée par le locus **CMH I** sur le bras court du chromosome 6.

Chaîne légère $\beta 2$ -microglobuline (**11-12 KDa**) extracellulaire, non polymorphe, non glycosylée, codée par un gène localisé sur le chromosome 15

Trois gènes de classe I sont étudiés en transplantations d'organes : **HLA-A, -B et -C** (**A. Maffei et al., 2004**)

2-Structure du CMH II

Glycoprotéine transmembranaire : Chaîne lourde α (34 KDa), Chaîne légère β (26-29 KDa).

Quatre domaines forment la partie extracellulaire (30AcAm) : $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ glycosylés et $\beta 2$ (site de fixation au **CD4**).

Domaine transmembranaire hydrophobe (30AcAm).

Domaine intracytoplasmique, très court (10 à 15 AcAm), hydrophile. $\alpha 1$, $\beta 1$ sont très polymorphes. $\alpha 2$, $\beta 2$ ressemblent aux domaines constants des immunoglobulines.

Trois molécules sont étudiées en transplantation d'organes les molécules **DR, DQ** et **DP** respectivement codées par les gènes des chaînes alpha **HLA-DRA, -DQA1, -DPA1** et des chaînes bêta **HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQB1** et **-DPB1** (figure 1). Les gènes **HLA-DRB1, -DQB1** et **-DPB1** sont les plus polymorphes et étudiés en priorité en transplantation d'organe. Le gène **HLA-DRA** n'est jamais étudié car très peu polymorphe (seulement deux protéines différentes sont décrites dans l'espèce humaine). (**A. Maffei et al., 2004**)

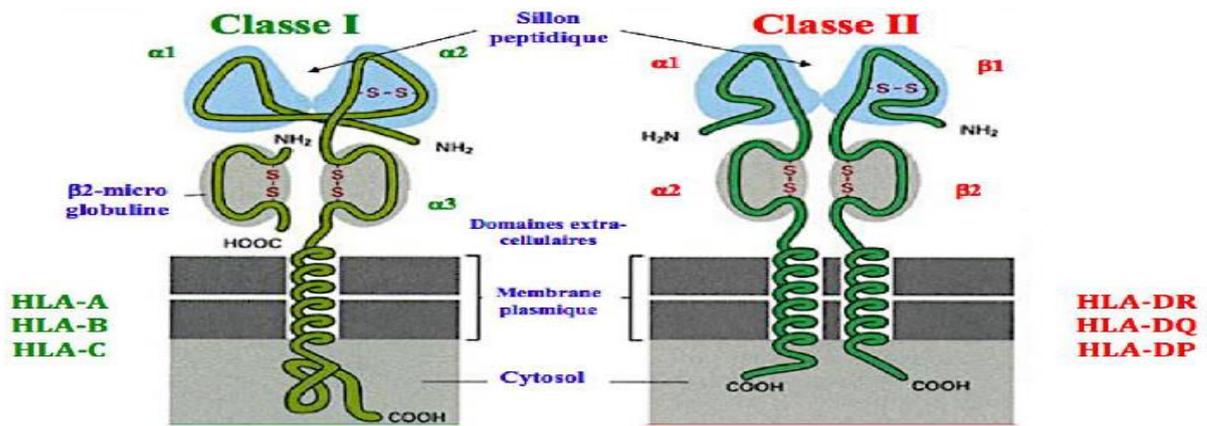


Figure 1: structure des molécules de CMH de classe I et II .

Les gènes HLA de classe III situés entre les deux classes précédentes sont des gènes codant diverses protéines qui peuvent avoir un rôle dans la réponse immunitaire comme par exemple des facteurs du système du complément, le (TNF), ... L'ensemble de ces gènes sont très peu polymorphes, même invariant et ne sont pas étudiés pour la compatibilité donneur-receveur en transplantation d'organe

III. Cartographie :

Les premières cartes chromosomiques du CMH de l'homme ont bénéficié des travaux faits chez la souris (système H-2), de l'observation de familles informatives avec recombinaisons chromosomiques, d'étude de populations, de techniques de cultures de cellules de mammifères (technique des hybrides cellulaires somatiques). Ainsi furent précisées les notions génétiques essentielles propres à ce système : localisation sur le bras court du 6e chromosome chez l'homme (bande 6p21.3) et ordre des principaux gènes **HLA**, du télomère vers le centromère (**HLA-A, -C, -B, -DR, -DQ et -DP**).

Les méthodes plus fines de la biologie moléculaire moderne ont conduit à des cartes toujours plus détaillées de cette région de 4 à 5 000 kilobases (kb) correspondant au CMH de l'homme. (Figure 2) (Rhodes DA et al.,1999)

Schématiquement, ce **CMH** comporte trois régions riches en gènes. Celles-ci sont notées, du télomère vers le centromère, région de classe I (abritant notamment les gènes **HLA** dits classiques de classe I -**HLA-A, B et Cw**- et non classiques -**HLA-E, F, G, MIC et HFE**) s'étirant sur quelque 2 000 kb, région de classe III (abritant des gènes apparentés ou non au système **HLA** mais dont un grand nombre est impliqué dans la réponse immune, tels les gènes codant certaines protéines du complément C2, C4, Bf, ou certaines cytokines), couvrant une longueur de 700 kb, enfin la région de classe II (abritant les gènes **HLA-DR, -DQ et -DP**) sur une longueur de 1 000 kb.

La première séquence complète et la carte génique du **CMH** de l'homme ont été publiées en 1999 : au total 224 gènes ont été identifiés mais seulement 128 seraient exprimés. Une fonction immunitaire est attribuée à 40 % de ces gènes exprimés. (Marfo et al.,2011)

Plus récemment, le séquençage étendu du CMH humain a permis de caractériser, sur 7,6 Mb, 421 loci correspondant à 60 % de gènes exprimés, 7 % de gènes transcrits et 33 % de pseudogènes.

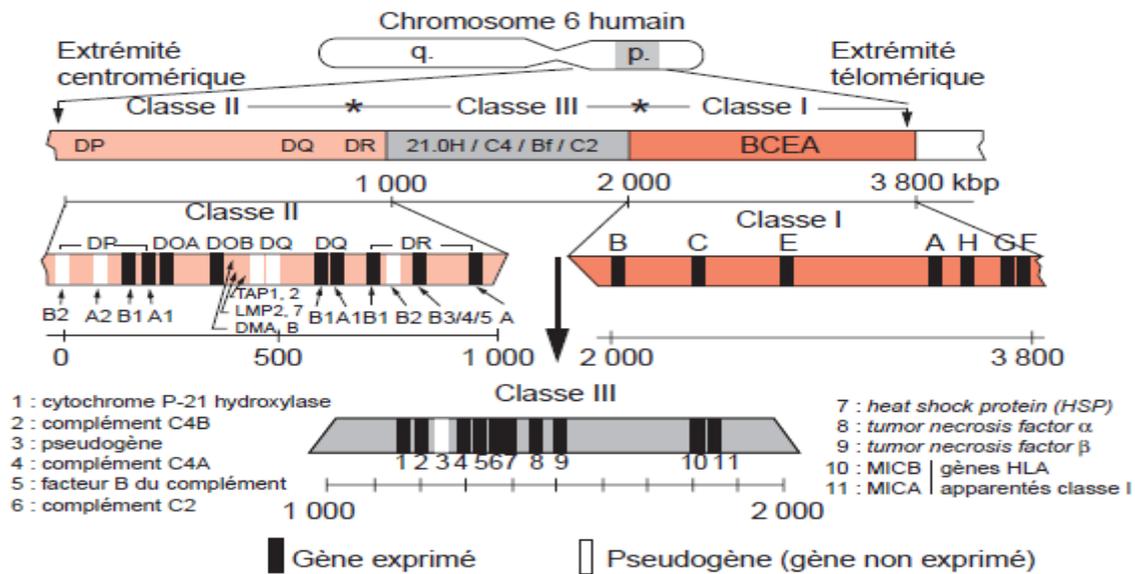


Figure 2. Carte physique de la région chromosomique humaine leucocyte antigène (HLA).

1. Structure des gènes classe I :

On distingue deux sous-classes de molécules de classe I :

- Les molécules de **classe I classiques (Ia)** codées par les **gènes HLA-A, -B et -C** et qui sont d'intérêt majeur en transplantation. Ces gènes sont hautement polymorphiques, et leur expression est pratiquement ubiquitaire (voir paragraphe ci-dessous « expression des molécules de classe I »). (J. Proll et al., 2011)
- Les molécules de **classe I non classiques (Ib)** codées par les **gènes HLA-E, -F, -G** situés dans la région de classe I du CMH et le **gène HLA-H** (aussi connu sous le nom HFE) situé à proximité du CMH. (J. Proll et al., 2011)
- Les trois gènes **HLA-E, -F, -G** ont un polymorphisme et une expression cellulaire bien plus limités que ceux de **classe Ia**. (L. Pichon et al., 1996)

Des analyses phylogénétiques laissent penser que la classe Ib proviendrait de la duplication des loci de classe Ia, mais certaines séquences, en particulier celles de régulation transcriptionnelle en 5' ne seraient pas conservées. (A.L. Hughes et al., 1995)

Cette notion permet de comprendre les risques d'amplification non spécifique et la difficulté de synthétiser des amorces de qualité en biologie moléculaire.

Les deux premiers constituent la zone la plus polymorphe de la molécule.

peptides *leader* (codé par l'exon 1) des molécules **HLA de classe Ia**, et reflètent ainsi le niveau de transcription de ces dernières. Cette action est destinée à renseigner les cellules **NK** qui surveillent la qualité d'expression des molécules **HLA de classe I** classique. (V. M. Braud et al.,1999)

Récemment, la molécule **HLA-E** fait l'objet de diverses études sur l'influence de son polymorphisme dans la survenue de la réaction du greffon contre l'hôte (**GvH**), «*Graft versus host disease*») après une greffe de (**CSH**). (E. Hosseini et al.,2014)

Certaines études ont conclu que le phénotype **HLA-E*01:03/E*01:03** du receveur serait associé à un moindre risque de développer une **GvH** après une greffe de moelle osseuse et globalement à une survie plus longue. Il a aussi été retenu que l'homozygotie du donneur pour **HLA-E*01:01** (comparé aux phénotypes **HLA-E*01:01/E*01:03** et **HLA-E*01:03/E*01:03**) serait favorable au développement d'infections bactériennes en lien direct avec une mortalité accrue après la greffe.

Une capacité de présentation des peptides moins efficace par les cellules du donneur serait à l'origine de cette tendance aux infections. (M. A. Pabón et al.,2014)

Il est aussi intéressant de s'arrêter sur la molécule **HLA-G**, découverte en 1990.

Son polymorphisme est comparable à celui du gène **HLA-C**. Longtemps considérée comme en «voie d'extinction», **HLA-G** a finalement suscité de l'intérêt lors de la découverte de ses fonctions en particulier pendant la gestation. Les cellules trophoblastiques n'exprimeraient d'ailleurs que des molécules de **classe Ib**.

Dans des conditions physiologiques, on ne retrouve les molécules **HLA-G** que dans les cellules trophoblastiques, les cellules épithéliales du thymus et la cornée. Son expression transcriptionnelle est très largement représentée dans les tissus adultes et embryonnaires, en revanche la protéine n'est retrouvée qu'en surface d'un nombre restreint de cellules, notamment au niveau placentaire.

En effet, le gène **HLA-G** est soumis à une importante régulation post-transcriptionnelle qui donne lieu à sept isoformes différentes, quatre membranaires et trois solubles. (M. A. Pabón et al.,2014)

En effet, la grossesse peut être comparée à une greffe semi-allogénique, puisque le fœtus exprime les antigènes maternels mais aussi paternels, ces derniers étant étrangers pour la mère.

On comprend que le phénomène de tolérance immunitaire a toute son importance pour le bon déroulement des échanges fœto-maternels, et le maintien en vie du fœtus qui doit échapper aux cellules Natural Killer de sa mère.

Le rôle de la molécule **HLA-G** dans la greffe de tissus a également été démontré avec une corrélation positive entre son expression et la diminution du risque de rejet.(M. A. Pabón et al.,2014)

Nous ne détaillerons pas la molécule **HLA-F**, qui demeure encore très peu étudiée. Ces molécules seraient transcrites dans la plupart des cellules et exprimées au niveau intracellulaire. Mais récemment, l'équipe de Geraghty montre, grâce à de nouveaux anticorps monoclonaux **anti-HLA-F**, que contrairement à la plupart des lignées cellulaires, toutes les populations de lymphocytes (B, T et NK), les monocytes et les cellules du trophoblaste extravilleux expriment **HLA-F** à leur surface. (M. A. Pabón et al.,2014)

Quant à la molécule **HLA-H**, autrement appelée **HFE**, elle semble être une exception à l'implication des molécules **HLA** dans le système immunitaire. Son rôle est plutôt important dans le métabolisme du fer. (E. Hosseini et al.,2014)

Au total, les molécules de classe Ib, et plus précisément **HLA-E** et **HLA-G**, pourraient jouer un rôle important dans la réaction d'immunotolérance en transplantation d'organe et de **CSH**. (M. A. Pabón et al.,2014)

Il est important de noter que la surface des globules rouges ne possède aucune molécule HLA chez l'Homme, contrairement à d'autres espèces, notamment la souris, ce qui explique la découverte de Görer. Les thrombocytes expriment les molécules **HLA de classe I** et présentent de ce fait des risques d'allo-immunisation **anti-HLA de classe I** lors des transfusions plaquettaires.

Actuellement, les précautions transfusionnelles consistent à utiliser des culots globulaires déleucocytés lors de transfusions érythrocytaires pour limiter les risques **d'allo-immunisation anti-HLA**.

1.3. Les molécules du CMH I présentent les antigènes endogènes aux lymphocytes T CD8+:

La détection des protéines par les lymphocytes T ne peut avoir lieu qu'après leur transformation en peptide, formant un complexe ternaire avec la molécule HLA et le récepteur du lymphocyte T (**TCR**). La cavité formée par les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, décrite un peu plus tôt, permet de loger un peptide de 8 à 10 acides aminés issu de la dégradation intracytoplasmique de protéines endogènes.

Dans le cas des molécules de classe I, cette loge est fermée de façon à retenir les extrémités libres du peptide, que constituent les groupements amine NH_2 et carboxylique COOH .

Nous verrons cependant que cette règle n'est pas exclusive. Il existe en effet des protéines d'origine exogène présentées par les molécules de classe I. (A. Maffei et al.,1997)

En l'absence d'infection par un pathogène, les sillons des molécules de classe I de la cellule sont occupés par des peptides dérivés de protéines du soi.

En revanche, lorsque la cellule héberge un pathogène, les peptides présentés en surface dérivent de l'agent infectieux (protéines du non soi), c'est ce qui va permettre de déclencher une réponse du système immunitaire entraînant ainsi l'élimination des cellules infectées.

Avant d'être à l'état de peptides « **apprêtables** », les protéines doivent entrer dans la voie de production **endogène** ou **cytosolique** des peptides, dont les principaux acteurs sont les protéasomes, des complexes de protéinases à haute activité catalytique.

La chaîne lourde α et la chaîne légère $\beta 2$ -microglobuline, après leur traduction, sont toutes les deux équipées d'une séquence signal guidant leur entrée dans le réticulum endoplasmique (**RE**).

Tout un processus est mis en jeu pour faciliter cet assemblage, que nous ne détaillerons pas davantage ici. Le schéma de la figure représente la voie d'assemblage des molécules de classe I et l'apprêtement du peptide.(A. Maffei et al.,1998)

Dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) dites professionnelles, comme les cellules dendritiques myéloïdes, les peptides présentés par les molécules de classe I peuvent être d'origine exogène, on parle alors de présentation croisée.

En d'autres termes, elle est mise en jeu lorsque des molécules **HLA de classe I** présentent des protéines qui ne sont pas synthétisées par la cellule elle-même. Ce phénomène est également schématisé dans la figure. (K. L. Rock et al.,2005)

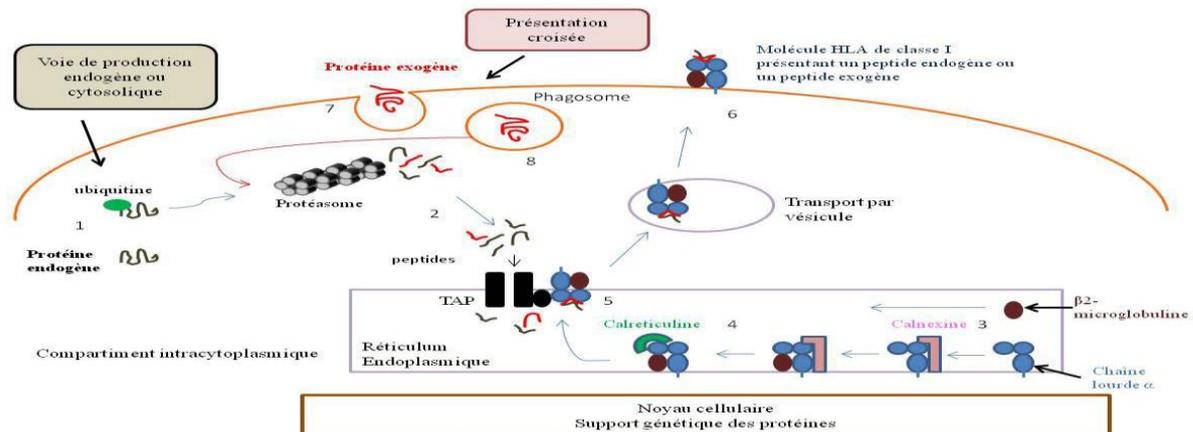


Figure 4 : Schéma d'apprêtement des protéines endogènes par les molécules HLA de Classe I et présentation croisée de protéines exogènes .

2. Structure des gènes classe II :

Les gènes du CMH de classe II sont séparés en cinq sous-régions DR, DQ, DP, DO et DM. Chacune d'elles, contient des gènes A et B, codant respectivement pour les chaînes α et β des molécules DR, DQ, DP, DO et DM.

Les gènes A (DRA, DQA, DPA, DOA et DMA) comportent 5 exons, leur polymorphisme est restreint notamment pour le gène DRA qui ne présente que 7 allèles décrits dans l'espèce humaine. Ceci contraste avec la majorité des gènes B de classe II qui sont hautement polymorphes, notamment DRB1. A noter que celui-ci comporte également 5 exons contrairement aux autres gènes B qui en comptent 6.

Les sous-régions ne sont pas comparables en termes de gènes et de polymorphisme. Ainsi on dénombre au moins 10 gènes au niveau de la famille DR : un unique gène DRA pratiquement invariant, qui est à l'origine de la chaîne DR α , et neuf gènes DRB. Parmi eux, quatre sont polymorphes et codent pour une chaîne DR β (DRB1, DRB3, DRB4 et DRB5), les cinq autres sont des pseudogènes (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 et DRB9).

- La molécule membranaire mature HLA-DR est formée de l'association d'une chaîne DR α et d'une chaîne DR β , elle doit finalement son grand polymorphisme aux seuls gènes DRB. (J.-F. Eliaou.,2007)
- La sous-région DQ peut être décrite plus simplement, puisqu'elle ne présente que deux gènes HLA-DQA (A1 et A2) et trois gènes HLA-DQB (B1, B2 et B3). Seuls les gènes DQA1 et DQB1 sont fonctionnels.
- Une description similaire de la région DP peut être apportée, avec cette fois trois gènes connus pour HLA-DPA (A1, A2 et A3) et deux gènes décrits pour HLA-DPB (B1 et B2). De

la même façon, seuls les gènes DPA1 et DPB1 sont fonctionnels. **HLA-DPA2, -DPA3 et -DPB2** sont des pseudogènes. **2015**

- Quant aux **sous régions DO et DM**, elles comportent chacune deux gènes (**DOA, DOB** et **DMA, DMB**) dont l'expression résulte en une molécule hétérodimérique de classe II non classique impliquée dans le mécanisme d'apprêtement de l'antigène.

Au total, six gènes sont principalement impliqués et étudiés en histocompatibilité lors des greffes : trois de **classe I (HLA-A, B, C)** et trois de **classe II (HLA-DRB1, DQB1, et DPB1)**.

Les gènes **DRB3, DRB4, DRB5** sont étudiés dans le contexte de la greffe de cellules souches hématopoïétiques mais seulement occasionnellement en transplantation d'organe. Ils ne sont étudiés (comme pour les gènes **DQA1 et DPA1**) que lorsqu'une immunisation a été mise en évidence chez le receveur.

Cette pluralité moléculaire est le fruit de la combinaison de chaînes α et β synthétisées par des gènes portés par le même haplotype (molécules normales, dites de cis-complémentation). Cependant des molécules dites hybrides, fruit de l'association de chaînes α et β synthétisées par des gènes portés par les deux haplotypes (molécules hybrides de trans-complémentation), ont été rapportées chez la souris, puis chez l'homme. (**Charron DJ.,1984**)

Ces molécules hybrides ajoutent encore plus de diversité **HLA** et pourraient expliquer d'une part la susceptibilité accrue de certains sujets (hétérozygotes) à certaines maladies comme le diabète, [30] et d'autre part l'avantage sélectif des sujets **hétérozygotes HLA**, proposé dès **1975**, [31] et observé à partir de **1991**. (**E. Hosseini et al.,2014**)

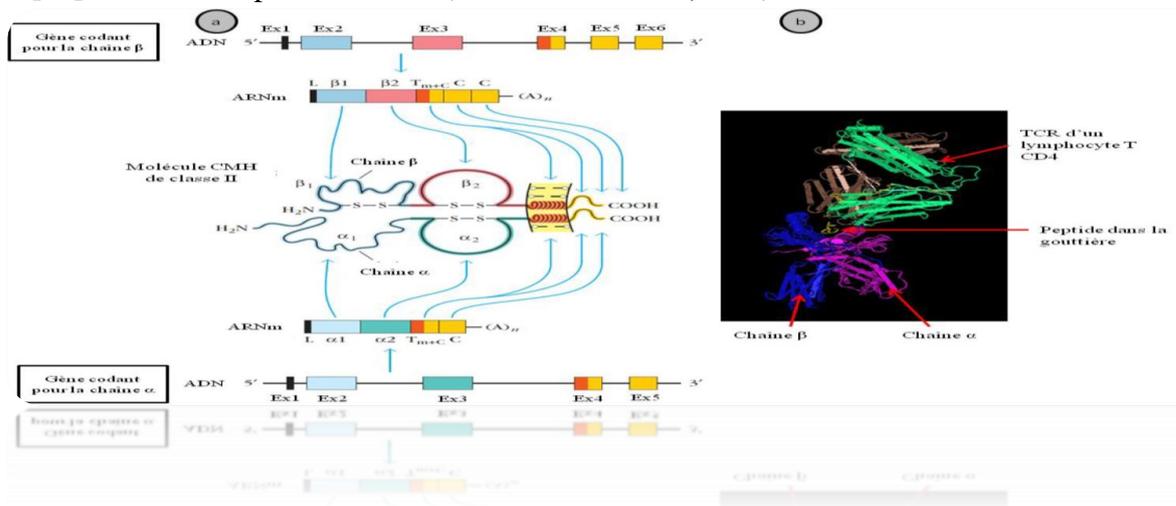


Figure 5 : Représentation schématique des gènes de classe II du CMH, de l'ARNm transcrit et des protéines obtenues.

Les deux chaînes s'associent entre elles pour former une molécule composée d'une partie extracellulaire comprenant deux domaines de chaque **chaîne ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$)**.

Les extrémités $\alpha 1$ et $\beta 1$ constituent le sillon servant à accueillir les peptides.

Cette cavité est délimitée par des parois formées de deux hélices α et par un plancher de feuillet β .

Tout comme pour les molécules de classe I, les domaines proximaux ($\alpha 2$ et $\beta 2$ pour les molécules de classe II et $\alpha 3$ pour la chaîne α des molécules de classe I) ont une structure proche de la superfamille des immunoglobuline. (**Doherty PC et al.,1975**)

2.1. Expression des molécules de classe II :

L'expression cellulaire des molécules de classe II est limitée aux cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) du système immunitaire que sont les lymphocytes B, les monocytes / macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans épidermiques et les cellules de Kupffer du foie. Elles sont chargées de la présentation des peptides aux lymphocytes T CD4+. (J. P.-Y. Ting et al., 2002)

Leur expression membranaire est régulée par l'interféron gamma (IFN γ), qui peut induire une exacerbation de l'expression en surface cellulaire mais aussi générer des molécules de classe II à la surface de nombreuses cellules qui deviennent alors des cellules présentatrices d'antigènes accessoires.

Leur expression est aussi sous le contrôle d'autres effecteurs comme les interleukines 4 et 10 (IL-4 et IL-10) ou encore le TNF α .

La régulation moléculaire de leur expression fait l'objet d'importantes recherches, afin de comprendre le fonctionnement complexe des promoteurs et des facteurs de transcription qui permettent d'établir un équilibre entre les réactions vis-à-vis de peptides étrangers, et l'auto-réactivité contre les peptides du soi. (J. P.-Y. Ting et al., 2002)

2.1.1. Nature des peptides présentés :

La source des peptides présentés par les molécules de classe II provient de protéines dites exogènes, qui pénètrent dans la cellule après phagocytose par les CPAs, pour subir ensuite une dégradation lysosomale.

Il s'agit donc de protéines qui ne sont pas synthétisées dans la cellule.

Les peptides logés dans la niche des molécules de classe II peuvent être plus grands que ceux de la classe I, allant de 10 à 24 résidus d'acides aminés, les extrémités de la gouttière étant ouvertes.

La voie d'assemblage des molécules HLA de classe II et le mécanisme d'apprêtement des peptides par la voie exogène sont schématisés dans la figure.

A noter que les molécules de classe II qui n'ont pas fixé de peptide après assemblage sont rapidement dégradées par la voie endosomale, et présentées à leur tour par leurs semblables.

Ceci explique pourquoi les peptides dérivés de molécules de classe II sont bien représentés dans le répertoire des peptides du soi.

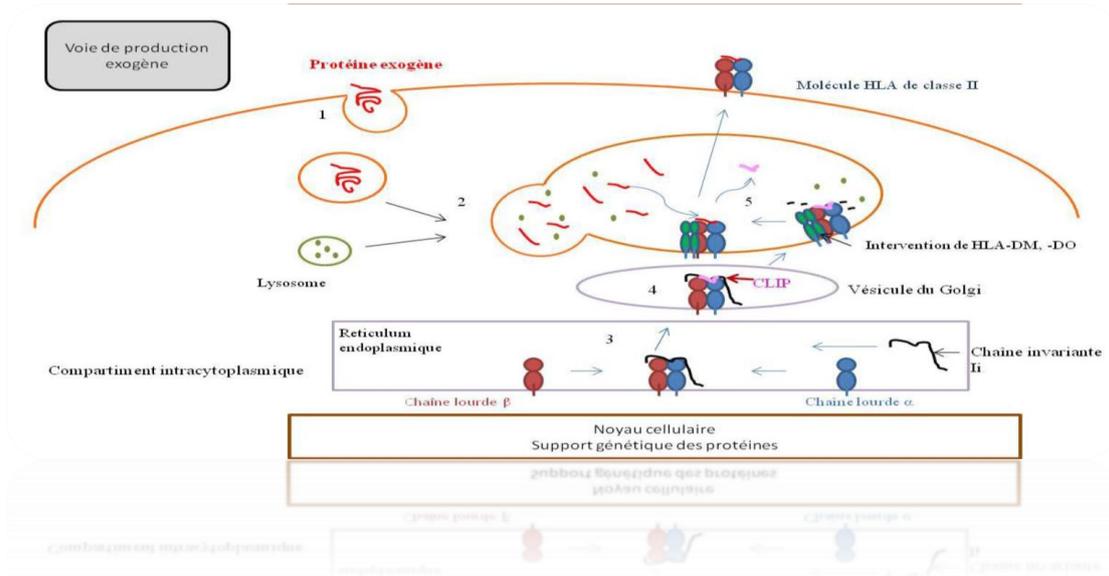


Figure 6 : Schéma d'apprêtement des protéines exogènes par une molécule HLA de classe II.

3. Nomenclature HLA :

La découverte de l'immense polymorphisme des molécules HLA a nécessité la mise en place d'une nomenclature internationale dès **1968**. Tous les allèles décrits sont répertoriés dans une base internationale commune appelée **IMGT** (The international ImMunoGeneTics information system) et mise à jour constamment.

Les nomenclatures utilisées pour la nomination des différentes molécules HLA est imposée par le comité international « WHO nomenclature committee » et dépend de la technique utilisée pour la mise en évidence de l'allèle.

Actuellement, 17166 allèles HLA sont décrits dont 12544 en classe I et 4622 en classe II.

Les nombres d'allèles pour les gènes les plus polymorphes décrits et répertoriés dans la database internationale sont indiqués dans le tableau suivant.

Gène HLA	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Allèles	3968	4828	3579	2103	1142	894

Tableau 1 : Nombre d'allèles pour les gènes (LA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1 décrits en Juin 2017

Nomenclature des antigènes HLA(2004). Ces antigènes sont définis par des techniques sérologiques (séries A, B, C, DR, DQ) ou cellulaires (série DP).

Séries de classe I Séries de classe II

A	B	Cw	DR	DQ	DP
A1	B5 B49 (21)	Cw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7 B50 (21)	Cw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703 B51 (5)	Cw3	DR2	DQ3	DPw3

Devant l'accumulation des données et en raison de la diversité (**polymorphisme**) de ce système, un comité de nomenclature internationale définit régulièrement des règles strictes d'écriture (site <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>).

Celles-ci permettent de référencer clairement les régions géniques (**loci**), les allèles (**ougènes**), les produits (**ou antigènes**) HLA propres à ce CMH. Des équivalences avec d'anciennes désignations sont également précisées. (Marsh SG et al.,2005)

D'une façon générale, chaque spécificité moléculaire HLA est désignée par une lettre précisant le locus auquel elle appartient (**HLA-A pour locus A**) suivie par son numéro spécifique (exemples : **HLA-A2** ; **HLA-B27**). Pour le locus C, et afin d'éviter toute ambiguïté avec les protéines du complément, la lettre W (pour « Workshop ») est accolée à C (exemple : HLA-Cw2).

3.1. La nomenclature est adaptée à la technique utilisée pour réaliser le typage

- En sérologie, on définit des spécificités. Une spécificité regroupe plusieurs allèles qui possèdent le même profil de réactivité sérologique. Il est courant d'utiliser le terme « broad » pour définir une spécificité large que l'on peut subdiviser en « split ». Ces derniers ont été découverts dans un second temps avec la mise en évidence d'**anticorps anti-HLA** plus spécifiques.

- Pour les allèles définis par biologie moléculaire, une étoile suit systématiquement l'identification du locus. On distingue trois types de résolution de typage :

- Le typage générique, dit de « basse résolution », on parle aussi de résolution 2 digits :
- Le typage allélique, dit de « haute résolution », on parle de résolution 4 digits. Avec certaines techniques de biologie moléculaire, on peut obtenir une haute résolution de 6 digits, voire même 8 digits. **2013**

Le suffixe « N » désigne un allèle nul, c'est-à-dire codant pour une protéine qui n'est pas exprimée à la surface cellulaire.

« L » désigne un allèle codant pour une protéine dont l'expression à la surface cellulaire est significativement réduite.

« S » correspond aux protéines sécrétées sous forme soluble

« Q » signifie que l'expression demeure indéterminée

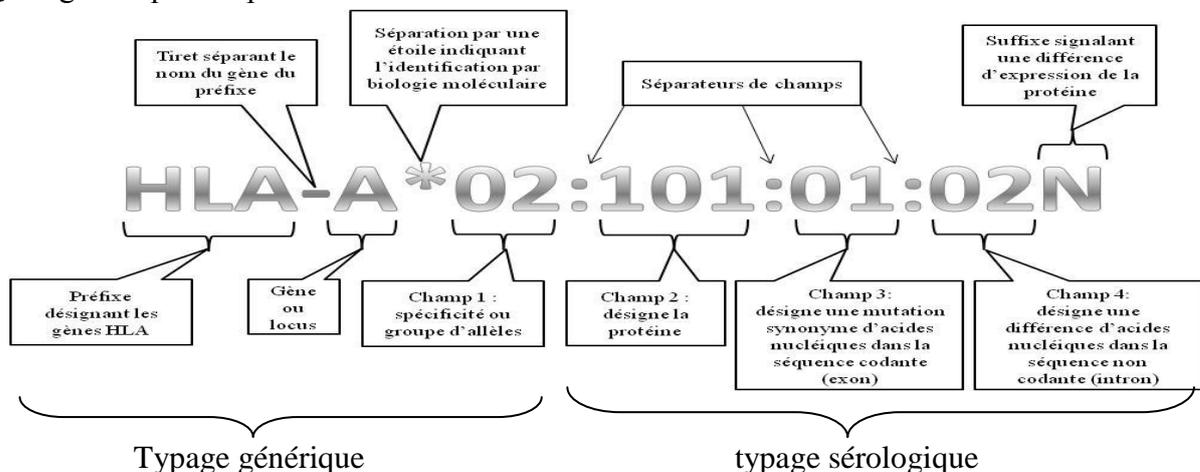


Figure 7 : Nomenclature des allèles HLA 2015.

IV. Caractéristiques du système HLA :

I. Polymorphisme :

Les gènes codant pour les molécules HLA de classe 1 et 2 sont les plus polymorphes du génome humain ; le polymorphisme est le résultat de mutations ponctuelles, mais également de conversion géniques et de recombinaisons homologues ayant eu lieu au moment de la méiose .C'est pour cela que les différents allèles HLA sont très proches entre eux au sein d'un même locus , mais également entre plusieurs loci de la même classe, et que l'on dit que les molécules HLA sont des mosaïques de déterminants antigéniques. (Figure 10)(Van Oosterhout C.,2009

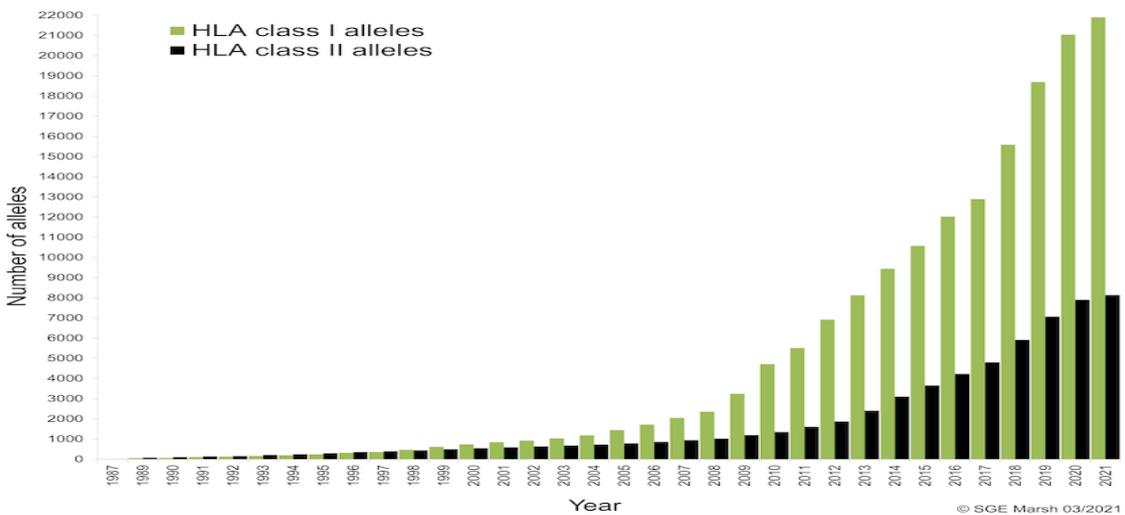


Figure 8 : Répartition du nombre d'allèles nommés depuis 1987 jusqu'a décembre 2021

Liaison étroite et transmission en bloc :

Les gènes codant pour les molécules HLA sont hérités « en bloc » selon un mode mendélien codominant, un individu exprimant alors les allèles en provenance des haplo types transmis par sa mère et son père. Dans de rares cas, un cross-over méiotique ou un évènement de recombinaison peut avoir lieu et modifier l'haplotype parental. Ajouté au polymorphisme des molécules HLA, ce mode de transmission et d'expression implique que la plupart des individus sont hétérozygotes pour la plupart des gènes HLA, et qu'une cellule en provenance d'un individu donné pourra exprimer de 6 à plus de 12 protéines HLA différentes à sa surface.

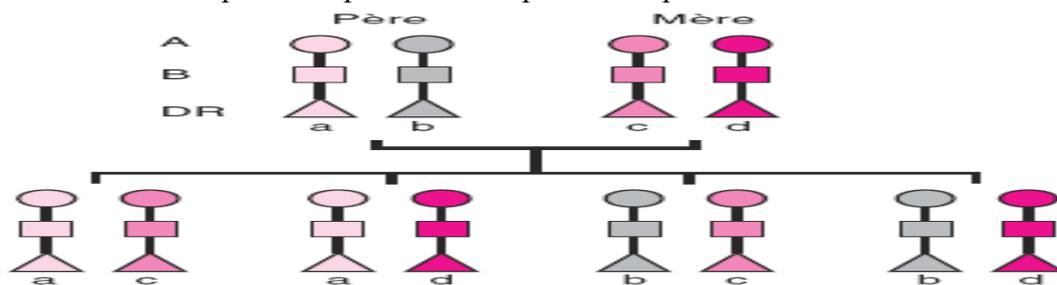


Figure 9 : Transmission parental des haplotypes HLA. (L. Chatenoud)

Immunisation anti-HLA

1. La grossesse

Au cours de la grossesse, on observe un passage d'antigènes fœtaux dans la circulation sanguine maternelle [135]. Cela induit une immunisation progressive contre les antigènes HLA paternels hérités par le fœtus. Au moment de la délivrance, entre 50 et 75% des femmes ont développé des anticorps anti-HLA (Masson E et al., 2013). Bien qu'ils aient tendance à disparaître avec le temps chez la majorité des femmes, ils peuvent parfois rester détectables pendant plusieurs années (van Kampen CA et al., 2002). Le nombre de grossesses semble également directement corrélé au risque d'immunisation et à sa persistance à long terme. En effet, dans une étude portant sur des femmes donneuses de sang, la prévalence de l'immunisation anti-HLA était de 1,7% en l'absence d'antécédent de grossesse, 11,2% après une grossesse et plus de 30% après 4 grossesses ou plus. (Triulzi DJ et al., 2009)

2. La transfusion

La transfusion de culots globulaires et de concentrés plaquettaires est reconnue depuis longtemps comme un événement potentiellement immunisant vis-à-vis des antigènes HLA.

En effet, les plaquettes, mais également les globules rouges dans une moindre mesure, exposent à leur surface des molécules HLA de classe I (Karpinski M et al., 2004). De plus, même après déleucocytation, il persiste dans les produits sanguins labiles des globules blancs, exprimant des molécules HLA de classe I et II (Kakaiya RM et al., 2010). L'incidence de l'immunisation anti-HLA post-transfusion est d'environ 10% chez des patients en attente de transplantation rénale. Cependant, ces anticorps anti-HLA ne semblent pas persister au-delà de quelques mois dans la circulation sanguine. Une étude publiée en 2010 montrait en effet que, dans une population sélectionnée de patients donneurs de sang, la prévalence de l'immunisation anti-HLA était identique chez les donneurs anciennement transfusés ou non. (Wiebe Cet al., 2012) Deux situations particulières sont néanmoins à considérer : les patients multi-transfusés et la population pédiatrique qui semblent plus à risque de développer une allo-immunisation. (Morrell MR et al., 2014)

3. La transplantation d'organes

D'après le dernier rapport annuel de l'agence de biomédecine, en 2017, plus de 98% des transplantations rénales avec donneur décédé ont été réalisées en présence d'une incompatibilité HLA entre le donneur et le receveur. Bien que l'utilisation de greffons provenant de donneurs vivants issus de la même fratrie augmente la probabilité d'une transplantation HLA identique, leur proportion reste relativement faible par rapport au volume total des transplantations (< 5%). De ce fait, la transplantation rénale, et plus généralement d'organes solides, est depuis longtemps reconnue comme une cause majeure d'apparition d'anticorps anti-HLA. Malgré l'avènement des inhibiteurs de la calcine urine (tacrolimus, ciclosporine) et la généralisation des traitements d'induction (sérum anti lymphocytaire, anti-IL2 récepteur), la fréquence d'apparition des anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur (DSA) reste importante. En effet, les études les plus récentes, en transplantation rénale,

cardiaque, pulmonaire ou hépatique, retrouvaient une incidence de DSA de novo variant entre 8 et 26% au cours des premières années post-transplantation. (*Del Bello A et al.,2014*)

Particulièrement étudiés en transplantation rénale, les principaux facteurs de risque retrouvés pour l'émergence de DSA de novo sont l'existence d'incompatibilités HLA (en particulier en classe II), une diminution de l'immunosuppression par décision médicale (en contexte infectieux ou néoplasique) ou par mauvaise observance thérapeutique ainsi que l'existence de facteurs inflammatoires locaux (ischémie-réperfusion, rejet cellulaire, néphrite infectieuse). (*Kaneku H et al.,2013*) L'arrêt de l'immunosuppression après perte de fonction du greffon et la transplantectomie sont également des facteurs de risques reconnus. (*Augustine JJ et al.,2007*)

VI. Physiopathologie

Depuis le succès de la première transplantation rénale en 1954, la transplantation est apparue comme étant la meilleure option thérapeutique de l'insuffisance rénale chronique terminale.

Cependant, le donneur étant de la même espèce mais génétiquement différent, le receveur par son système immunitaire adaptatif est capable de reconnaître les allo-antigènes présents sur le greffon du donneur.

Les principaux allo-antigènes en transplantations d'organes sont les antigènes des groupes sanguins ABO et des molécules HLA.

La réponse immunitaire développée contre ces allo-antigènes conduit la destruction de l'organe transplanté selon un processus dit de « rejet » qui reste de nos jours la première cause de perte de greffon.

Plusieurs types de rejets sont décrits :

Rejet hyper-aigu (qui survient dans les minutes ou heures après la revascularisation du greffon), rejet aigu (qui est mis en évidence dans les 3 mois postgreffe) et rejet chronique (qui se manifeste plusieurs mois ou années post-greffe).

Chaque type de rejet a un mécanisme physiopathologie différent mais pour chacun d'entre eux, le point de départ est un mécanisme d'allo-reconnaissance que nous allons détailler ci-dessous. Trois mécanismes d'allo-reconnaissance sont décrits

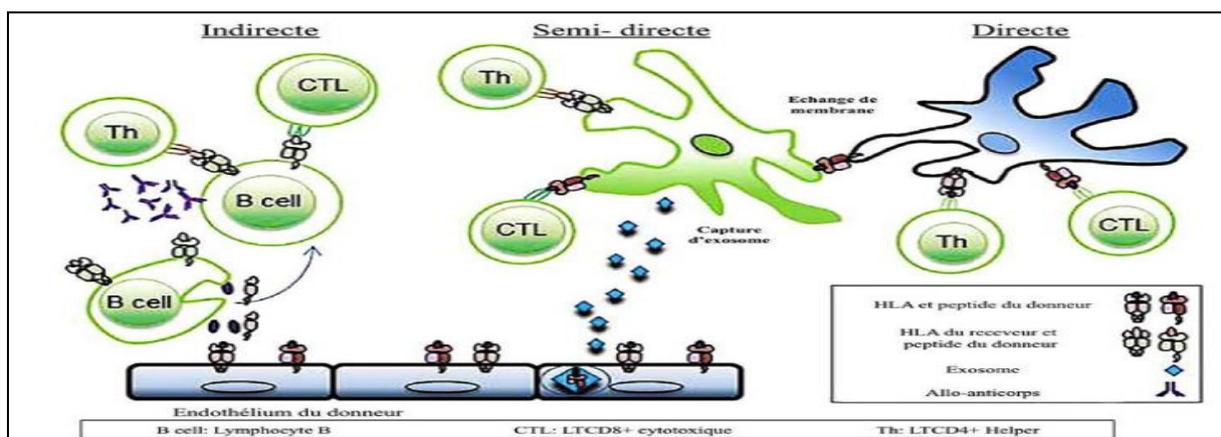


Figure 10: Trois modes de présentation antigénique (les cellules bleues appartiennent au donneur et les cellules vertes au receveur).

1.1. Mécanisme d'allo-réactivité indirecte :

Où les protéines allogéniques du donneur sont internalisées, apprêtées par les cellules présentatrices de l'antigène (**CPA**) du receveur et reconnus par les lymphocytes T du receveur.

En effet, les **CPA** des receveurs attirés par le microenvironnement inflammatoire dû à la transplantation capturent les débris tissulaires et migrent vers les ganglions drainant le greffon.

Aussi, des molécules solubles du donneur peuvent être transportées par voie sanguine vers les ganglions et présentés par les **CPA** du receveur.

Ce mécanisme de reconnaissance correspond à une réponse immunitaire habituelle en cas par exemple d'infection.

Le nombre de lymphocytes alloréactifs activés par ce mécanisme d'allo-réactivité indirecte se rapproche de celui observé pour un antigène étranger quelconque.

Pour rappel, alors que les lymphocytes B reconnaissent l'antigène natif par leur **BCR** (B Cell Receptor, constituée d'une immunoglobuline de surface), les lymphocytes T **CD4+** et **CD8+** reconnaissent via leur **TCR** uniquement les antigènes présentés par les molécules HLA de classe II et de classe I respectivement. Le mécanisme d'apprêtement du peptide au sein de la molécule (LA diffère selon la nature de l'antigène (endogène ou exogène à la cellule).

Les allo-antigènes rencontrés étant exogènes, ce sont essentiellement les molécules de CMH de classe II et les lymphocytes **T CD4+** qui sont impliquées

1.2. Mécanisme d'allo-réactivité directe :

Où les lymphocytes T du receveur dits « alloréactifs » sont capables de reconnaître directement les molécules HLA du donneur exprimées à la surface des **CPA** contenues dans le greffon.

Entre 5 et 10% du répertoire des lymphocytes **T** d'un individu est alloréactif vis-à-vis des molécules HLA d'un donneur présentant des molécules HLA différentes.

Ceci est expliqué par le fait que les complexes (molécule HLA du receveur – peptide étranger) reconnus par les **TCR** des lymphocytes **T** (éduqués dans le thymus) présentent un mimétisme avec les complexes (molécules HLA du donneur – peptide donneur ou receveur). Les cellules dendritiques immatures du donneur contenues dans le rein transplanté vont être sensibles à l'environnement inflammatoire engendré par la transplantectomie et la conservation extra corporelle du greffon et vont ainsi mûrir.

Une augmentation de l'expression de **CCR7** et des molécules d'adhésion sur les cellules dendritiques vont provoquer leur migration dans les ganglions lymphatiques du receveur drainant le greffon où elles vont devenir matures et être capables d'activer les lymphocytes T alloréactifs du receveur.

1.3. Mécanisme d'allo-réactivité semi-directe :

Où les cellules dendritiques du receveur « capteraient » des complexes (molécules HLA classe I du donneur – peptide donneur) par un mécanisme faisant intervenir des exosomes⁷ et pourraient ainsi présenter directement les molécules HLA classe I du donneur aux lymphocytes T alloréactifs.

Pour rappel, l'activation des lymphocytes nécessite plusieurs signaux d'activation dont le premier est l'interaction entre les molécules **HLA** et les récepteurs **TCR** des lymphocytes T (T-cellreceptor) décrit ci-dessus.

Ce signal sera suivi d'un signal de costimulation grâce l'interaction de co-récepteurs au sein d'une synapse immunologique

Cela conduira à l'activation de voies intracellulaires et à des facteurs de transcription aboutissant à la synthèse de cytokines activatrices de façon autocrine comme l'interleukine 2 (IL-2).

La réponse immunitaire est alors dirigée par les lymphocytes T auxiliaires **CD4+** via la sécrétion de cytokines, permettant de réguler différentes cellules effectrices et d'orienter la réaction immunitaire vers une voie cellulaire et/ou humorale.

Les lésions de type cellulaires sont induites par les lymphocytes **T CD8+** cytotoxiques spécifiques du donneur qui après reconnaissance des molécules HLA de classe I exprimées par les cellules du donneur vont conduire à la rupture de la membrane cellulaire ciblée et l'apoptose de la cellule par la sécrétion perforines/granzymes ou par action du système Fas/Fas-ligand.

Les **T** auxiliaires **CD4+** peuvent également, par la sécrétion d'interféron gamma (**IFN-γ**) activer de façon non spécifique des cellules **NK** et des macrophages capables d'induire des dommages tissulaires de façon non spécifique.

Les lésions de type humorales sont secondaires à la sécrétion d'anticorps de type **IgG** de haute affinité pour les antigènes du greffon (Donor Specific Antibody, **DSA**) par les plasmocytes de courte et/ou longue durée .

Après reconnaissance et liaison aux molécules HLA présentes à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux de l'organe transplanté, les immunoglobulines fixées peuvent

- activer la voie classique du complément et conduire la formation d'un complexe d'attaque membranaire **MAC** menant l'apoptose de la cellule ciblée,
- entraîne l'**ADCC** (Antibodydependent cellular cytotoxicity) : les cellules **NK**, monocytes et polynucléaires neutrophiles possèdent des récepteurs au fragment constant des immunoglobulines et vont pouvoir lyser directement les cellules spécifiquement reconnues.

Chapitre2 : Le rejet de greffe

I. Les principaux acteurs intervenant dans le rejet de greffe

- _ Les cellules : les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques(CD), les monocytes/macrophages, les cellules Natural Killer (NK) essentiellement ;
- _ **Les Ag cibles**, c'est-à-dire les molécules du greffon qui vont être reconnues par le système immunitaire de l'hôte. Il s'agit :
 - _ **Des Ag érythrocytaires ABO** qui sont exprimés sur les cellules endothéliales vasculaires du greffon et qui peuvent être attaqués par les Ac naturels anti-A et anti-B du receveur,
 - _ **Des Ag HLA d'histocompatibilité de classe I et de classe II**, principales cibles sur le greffon, sont caractérisées par un très grand polymorphisme,
 - _ **Des Ag MHC class I polypeptide-related séquences A et B** (MICA et MICB) exprimés par les cellules endothéliales, les monocytes, les fibroblastes de la peau, les kératinocytes et les cellules épithéliales intestinales. Ils sont impliqués dans le rejet de greffe rénale mais leur rôle exact n'est pas définitivement établi. (Mizutani K et al.,2005)
 - _ **D'autres antigènes cibles**, comme le récepteur de type I de l'angiotensine II, le collagène et la percalan (Joosten SA et al.,2002) ont été impliqués dans le rejet ;
 - _ **Les anticorps dirigés contre les Ag du greffon** participent également à sa destruction. Il peut s'agir d'Ac pré existants chez le receveur qui apparaissent après un événement immunisant (grossesse, transfusion, transplantation) ou d'Ac secrétés par les plasmocytes après la cascade d'événements initiée par la reconnaissance des Ag du donneur.

La séquence des événements conduisant au rejet de greffe allogénique est complexe et utilise les composants de l'immunité innée et adaptative(Fig15). (Porrett PM et al.,2018)

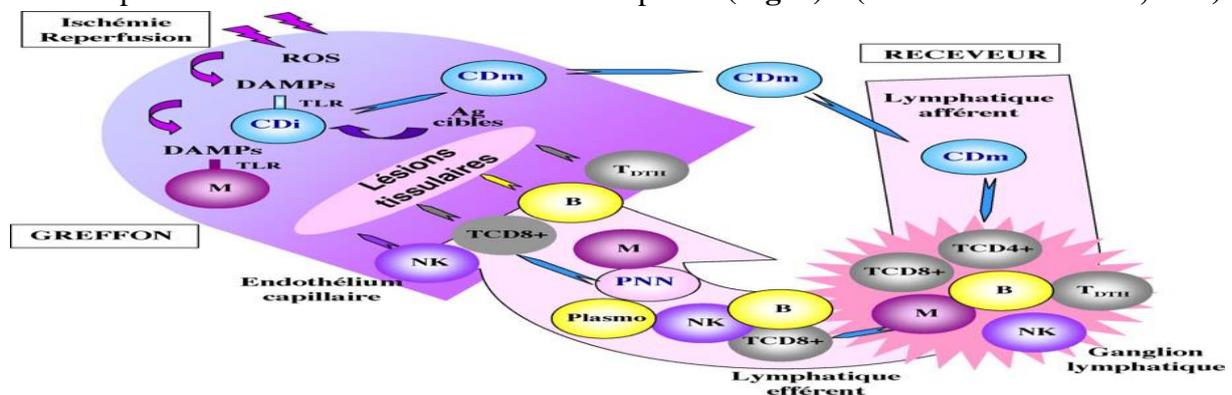


Figure 11:L'ischémie et la réperfusion du rein génèrent des dérivés de l'oxygène.

1. Immunité innée

La contribution de l'immunité innée dans le rejet d'allogreffe a été suspectée des 1994 puis confirmée plus tard par de nombreux travaux. (Land WG.,2007)

L'ischémie et la réperfusion du rein génèrent des dérivées de l'oxygène (O₂ , H₂O₂, OH_·) appelées ROS qui réalisent une véritable attaque oxydative (Fig. 15). Cette attaque aboutit à la nécrose, l'apoptose cellulaire et à la libération de molécules appelées Damage Associated molecular pattern (DAMPs) comme les protéines High Mobility Group Box 1 (HMGB1) et HeatShockProtein (HSP).(Lolme`de K.,2009)

Les DAMPs sont les ligands des récepteurs de l'immunité innée : les TLR. Ils sont exprimés dans le rein par les cellules dendritiques, les cellules endothéliales vasculaires, les monocytes, les cellules tubulaires épithéliales et les cellules mésangiales . Les TLR jouent un rôle important dans l'initiation du rejet d'allogreffe .(**Lolme`de K.,2009**)

Les cellules dendritiques immatures du greffon vont reconnaître les DAMPs par l'intermédiaire de leur **TLR** et devenir matures. Elles expriment alors les molécules HLA de classe II, les molécules de costimulation, comme B7-1 (**CD80**) et B7-2 (**CD86**) et vont sécréter des cytokines. Par ailleurs, l'activation des **TLR** sur les cellules endothéliales vasculaires augmente l'expression des chimiokines, des sélectines et donc l'infiltration par les leucocytes, créant ainsi un environnement inflammatoire dans le parenchyme du greffon.

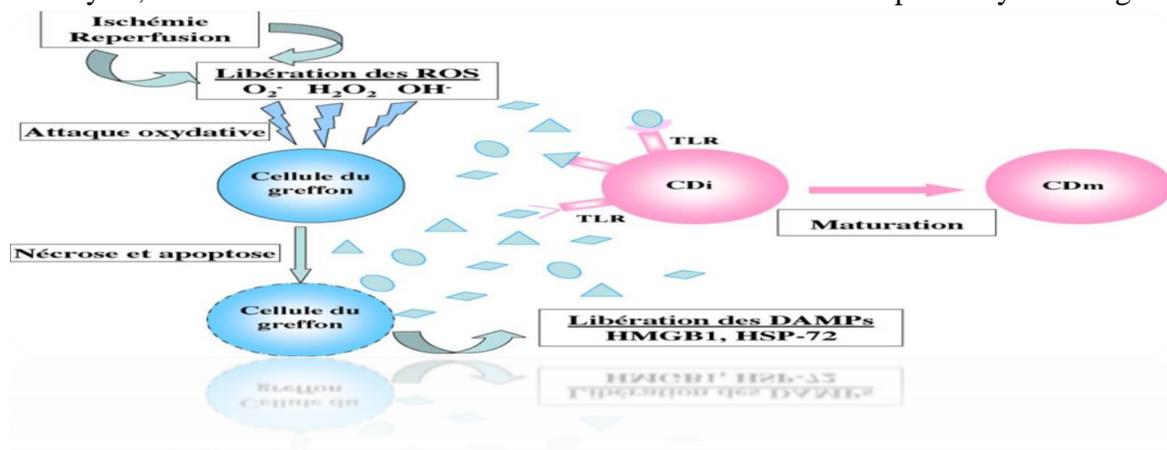


Figure 12: Les lésions engendrées lors de l'ischémie et de la réperfusion du rein initient les mécanismes de l'immunité innée. (Porrett PM.,2018)

Ces lésions induisent rapidement la libération de dérivés de l'oxygène (O_2^- , H_2O_2 , OH^- ou **ROS**) qui réalisent une véritable attaque oxydative des cellules du greffon. Progressivement, cette attaque aboutit à la nécrose, l'apoptose cellulaire et à la libération de molécules **DAMPs**, comme les protéines (**HMGB1**) et (**HSP**). Les **DAMPs** sont les ligands des récepteurs de l'immunité innée, les **TLR** qui sont exprimés dans le rein par plusieurs cellules dont les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures du greffon vont donc reconnaître les DAMPs par l'intermédiaire de leur **TLR** et devenir matures. Ces cellules activées migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur pour présenter les alloantigènes du donneur aux lymphocytes T du receveur. **ROS**, O_2^- , H_2O_2 , OH^- , **DAMPs**, **HMGB1**, **HSP**, **TLR**, **CDi**, **CDm**.

2. Immunité adaptative

Elle prend le relais de l'immunité innée et intervient dans la reconnaissance de l'**Ag**, l'activation des lymphocytes **T**, l'infiltration du greffon et l'agression des cellules parenchymateuses et cytotoxique, surtout dans la phase précoce qui suit la transplantation. Progressivement, les cellules dendritiques du receveur colonisent le greffon et remplacent celles du donneur.

Elles captent localement les alloantigènes (majeurs ou mineurs) du donneur et les apprêtent.

A leur tour, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les peptides issus du donneur, par l'intermédiaire des molécules HLA de classe II du receveur, suivant les règles de restriction conventionnelles. C'est la présentation indirecte qui progressivement remplace la présentation directe. (Go'kmen MR et al., 2008)

2.1. Reconnaissance allogénique

La réaction immunologique de rejet est liée à la reconnaissance d'Ag étrangers par le receveur. Trois voies de reconnaissance sont actuellement connues

2.2. Activation des lymphocytes T CD4+

C'est au niveau des ganglions que les cellules dendritiques rencontrent les lymphocytes T CD4+ et leur présentent les antigènes cibles. L'activation de ces lymphocytes conduit à leur prolifération clonale et à la synthèse de cytokines qui agissent directement ou indirectement sur les cellules effectrices (lymphocytes B, lymphocytes T CD8+, macrophages, cellules NK...) intervenant dans la destruction du tissu cible.

2.3. Infiltration du greffon par les cellules activées

Les cellules activées migrent par voie sanguine des ganglions vers le greffon, traversent la barrière endothéliale et infiltrent le greffon. Les interactions entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire se font grâce aux chimiokines et aux molécules d'adhésion cellulaire, les molécules d'adhésion (CAM). Les chimiokines, (synthétisées par l'endothélium vasculaire et par les lymphocytes) attirent et activent les lymphocytes. Les CAM (portée sa la fois par les lymphocytes et les cellules endothéliales) permettent l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium vasculaire.

Elles sont regroupées en quatre familles : les sélectines (L, E et P), les intégrines (ex. : LFA-1) et leurs ligands respectifs, à savoir les mucine-like (ex. : CD34) et les molécules de la superfamille des immunoglobulines (ICAM).

L'infiltration se fait selon une cascade de réactions en quatre étapes : le roulement, l'activation, l'adhésion forte et la migration trans endothéliale : Le roulement
L'activation L'adhésion forte La migration trans endothéliale.

1.4. Agression du parenchyme

Plusieurs mécanismes immunologiques (à médiation cellulaire et/ou humorale) et inflammatoires sont impliqués dans la destruction du greffon. Cependant, de nombreuses questions restent posées, en particulier la part respective des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques des alloantigènes du greffon (environ 1 % des cellules de l'infiltrat) et le reste de l'infiltrat (lymphocytes TH, cellules NK, lymphocytes B, monocytes/macrophages, éosinophiles). Les principaux mécanismes de lésion tissulaire sont décrits ci-après.

1.4.1. La réaction médiée par les lymphocytes T CD8+

L'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) est similaire à celle des T CD4+ et utilise les mêmes signaux. Elle peut se faire de façon directe par la cellule cible ou

indirecte par l'intermédiaire des lymphocytes T CD4+ actives. La destruction des cellules parenchymateuses médiée par les CTL se fait par au moins deux mécanismes complémentaires :

_ L'un impliquant la libération de granules cytoplasmiques, les perforines (protéines capables de former des pores) et les granzymes (enzymes protéolytiques) dans l'espace de jonction intercellulaire. Les perforines se fixent sur la membrane de la cellule cible pour former un pore membranaire. Les granzymes pénètrent dans la cellule cible via ce pore et induisent une fragmentation de l'ADN,

_ L'autre impliquant la liaison de la protéine Fas de la cellule cible avec son ligand Fas L situé sur le lymphocyte T CD8+. Cette liaison entraîne un signal de mort cellulaire.

Les deux mécanismes passent par l'activation de la voie des caspases (enzymes protéolytiques) et se terminent par la mort de la cellule cible par apoptose.

1.4.2. L'hypersensibilité retardée (DTH : delayed type hypersensitivity).

C'est une réaction inflammatoire localisée induite par des cytokines produites par certaines sous-populations de lymphocytes T, les TDTH actives par les T CD4+. Ces cytokines sont responsables du recrutement et de l'activation des macrophages en cellules plus destructrices. Certaines cytokines, comme le TNF β , ont un effet cytotoxique direct sur les cellules du greffon.

1.4.3. La réaction médiée par des lymphocytes B.

Les lymphocytes B participent également à la destruction des cellules parenchymateuses. Après leur activation, ils se différencient en plasmocytes producteurs d'Ac. La fixation des Ac sur l'endothélium vasculaire du greffon active la cascade du complément (voie classique) aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire susceptible d'endommager l'endothélium.

1.4.4. L'Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).

Certaines cellules à potentiel cytotoxique (cellules NK, macrophages) possèdent un récepteur du fragment Fc des IgG qui leur permet de capter les complexes IgG-cellule cible. La libération d'enzymes lytiques au niveau des zones de contact induit une lésion de la cellule cible.

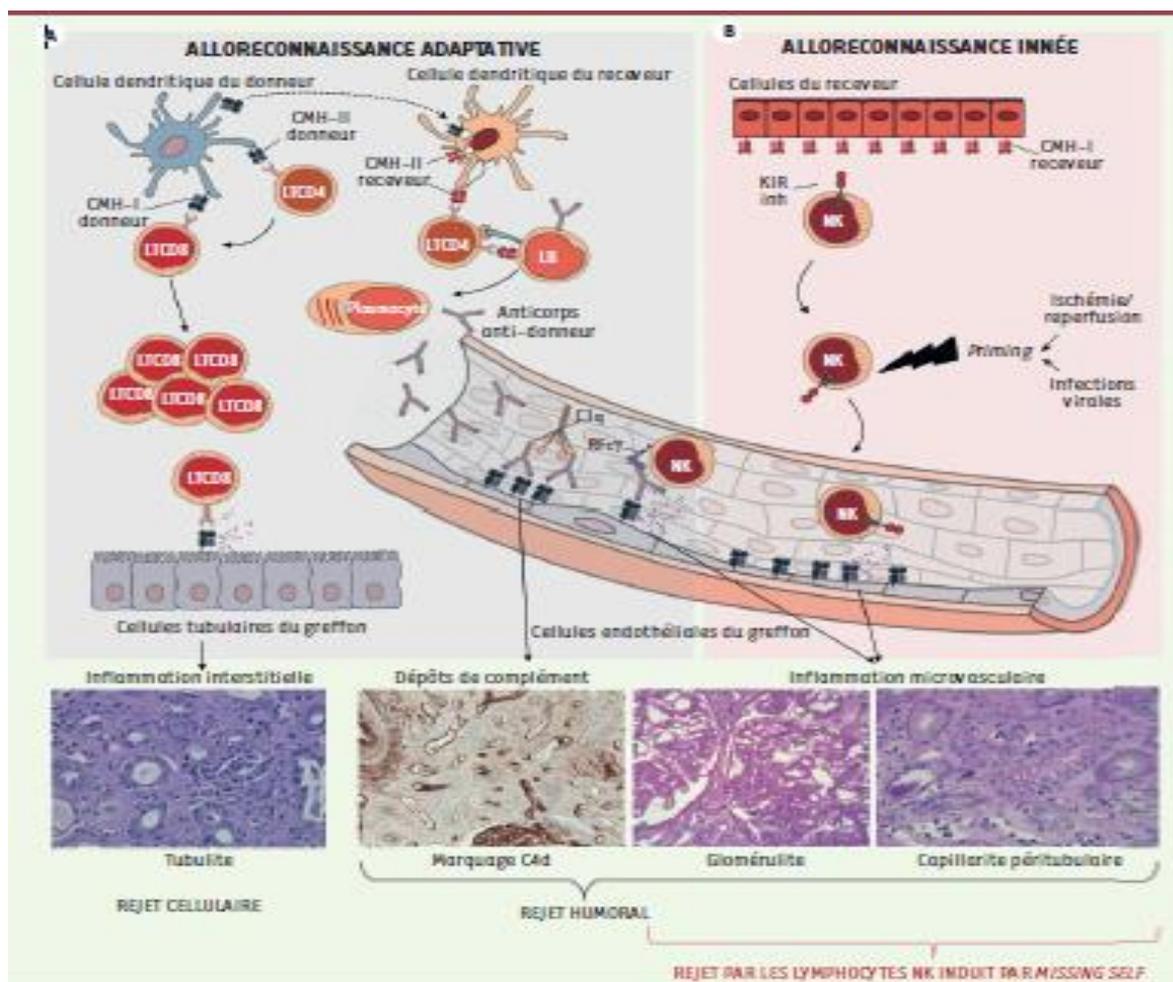


Figure13 : Physiopathologie des rejets de greffe « adaptatifs » et du rejet « inné » induit par le missing self, dans le cas d’une transplantation rénale.(Koenig A et al.,2019)

II. Pathogénicité des anticorps anti-HLA :

A l’interface entre le greffon et la circulation sanguine du receveur, l’endothélium vasculaire constitue la cible privilégiée des **DSA**. Il exprime en effet fortement les antigènes HLA de classe I et il est capable, en situation inflammatoire, de surexprimer les antigènes HLA de classe II.

Historiquement, la pathogénicité des **DSA** était exclusivement rattachée à l’activation de la voie classique du complément, initiée par la fixation du **C1q** au fragment **Fc** des **DSA**.

Il en résulte, d’une part, la formation du complexe d’attaque membranaire pouvant être responsable d’une lyse de la cellule endothéliale, mais surtout la libération d’anaphylatoxines (**C3a** et **C5a**) entraînant la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires.

En transplantation rénale, le rejet humoral hyper-aigu, caractérisé par une thrombose quasi-immédiate du greffon en représentait la forme typique avant sa disparition secondaire à la systématisation de l’utilisation du crossmatch pré-opératoire.(Cid J, Carbassé G et al.,2014)

En parallèle, le rejet humoral aigu a longtemps été défini par la mise en évidence de dépôts de C4d dans les capillaires péri-tubulaires, signant la preuve d'une activation du système du complément, associés à des lésions de la microcirculation. (Murata K., 2009)

Cependant, d'autres voies de pathogénicité des DSA ont été mises en évidence progressivement, aboutissant à la reconnaissance dans la classification de Banff de rejets humoraux C4d négatif (**Figure 17**). (Haas M et al., 2018)

Le second mécanisme impliqué semble être l'activation de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (**ADCC**), secondaire à la reconnaissance du fragment Fc des DSA par le **FcγR** (récepteur du fragment Fc des immunoglobulines G (**IgG**)) situé sur les monocytes/macrophages et les cellules **NK**.

Dans un modèle de souris déficiente en complément, Hirohashi et al. a mis en évidence la survenue d'un rejet vasculaire médié par des **anticorps anti-HLA** avec apparition d'un infiltrat cellulaire riche en cellules **NK** et en **macrophages**. (Hirohashi T et al., 2010)

Les analyses transcriptomiques réalisées sur les biopsies de greffon rénal ont confirmé ces données et placent même aujourd'hui les cellules **NK** comme un acteur central dans la survenue des rejets humoraux. (**Halloran PF et al., 2018**) (**Yazdani S et al., 2019**)

Leur activation induit, d'une part, la sécrétion de chimiokines inflammatoires recrutant de nouvelles cellules immunitaires et, d'autre part, la libération de granules toxiques (perforine, granzyme) endommageant les cellules endothéliales. (**Loupy A et al., 2018**)

Enfin, l'activation directe des cellules endothéliales par les **DSA** constitue le troisième mécanisme de pathogénicité.

De nombreuses études réalisées *in vitro* ont démontré que la fixation des **DSA** sur leur surface entraînait le déclenchement de nombreuses voies de signalisations intracellulaires (**Akt**, **mTOR**, **ERK**, etc.) aboutissant à une prolifération endothéliale.

L'implication active des cellules endothéliales a également été confirmée en transcriptomique.

L'épaississement intimal est d'ailleurs aujourd'hui intégré dans la classification de Banff comme un élément diagnostique du rejet humoral chronique. (**Haas M et al., 2018**)

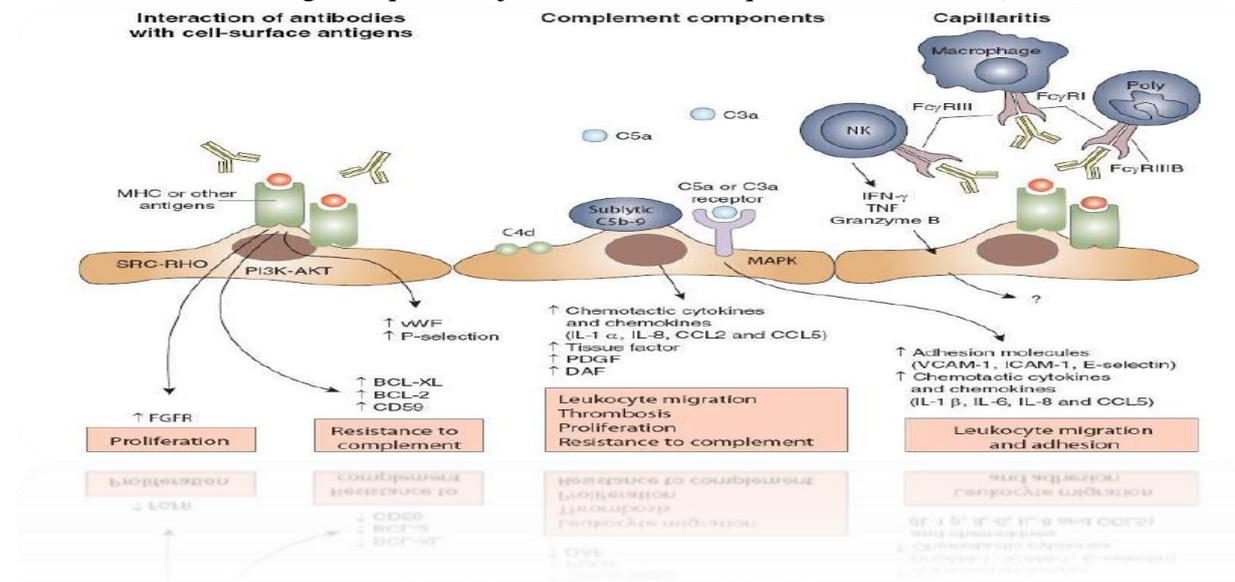


Figure 14 : Mécanismes d'agression du greffon par les anticorps anti-HLA. (**Djamali et al., 2014**)

III. Anticorps anti-HLA après transplantation rénale :

1. Rejet aigu :

Pendant longtemps, l'immunologie du rejet est demeurée l'objet d'une dichotomie claire : d'une part, la réaction immune humorale responsable de rejets hyperaigus ou de rejets hyperaigus retardés, formes particulièrement sévères mais rares ; d'autre part, la réaction immune cellulaire responsable des rejets interstitiels, dits cellulaires, les plus fréquents. **(Feucht HE et al.,1993)**

Classiquement, l'étude des fragments histologiques en immunofluorescence ou en immunohistochimie ne permet pas, au cours du rejet aigu, de mettre en évidence des dépôts d'immunoglobulines et de complément.

Toutefois, cela n'exclut pas l'existence d'une réaction humorale. En effet, lors de la fixation de l'Ac sur les cellules endothéliales, celles-ci peuvent soit desquamer dans la circulation, soit mettre en oeuvre certains mécanismes de défense tels que l'internalisation du complexe **Ag-Ac** ou le relargage de ce complexe dans la circulation.

La présence, à la surface de l'endothélium, de fragment **C4d** du complément serait alors le seul marqueur de cette réaction humorale. Le **C4d** est un fragment de dégradation de la fraction **C4b** du complément, qui présente la particularité de se lier de façon stable aux membranes cellulaires, devenant ainsi un bon témoin d'une activation locale du complément. La présence de dépôts de **C4d** en immunofluorescence dans les capillaires péri-tubulaires semble relativement fréquente puisqu'elle peut atteindre 30 % des biopsies de rejets aigus. **(Mauiyyedi S et al.,2002)**

Ces dépôts sont très fréquemment associés à des **Ac** circulants dirigés contre le donneur. **(Lederer SR.,2001)**

De plus, la sensibilité élevée des nouvelles techniques de recherche d'Ac permet de détecter des Ac dirigés contre le donneur dans les suites récentes d'une transplantation rénale, notamment au décours d'épisodes de rejet aigu. **(Piazza A.,2001)**

La détection de tels Ac serait associée à une augmentation de fréquence des rejets aigus **[84][83]** et à un moins bon devenir des greffons. **(Barry M.,2002)**

À ces arguments s'ajoutent les données récentes, obtenues sur les puces **ADN**, montrant l'expression importante de marqueurs moléculaires des **Ly B** au cours du rejet aigu. **(Sarwal M.,2003)**

Au cours de ces dernières années est donc apparue la signature d'une participation humorale au rejet aigu associant **Ac** circulants dirigés contre le donneur et dépôts de **C4d** en immuno-histochimie.

Critères diagnostiques du rejet aigu humoral. **(Racusen LC et al.,2003)**

Lésions tissulaires aiguës

a. Atteinte tubulaire aiguë

b. Présence de neutrophiles et/ou cellules mononuclées dans les capillaires péri-tubulaires et/ou dans les glomérules, et/ou thromboses capillaires

c. Artériolite intinale, nécrose fibrinoïde, inflammation intramurale ou transmurale dans les parois artérielles (Stigmates immuno-pathologiques d'une activité humorale

a. Présence de **C4d** et/ou d'**immunoglobulines** dans les capillaires péri-tubulaires

b. Présence d'immunoglobulines et de complément dans la nécrose fibrinoïde des artères)
Présence d'Ac dirigés contre les **Ag HLA** du donneur ou contre les Ag endothéliaux du donneur.

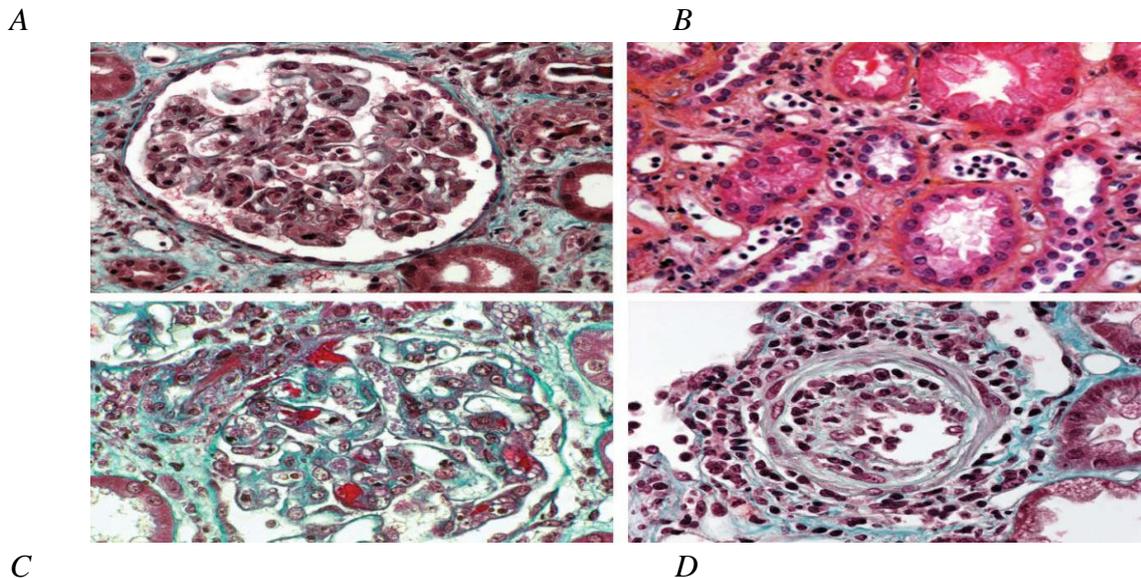


Figure 15 : Rejet humoral aigu rénal.

1.1. Le rejet médié par des lymphocytes T :

Le rejet médié par des **lymphocytes T**, nommé dans le pratique courant rejet cellulaire, est défini par l'accumulation de cellules mononucléaires, incluant des cellules **CD4+** et **CD8+**, dans l'interstitium du parenchyme rénal.

Dans le greffon sujet à un rejet aigu cellulaire, les **lymphocytes T** infiltrent l'interstitium et y prolifèrent (**Figure B**), d'où ils envahissent les tubules rénaux, provoquant les lésions de tubulite (**Figure C**). Classiquement, ce type de rejet répond au traitement par corticoïdes.

Les cellules T agressent le greffon directement par contact avec les cellules épithéliales tubulaires (cytotoxicité à médiation cellulaire) et à travers les effets locaux des cytokines libérées (**Figure A**).

Elles ont aussi une capacité d'agression indirecte par l'activation des cellules endothéliales. Les cellules **CD8+** qui ont une spécificité immunologique pour le greffon envahissent le parenchyme rénal, traversent la membrane basale des tubes et induisent leur apoptose. Elles libèrent des perforines et des granzymes **A** et **B** qui pénètrent dans les cellules et induisent l'apoptose médié par les caspases.

L'activation des récepteurs membranaires (**FAS** ou le **récepteur de TNF- α**) par l'interaction entre leur ligand (**FAS-L** ou **TNF- α**) et les cellules T entraîne l'oligomérisation du récepteur et induit ainsi le contact des protéines intracellulaires associées telles que les procaspases, ce qui déclenche l'apoptose de la cellule. (**Barry M et al.,2002**)

Les cellules **CD4+** peuvent aussi attaquer les cellules du greffon qui expriment les antigènes mineurs du **CMH[87]** et sécréter les **TNF- α** et **- β** , qui provoquent aussi l'apoptose en se fixant sur leurs récepteurs des cellules endothéliales et tubulaires.

Dans les modèles animaux, le blocage du **TNF** par un anticorps ou par des gènes knock-out des récepteurs du **TNF** prolonge la survie de l'allogreffe. (**Imagawa DK et al.,1991**)

De plus, les cytokines inflammatoires produites par les cellules T situées dans l'interstitium activent des cellules épithéliales tubulaires, qui à leur tour attirent plus de **lymphocytes T** en sécrétant des chimiokines (**CCL2, CCL5, CX3CL1**). (**Robertson H et al.,2003**)

Les cellules tubulaires ainsi agressées peuvent aussi transformer leur phénotype épithélial natif en myofibroblastes mésenchymateux et participer à la progression de la fibrose interstitielle. (**Kalluri R.,2009**)

La nécrose des cellules épithéliales tubulaires conduit à la dysfonction du greffon et à l'atrophie progressive des tubes rénaux qui accompagnent la progression de la fibrose interstitielle.

L'inflammation interstitielle et les lésions de tubulite sont gradées selon leur intensité par la classification de Banff de 0 à 3, permettant d'identifier 3 types histologiques de rejet médié par les lymphocytes T.

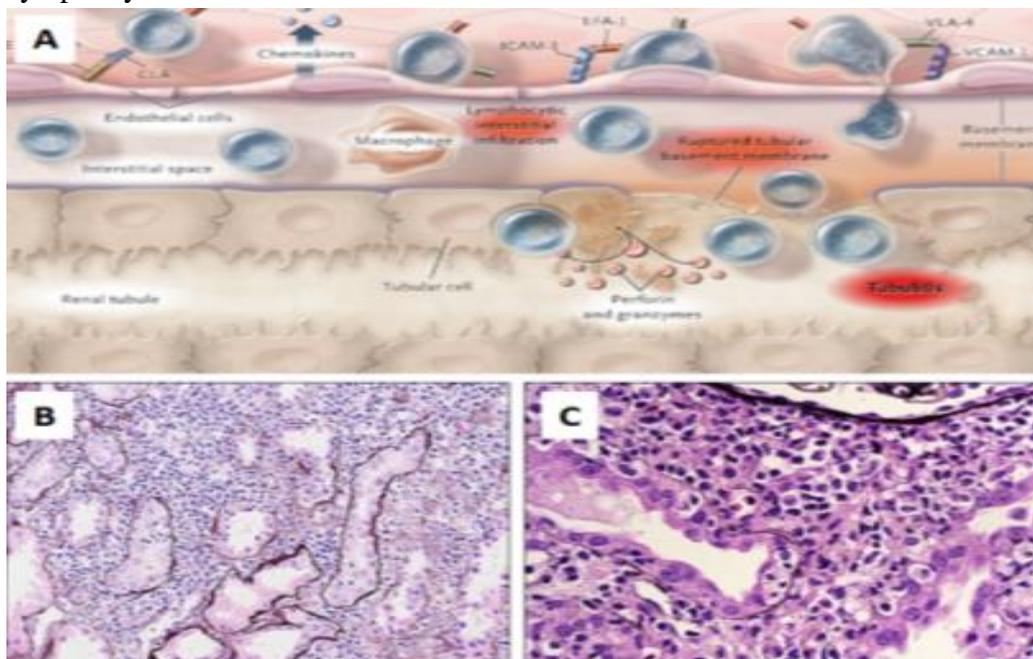


Figure 20 : Rejet aigu cellulaire.

1.2. Le rejet médié par anticorps :

Les anticorps capables d'induire un rejet sont nombreux : ceux dirigés contre les molécules HLA, contre des antigènes endothéliaux ou contre des antigènes de groupe sanguin ABO.

Néanmoins, les rejets dus aux anticorps anti-HLA représentent de loin la situation la plus fréquente et la plus redoutée en pratique courante. Le concept de médiation humorale a beaucoup évolué ces dernières années.

Cette évolution est reflétée par les mises à jour successives de la classification de Banff depuis 1991.

Comme dans le cas du rejet hyperaigu historique, les allo-anticorps, préformés ou apparaissant de novo au décours de la transplantation, se fixent à la surface des cellules endothéliales et activent la voie classique du complément.

Le processus, quoique similaire à celui des rejets hyperaigus, est toutefois moins violent, ce qui permet aux mécanismes de défense des cellules endothéliales d'être mis en jeu.

Ces mécanismes dépendent de protéines membranaires agissant comme cofacteurs du facteur I pour dégrader le C3b et C4b (la protéine cofacteur de membrane MCP ou CD46) ou comme accélérateur de la dissociation des C3 et C5 convertases (le récepteur du complément CR1 et le facteur d'accélération de dissociation DAF). Comme la dégradation du C4b conduit à la génération de C4d se liant de manière covalente à la membrane cellulaire endothéliale, le marquage C4d a été proposé pour diagnostiquer les rejets humoraux (**Figure A et B**). (Feucht H.,1993)

En mettant en évidence la fixation covalente de la fraction C4d du complément à l'endothélium des capillaires péri-tubulaires du greffon, ce marquage a eu un rôle essentiel dans l'évolution du concept de médiation humorale. Il a permis, par des études d'association, de définir le phénotype particulier du rejet médié par anticorps, dominé par la présence de signes d'inflammation au niveau de la microcirculation (infiltration par des neutrophiles et des monocytes/macrophages des glomérules et/ou des capillaires péri-tubulaires) (**Figure C et D**). (Colvin RB et al.,2005)

Aujourd'hui, le rejet médié par anticorps s'est imposé comme une entité distincte dans la classification de Banff 21, bien définie selon des critères

- cliniques : dysfonction du greffon ; histologiques : mis en évidence par l'analyse des biopsies du greffon d'une infiltration par des neutrophiles et des monocytes/macrophages des glomérules et/ou des capillaires péri-tubulaires, nécrose artérielle fibrineuse, thrombose des artérioles et/ou des capillaires ;

- immunohistologiques : positivité du marquage C4d dans les capillaires péri-tubulaires ;

- immunologiques : présence dans le sérum d'un anticorps circulant de type DSA

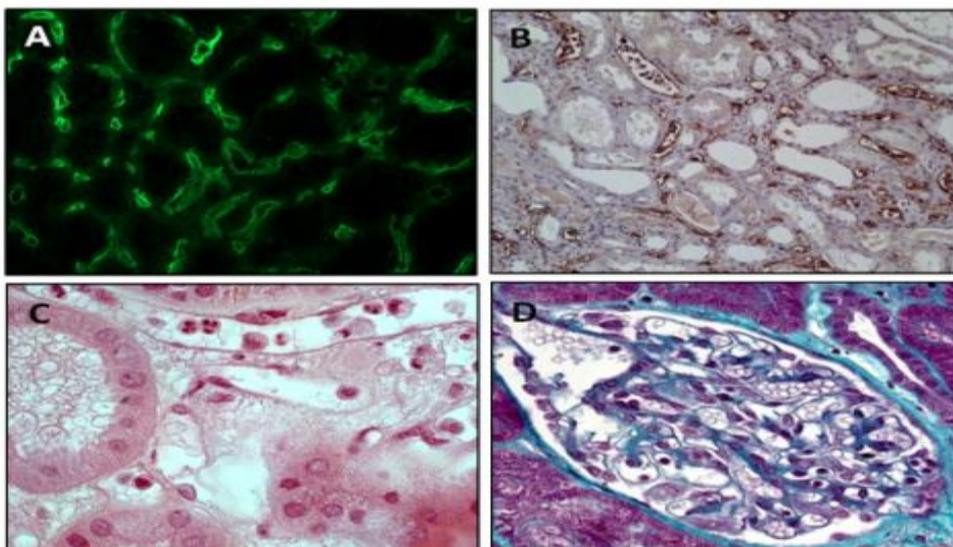


Figure 17: Rejet aiguë médié par anticorps.

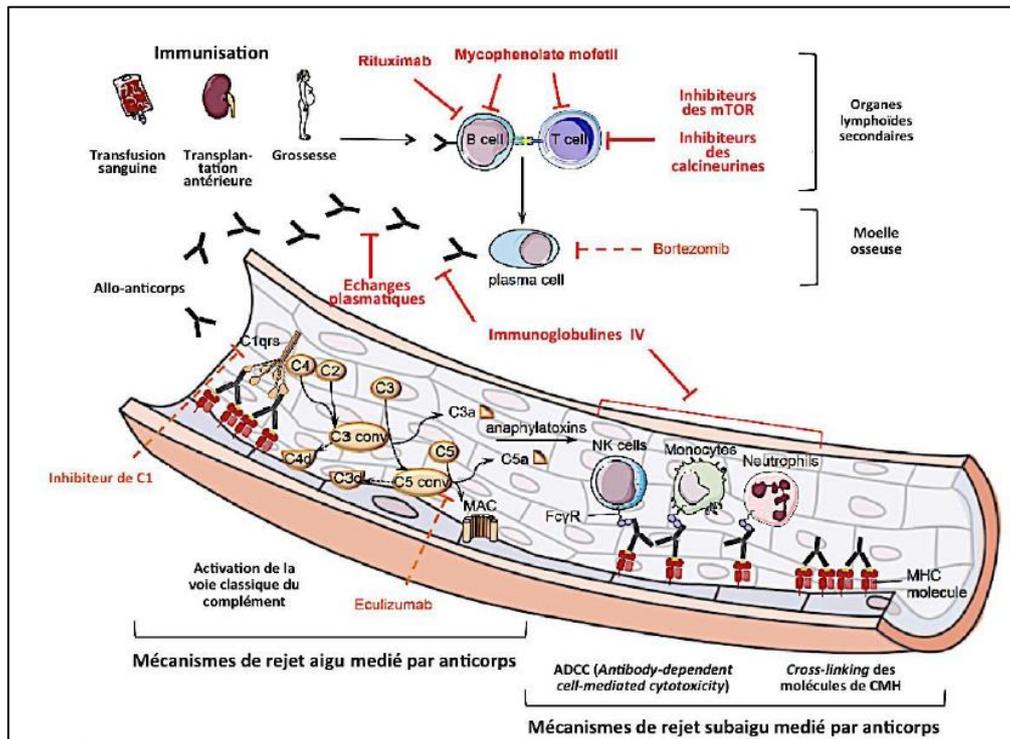


Figure 18 : schéma adapté des mécanismes lésionnels de rejet médium par les anticorps. (Pouliquen E et al., 2015)

2. Rejet chronique :

Le rôle de l'immunité humorale dans le rejet chronique est suspecté depuis de nombreuses années. Pour certains auteurs, des Ac dirigés contre le donneur peuvent être retrouvés chez près de 90 % des patients ayant rejeté un rein. (El-Awar N et al., 2002)

Il est parfois possible d'éluer des Ac à partir de greffons rejetés. (Lee PC., 2002)

Néanmoins, la responsabilité des Ac anti-HLA détectés dans la pathogénie du rejet chronique ne pouvait être affirmée de façon certaine. De nouveaux arguments viennent plaider pour une implication de l'immunité humorale dans le développement du rejet chronique.

D'une part, il semble que des Ac dirigés contre le donneur puissent être détectés de façon précoce, avant le développement du rejet chronique. (Lee PC., 2002)

D'autre part, des dépôts de **C4d** seraient présents sur 60 % des biopsies de rejet chronique et sur seulement 2 % des biopsies contrôles, la présence de **C4d** étant associée dans 88 % des cas avec l'existence d'Ac circulants dirigés contre le donneur. (Mauiyyedi S., 2002)

Sans éliminer un rôle possible de l'immunité cellulaire, les Ac anti-HLA pourraient participer au mécanisme d'agression/régénération des cellules endothéliales, mécanisme qui serait responsable de l'aspect feuilleté de la membrane basale tubulaire caractéristique du rejet chronique. (Shimizu A et al., 2000)



PARTIE PRATIQUE

Chapitre 1:

MATIEL ET METHODES

Notre travail a été réalisé au niveau de l'unité d'immunologie Hassiba Ben Bouali du service CHU de Blida.

I. Objectif :

Notre objectif est d'expliquer les résultats de la prise en charge immunologique des patients candidats à une transplantation rénale et d'étudier l'histocompatibilité des gènes HLA dans le greffe au sein d'un groupe d'individus issus de la population Algérienne.

II. Description de l'étude :

Il s'agit d'une étude descriptive de type série de cas rétrospective, réalisée au niveau de l'unité d'immunologie Unité-Hospitalo-universitaire Hassiba Ben Bouali du CHU de Blida Vos patients sont 460 sujets Algériens recrutés dans le cadre d'un bilan d'histocompatibilité HLA prescrit pour la transplantation rénale à partir d'un donneur vivants apparenté.

III. Matériel et méthodes :

I. Matériel :

1. Matériel biologiques :

a)- La population étudiée :

Notre étude a intéressé 359 individus Algériens, réparties entre donneurs et receveurs, recrutés sur une période de 6ans, allant du 2006 au 2012.

d'étudier l'histocompatibilité des gènes HLA dans la greffe au sein d'un groupe d'individus issus de la population Algérienne de 460 réparties entre donneurs et receveurs, recrute sur une période de 9ans, allant du 2009 jusqu'a 2016.

Les données relatives aux sujets étudiés ont été recueillies sur un questionnaire détaillé (**Annexe 11**).

1.2. Matériel non biologiques : (Voir Annexe 2)

1.2.1. Matériel informatiques :

- Un logiciel **EXCEL**.
- Une image Lab.
- Un logiciel **FUSION**.

2. Méthodes :

2.1.Prélèvement :

Les explorations sont réalisées à partir du sang périphérique prélevé sur un tube de type BD VACUTAINER contenant 1,5ml d'ACD (pour 8,5 ml de sang)

2.2. Techniques de séparation des lymphocytes :

Le typage HLA par sérologie nécessite préalablement une séparation des différentes populations lymphocytaires .Deux techniques ont été utilisées dans notre laboratoire :

A-Séparation des lymphocytes totaux sur gradient de Ficoll :

a) Principe :

C'est une technique basée sur la différence des densités qui existent entre les différents éléments figurés du sang. Le Ficoll par sa densité intermédiaire entre celle des lymphocytes et celles des autres éléments figurés, permet après centrifugation l'obtention d'une couche de cellules mononuclées constituée de lymphocytes T(environ 80%),de lymphocytes B(10%)et de monocytes(10%), utiles pour le typage HLA de class1(HLA-A ;HLA-B).

b) Mode opératoire :(Voir Annexe 5)

- Diluer le sang total (un volume de 8,5ml) au 1/2 en ajoutant de l'eau physiologique ou un tampon PBS à PH=7 ,2.
- Déposer doucement à la surface du Ficoll (1/3 de Ficoll pour 2/3 du sang dilué) dans un tube à fond conique, en plastique.
- Centrifuger le tube 20 minutes à 1800t/min à 25°C.

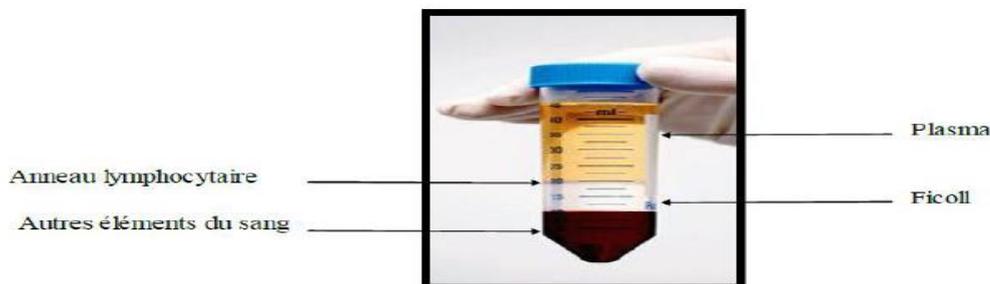


Figure 19 : le résultat de séparation par technique de Ficoll.

- Récupérer la couche de l'anneau lymphocytaire à l'interface entre le plasma et le Ficoll.
- Aspirer jusqu'à ce que la limite entre les deux couches soit une interface nette.

- Laver deux fois la suspension lymphocytaire dans de l'eau physiologique, par centrifugation à 2500t/min pendant 10minutes.
- Resuspendre le culot de lymphocytes en ajoutant environ 500µl de solution nutritif de Hanks.
- Enumérer au ½ au Lasarus sur cellule de Malassez, le nombre de cellules en million/ml, est obtenu en appliquant la formule suivante:

$$N \times 2 \times 1000 \times 100$$

N=le nombre de cellules par champ

- Vérifier la viabilité des lymphocytes et ajuster la suspension à 2000-2500 cellules/µl
- Soit par une dilution (en ajoutant de solution de Hanks) ; soit par une concentration selon le nombre des lymphocytes.

B- L'enrichissement en lymphocytes B (Séparation des lymphocytes B) :

a) Principe :

L'enrichissement en lymphocytes B à partir du sang prélevé est réalisé par des billes immunomagnétiques couplées à des anticorps monoclonaux anti CD19 (Fluorobeads B). Cette séparation des lymphocytes B est nécessaire pour le typage HLA de classe II (HLA-DR, HLA-DQ).

2.3.Etude de polymorphisme HLA :

Elle est effectuée par deux types de techniques :

- Techniques sérologique qui permettent de définir les Ag HLA.
- Techniques de biologie moléculaire qui permet de définir les gènes.

2.3.1. Technique sérologique (Microlymphocytotoxicité)

a) Principe :

Elle consiste à incuber les cellules du sujet à typer, préalablement isolées par une technique de séparation, avec des sérums tests (batterie d'anticorps anti HLA) en présence de complément du lapin. Lorsque les cellules expriment des molécules HLA spécifiques à certains anticorps utilisés, il se produit une lésion cellulaire qui est visualisée par microscope à fluorescence après coloration via le FluoroquenchtTMAO/EB. (L. Chatenoud et al)

Anticorps utilisés :

Voir Kits de typage HLA (AB72D / LM144A / LM144B / DR72D).

Cibles utilisées :

- Les lymphocytes totaux T et B pour le typage HLA de classe I (A, B).
- Les lymphocytes B périphériques pour le typage HLA de classe II (DR et DQ).(Voir annexe 7)

b) Lecture :

La lecture des puits de la plaque a lieu au microscope inversé.

➤ **La réaction positive :**

S'il y a eu reconnaissance dans un puits de la plaque, entre l'anticorps fixé au fond du puits et l'antigène HLA situé à la surface des lymphocytes du patient, le complexe antigène-anticorps formé active le complément de lapin, qui lyse ainsi les cellules. Les cellules mortes sont marquées d'une fluorescence rouge par le bromure d'éthidium (.



Figure 20 : Principe d'une réaction positive en microlymphocytotoxicité. (Crespo M et al.,2001)

➤ **La réaction négative :**

S'il n'existe pas de reconnaissance entre l'antigène de la cellule du patient et l'anticorps fixé au fond de la plaque, le complément n'est pas activé, les lymphocytes ne sont pas lysés. Les cellules vivantes sont marquées d'une fluorescence verte par l'acridine orange .



Figure 21 : Principe d'une réaction négative en microlymphocytotoxicité. (Crespo M et al.,2001)

- Le score des réactions exprime le pourcentage des cellules mortes. Si le témoin négatif contient des cellules mortes, ce pourcentage devra être ajusté en conséquence. L'échelle standard est la suivante :

Score	Cellules lysées (%)	Résultats	Observation au microscope à fluorescence
1	0 – 10	Négatif	Réaction "1" 0-10% de cellules marquées
2	11 – 20	Douteux négatif	Réaction "2" 11-20% de cellules marquées
4	21 – 50	Positif faible	Réaction "4" 21-50% de cellules marquées
6	51 – 80	positif	Réaction "6" 51-80% de cellules marquées
8	81 – 100	Très positif	Réaction "8" 81-100% de cellules marquées
0		Ininterprétable	

Tableau 2 : Score selon l'échelle standard ASHI. (Piazza A et al.,2000)

d) Interprétation des résultats :

L'interprétation du typage est faite selon les plans des batteries d'anticorps utilisées (**Voir annexe 8**) où les scores les plus élevés (6 et 8) représentent le typage HLA et les scores inférieur (4 et 2) sont expliqués par les réactions croisées.

✓ **Avantages :**

- Technique simple et rapide.
- Utilisée surtout pour le phénotype HLA de classe I et II.

✓ **Inconvénients :**

- Discrimination limitée : reconnaissance de déterminants antigéniques communs à plusieurs molécules HLA très proches.
- Difficulté d'assignation surtout pour la classe II.
- Réactions croisées : deux molécules HLA codées par des allèles très différents peuvent être reconnues par un même Ac.
- Manque des anticorps monospécifiques.
- Le non expression de certains antigènes HLA sur les lymphocytes.

2.3.2. Technique de biologie moléculaire :

L'étude du polymorphisme HLA est réalisée par amplification génique (PCR : polymérase chain réaction) de type PCR-SSP.

Principe de la PCR :

La réaction PCR consiste à une amplification génique in vitro d'une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

Elle est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Ainsi, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Les éléments nécessaires pour réaliser la PCR sont :

- La matrice d'ADN.
- Des paires d'amorces oligonucléotidiques (primers) : de 20 à 30 nucléotides, qui sont parfaitement complémentaire du fragment à amplifier.
- Les quatre désoxynucléotides triphosphates (dNTP).
- La DNA-polymérase thermorésistante « Taq polymérase » : enzyme thermostable résistant aux températures élevées nécessaires à la séparation des ADN double brin.
- Un tampon salin adéquat contenant une concentration appropriée de MgCl₂ (varie entre 1 à 4 mM) qui sert à maintenir un PH optimal pour la Taq polymérase (PH varie entre 8.5 et 9).

Chaque réaction d'amplification comporte trois étapes se succédant précisément et nécessitant chacune une température différente :

➤ Première étape: Dénaturation thermique:

Consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogène. L'ADN double brin est chauffé à une température élevée de l'ordre de 95°C pendant 10 secondes. Ces brins serviront de matrice au cours des cycles d'amplification.

➤ Deuxième étape: Hybridation des amorces

Le milieu réactionnel contient deux amorces, chacune complémentaire d'un des brins. L'étape d'hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C) pendant 50 secondes.

➤ Troisième étape: Extension des amorces

Elle correspond à l'extension des amorces par incubation avec la DNA-polymérase, et les quatre desoxyribonucléotides-triphosphates, à 70°C (température optimale de l'activité de l'enzyme) pendant 30 secondes.

Ces trois étapes actuellement, automatisées grâce à un Thermocycleur, sont répétées 15 à 60 fois selon le protocole utilisé avec un optimum aux environs de 30 cycles.

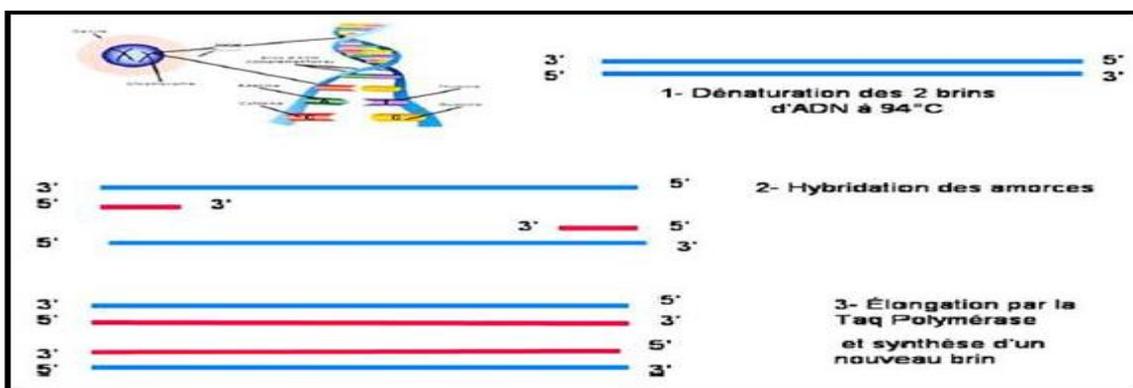


Figure 23 : Les principales étapes de la réaction de PCR.

a) Principe du typage HLA par PCR-SSP :

C'est une technique de PCR basée sur la spécificité d'amorces qui repose sur sa complémentarité structurale avec l'ADN matrice lors de l'hybridation.

Le typage est déterminé par conséquent par la présence ou l'absence du produit PCR visualisé sur gel d'agarose. Chaque typage comporte plusieurs réactions PCR réalisées dans des puits contenant des primers lyophilisés spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles, ainsi qu'un contrôle interne qui valide la réaction PCR.

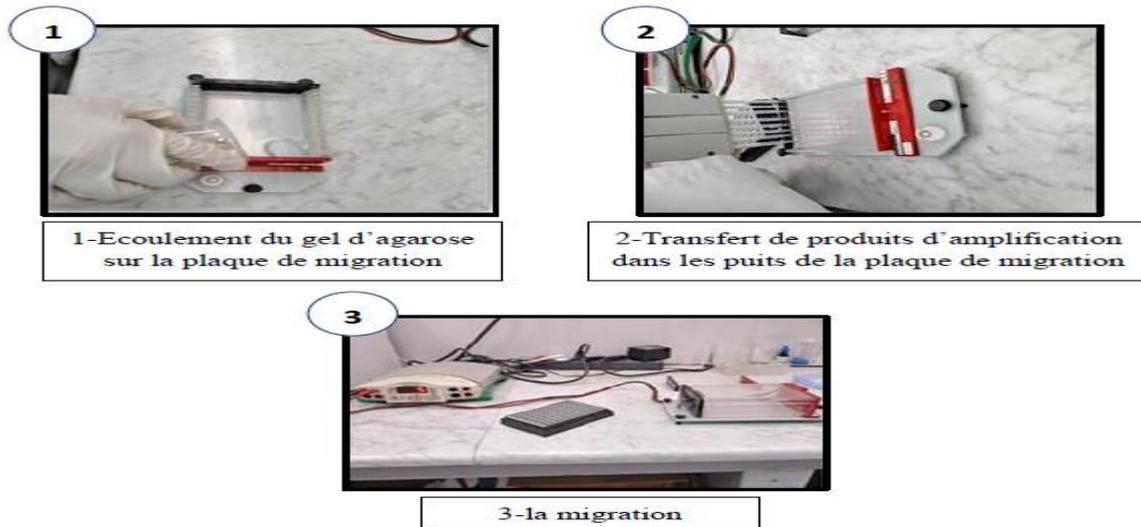


Figure 24: Etapes d'électrophorèse sur gel d'agarose.

c) Lecture :

La visualisation des bandes d'électrophorèse est réalisée par lecture sous UV Geldoc et nécessite l'utilisation du logiciel **Image Lab**, et des planches fournies dont :

- a) Validation du témoin négatif, pour assurer l'absence de toute contamination.
- b) Le contrôle interne doit être présent dans tous les puits sauf le témoin négatif.
- c) Si le gène HLA a été amplifié, une bande de migration supérieure au témoin est visible.
- d) Le contrôle interne peut être faible ou inexistant dans les puits positifs.
- e) Si le contrôle interne et/ou la bande positive sont vus dans le témoin négatif, la manipulation doit être refaite.
- f) Les lignes horizontales sont référées par des chiffres de 1 à 12, et les lignes verticales sont référées par des lettres de A à H.
- g) Un puit est référé par sa position en ligne horizontale et verticale, ex : puit 1C, puit 5H, puit 12F.
- h) Enregistrer profils de réactivité ; les puits positifs et nuls si trouvés.

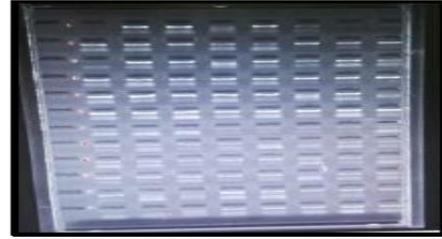
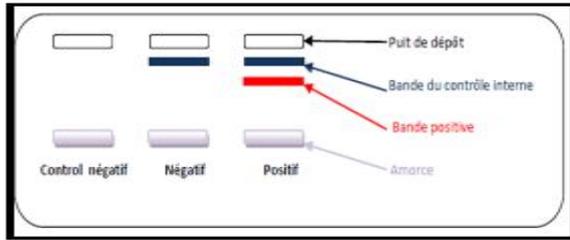


Figure 25 : Lecture du gel d'agarose.

d) Interprétation :

Elle est réalisée par le logiciel **HLA Fusion**, qui s'exécute en mode autonome (sur un seul ordinateur) et dans des environnements de réseau.

L'opérateur saisit manuellement les profils de réactivité pour les produits Micro-SSP.

Le logiciel HLA Fusion analyse ce profil par un processus compliqué, en se basant sur les recombinaisons allélique et les déséquilibres de liaison B/C et C/B pour HLA-I et DRB1/DQB1 pour HLA-II, et fournit ainsi le typage HLA.

Les résultats de cette analyse sont ensuite validés, enregistrés et imprimés par l'opérateur.

✓ **Avantages de la technique de biologie moléculaire (PCR) :**

- Amélioration de la discrimination par rapport au LCT.
- Détermination du numéro de série allélique.
- Le typage de niveau générique des gènes HLA-A, HLA-B et HLA-DRβ1 est suffisant pour les transplantations rénales mais en plus la biologie moléculaire permet le typage de HLA-C, DQA1.....

✓ **Inconvénients :**

- Délicate à réaliser et à interpréter.
- Risque d'intercontamination lors de prélèvement ou de la manipulation.
- Possibilité de dégradation des acides nucléiques.

2.4.Extraction d'ADN à partir du sang périphérique :

L'extraction d'ADN a été réalisée par des kits QIAGEN.

❖ **Principe de la technique QIAGEN :**

La technique de QIAGEN est une technique chromatographique, basée sur la propriété des particules de silice à adsorber sélectivement les acides nucléiques. L'ADN est séparé des autres composés du sang en quatre étapes : la lyse, la fixation, le lavage et enfin l'élution.

Cette technique a été réalisée par deux types de procédés :

**A-Technique manuelle : technique QIAGEN (KIT QI Aamp®DNA Blood Mini Kit)
(Voir annexe 6)**

B-Technique automatique :

Extraction d'ADN génomique Kit QIAGEN BIOROBOT :

L'extraction de l'ADN au moyen du KIT QIAamp®DNA Blood Mini Kit QIAGEN peut être entièrement automatisée sur l'extracteur d'ADN « BIOROBOT EZ1 ».

Cet automate innovant utilise la technologie des particules magnétiques, associe la vitesse et l'efficacité de la purification d'ADN sur membrane de silice à la manipulation pratique des particules magnétiques.

2.6 Techniques de recherche des anticorps anti HLA de classe I et II :

La recherche d'anticorps anti-HLA de classe I et II se fait dans les situations suivantes :

- Systématiquement chez les patients durant la période de suivi pré- et post-transplantation.
- Au cours des événements immunisants (transfusion, grossesse, transplantation).

La méthode utilisée dans le laboratoire pour leur recherche est la technique immunoenzymatique ELISA sur un pool d'antigènes purifiés.

2.6.1. Technique immunoenzymatique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay):

a) Principe :

Le test ELISA permet la réalisation d'un dosage qualitatif ou quantitatif in vitro pour la détection d'auto anticorps humains anti HLA de classe I et II de type IgG.

La plaque contient de 96 puits, coatés avec des antigènes HLA purifiés. Lors de la première étape de la réaction, les échantillons patients dilués (sérum ou plasma) sont incubés dans les puits.

Dans le cas d'échantillons positifs, les anticorps spécifiques de classe IgG (mais aussi IgA et IgM) se fixeront sur les antigènes correspondants.

Pour détecter les anticorps fixés, une seconde incubation est réalisée en utilisant les anticorps anti-IgG humains couplés à une enzyme (conjugué enzymatique). Ce conjugué est capable de générer une réaction colorée. Une mesure quantitative de la couleur développée est effectuée par spectrophotométrie à 630 nm. **(Voir annexe 9)**

b) Interprétation des résultats :

Un résultat positif se traduit par un changement de la coloration, les puits positifs adopteront une coloration bleue visible à l'œil nu **(Image 1)**.

La plaque de Terasaki est ensuite introduite dans un lecteur d'**ELISA** et qui sera analysé grâce à un logiciel HLA fusion **(Image 2)**.

- Les puits des sérums positifs apparaissent en rouge, de même que le contrôle positif doit l'être sinon les résultats ne seront pas interprétables (**Image 3**).
- Un résultat est négatif si les puits n'adoptent pas de couleur bleu, et dans le logiciel n'apparaissent pas en rouge. (**Figure 30**)

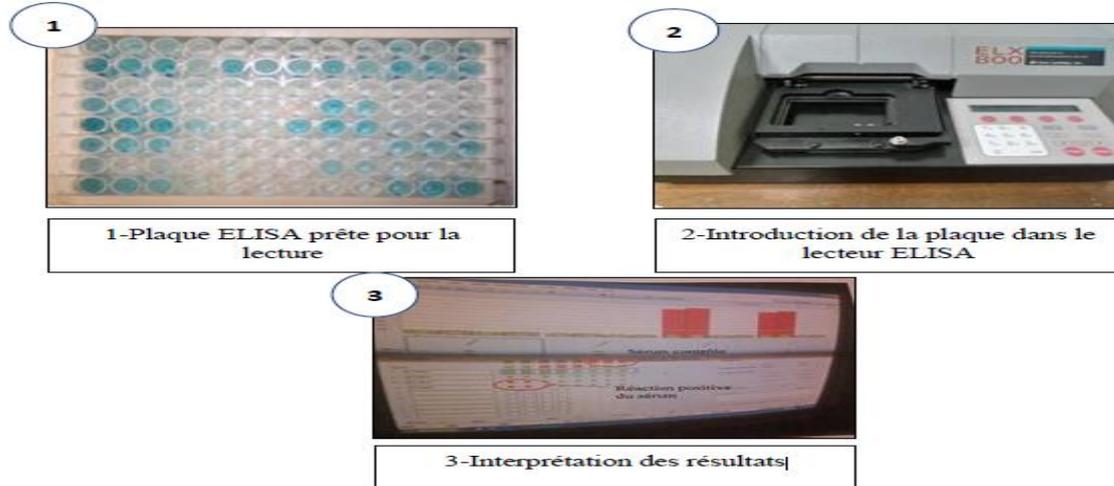


Figure 26: Interprétation des résultats d'ELISA par le logiciel HLA fusion.

✓ **Avantages :**

- Plus sensible que **LCT**.
- Rapide et reproductible.
- Ne détecte que **les Ac anti-HLA**.
- Ne détecte que les **IgG** (sauf adaptation).
- Automatisable et relativement standardisée.
- Interprétation facile.

✓ **Inconvénients :**

- Peu sensible.

2.6.2. Technique de Cross match par Lymphocytotoxicité :

a) Principe :

La réaction de cross match (**CXM**) consiste à mettre en présence le (les) sérum(s) du receveur avec les lymphocytes du donneur afin de dépister des anticorps anti-HLA dirigés contre les antigènes HLA du donneur pouvant conduire au rejet hyperaigu du greffon. Elle se fait principalement par microlymphocytotoxicité complément dépendante (**CDC**).

Il peut être appelé **CXM** initial ou final selon le moment auquel il est effectué au cours du suivi du receveur :

- Le **CXM I** est effectué sur le premier sérum du receveur.
- Le **CXM F** est effectué juste avant la greffe sur le sérum du receveur.

Cibles utilisées :

Les lymphocytes totaux T et B du donneur préparés extemporanément.

- Lymphocytes totaux (T et B) CXM pour la classe I et II.
- Lymphocytes B CXM pour la classe II. (**Voir annexe 10**)

b) Interprétation des résultats :

La lecture se fait par un microscope à fluorescence inversée.

- Témoin positif doit être positif représenté par une lyse cellulaire totale à 100%.
- Le témoin négatif doit être négatif c'est-à-dire une lyse à 0% (si faible pourcentage de lyse, dite de base, les sérums suivants doivent être lus en comparaison avec le sérum témoin négatif).
- Tous les sérums de «>» supérieur à la base, est rendu positif sur l'ensemble des sérums testés du receveur. Le cross match est rendu positif.
- Un cross match positif signifie que la greffe ne peut être réalisée.

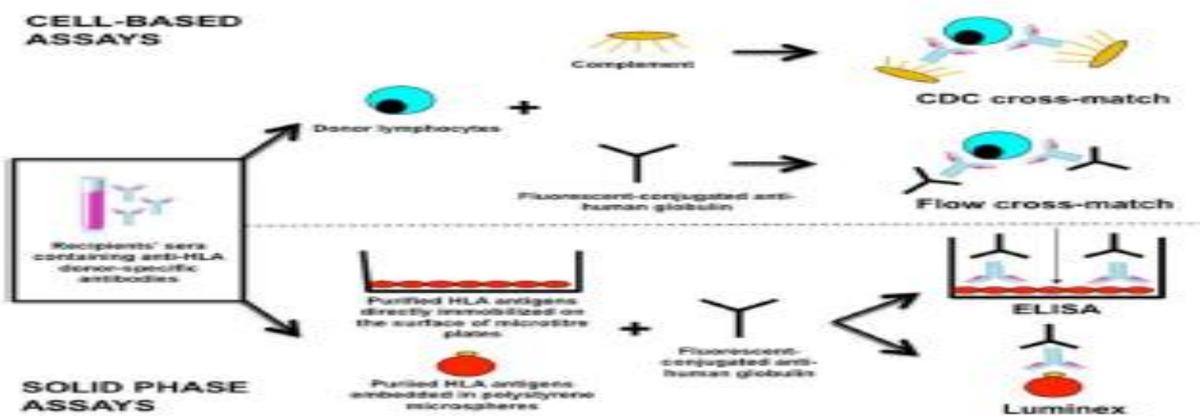
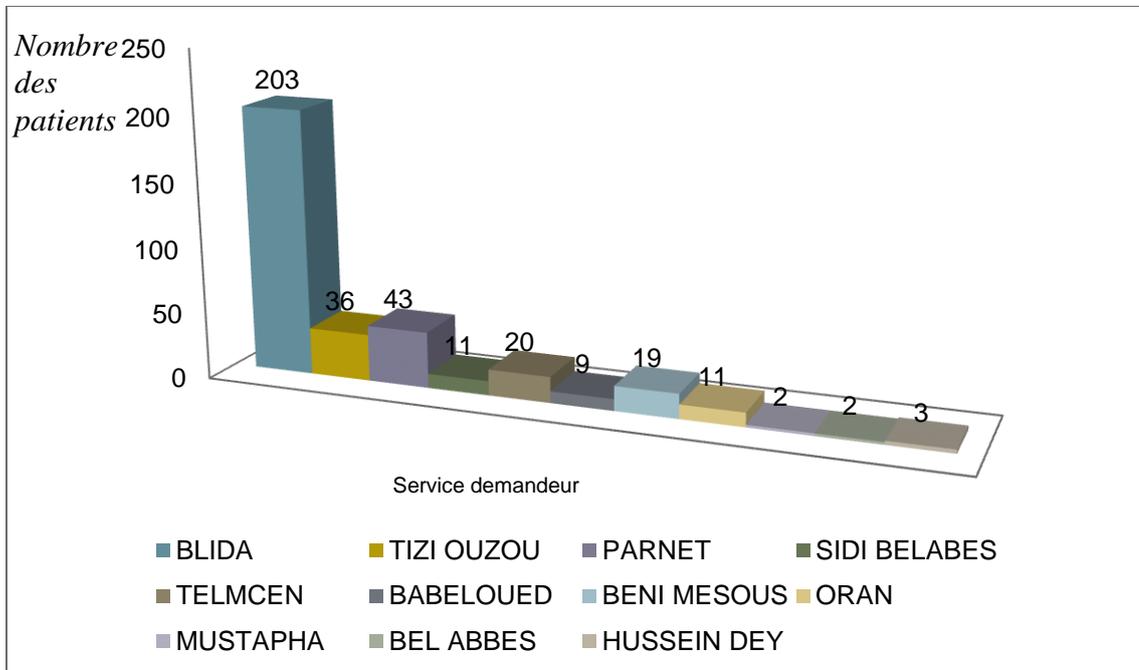


Figure 27: Différentes techniques de détection des anticorps anti-HLA

Résultats

Caractéristiques démographiques de la population algérienne étudiée

1. Répartition de 359 patients dans le cadre de la transplantation rénale selon le service d'origine :



Graph 01: Répartition de 359 patients dans le cadre de la transplantation rénale selon le service d'origine.

On remarque que la majorité des sujets recrutés dans notre échantillon, fait partie du **CHU de Blida** avec un pourcentage de **57%** suivi par le **CHU de Parnet** avec **12%** et le **CHU de Tizi ouzou** avec **10%**.

Répartition de 359 sujets selon l'année de recrutement:

Tableau 03 : Répartition de 359 sujets selon l'année de recrutement.

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Nbr de patients	15	73	133	44	35	37	22
Fréquence	4,18	20,33	37,05	12,26	9,75	13,31	6,13

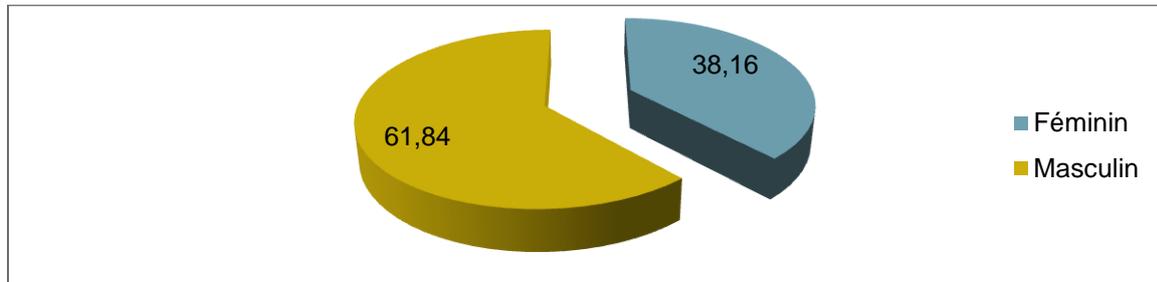
La majorité des sujets (**57,38%**) ont été recrutés Durant la période 2007/2008 de l'activité de l'unité. Par la suite, ce rythme de recrutement a reculé considérablement pour fluctuer entre **15** et **44** patient par année.

II. Caractéristique biologique de la population algérienne étudiée :

Répartition de 359 sujets selon le sexe :

Dans notre échantillon, on remarque :

Parmi les sujets étudiés **61,84%(222)** sont des hommes et **38,16%(137)** sont de femmes.



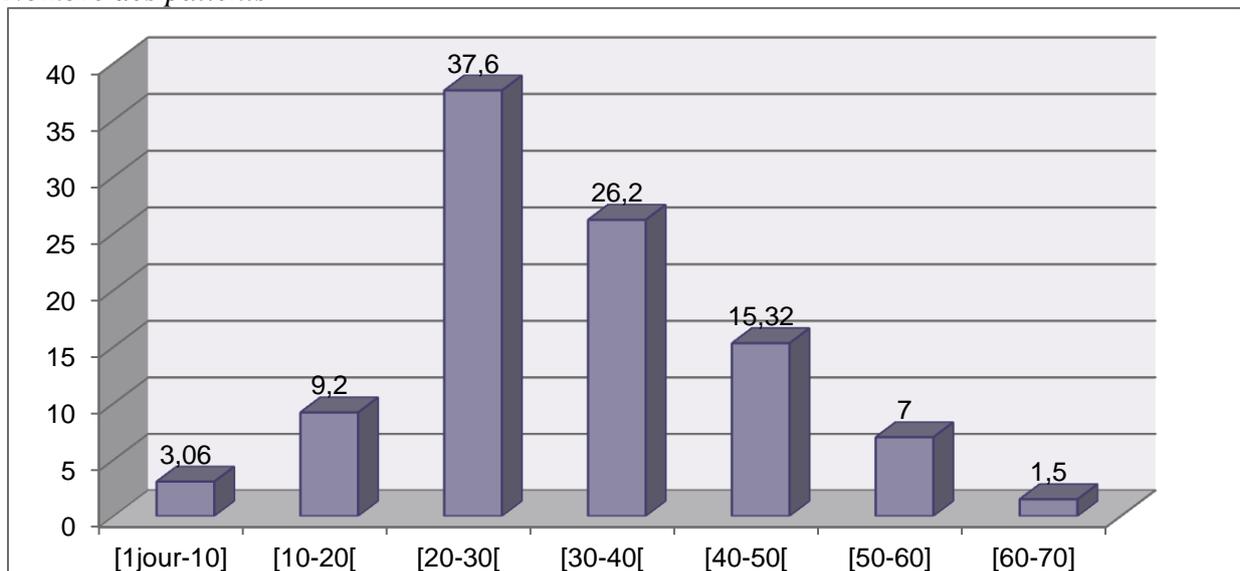
Graphique 02 : Répartition des sujets selon le sexe.

Répartition des sujets selon tranche d'âge :

La moyenne d'âge des sujets explorés est de 33 ans avec des extrêmes d'âge de 20 mois et de 68 ans. Les sujets adulte (20 - 50) sont les plus fréquentés dans notre série (79,12 % des sujets) et dont la plupart sont des adultes jaunes (20-40ans) avec une fréquence de 63,8%

NB : absence l'âge d'un patient.

Nombre des patients



Graphique 03: Répartition des sujets selon tranche d'âge

Répartition des patients selon les résultats de la recherche des allo AC anti HLA de classe 1et 2 :

La recherche des aloo AC anti HLA de classe 1et 2 a été réalisée sur les sérums de 359 patients (receveurs).

Les allo AC anti HLA de classe 1 :

Tableau 04: Répartition de 359 patients selon les résultats de la recherche des allo AC anti HLA de classe 1.

résultats des allo AC anti HLA de classe 1.	des allo AC anti HLA de classe 1(-)	des allo AC anti HLA de classe 1(+)	des allo AC anti HLA de classe 1doutex
Nombre des patients	291	62	3
Fe(%)	81,06	17,26	0,84

Parmi 359 patients, seul **17,26%** ont développé des allo AC anti HLA de classe1 avant la greffe, ils sont donc des patients immunisés ou hyper immunisés.

Le reste des patients, présenté par un pourcentage de **81,06%** n'ont pas développé des allo AC anti HLA de classe1, ils sont donc considérés comme non immunisés.

NB : Par l'absence des résultats pour 3 patients.

Les allo AC anti HLA de classe 2 :

Tableau 05 : Répartition de 359 patients selon les résultats de la recherche des allo AC anti HLA de classe 2.

résultats des allo AC anti HLA de classe 2.	des allo AC anti HLA de classe 2(-)	des allo AC anti HLA de classe 2(+)	des allo AC anti HLA de classe 2 douteux
Nombre des patients	320	36	0
Fe(%)	89,14	10,03	0

Pour les allo AC anti HLA de classe2, la positivité des résultats a été remarquée chez **10,03 %** des patients, alors que le reste de ces dernier **89,14 %** avait des résultats négatifs concernant la présence des AC anti HLA de classe 2.

Comparaison les résultats de la recherche des allo AC anti HLA de classe 1 et classe 2 :

Tableau 06: Comparaison les résultats de la recherche des allo AC anti HLA de classe 1 et classe 2.

Résultats-	classe 1	classe 2
des allo AC anti HLA (-)	291	320
des allo AC anti HLA (+)	62	36
douteux	3	0

Ce tableau récapitulatif montre que le nombre des allo AC anti HLA de classe 2(+) est significativement bas par rapport à celui des allo AC anti HLA de classe 1(+). Donc les receveurs de HLA classe 1 **18,11%** et les receveurs HLA de classe 2 **11,03%**.

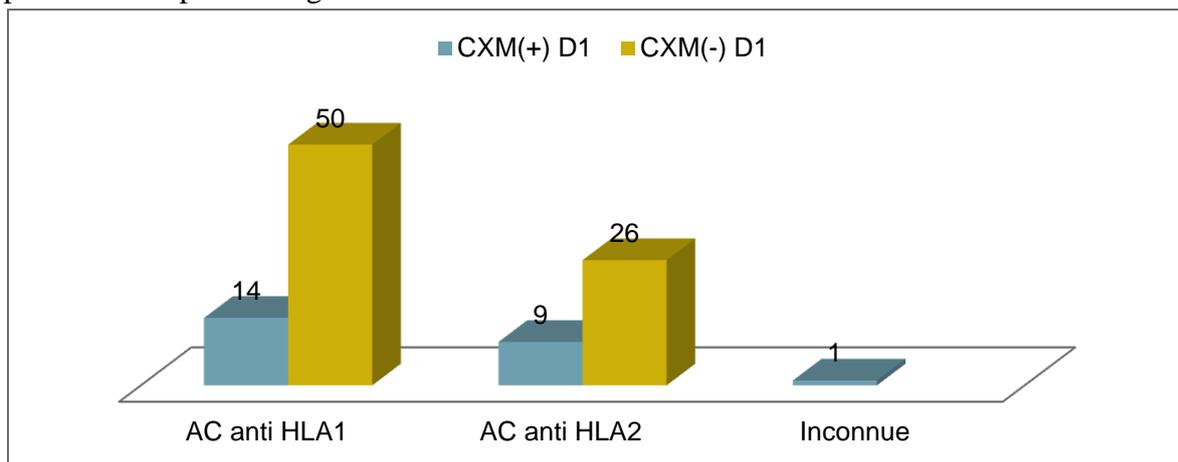
Tableau 7: Comparaison les résultats de cross match (-) de donneur 1 selon les AC anti HLA de classe 1 et 2.

Résultats	CXM(-) D1	CXM(-) D1
AC anti HLA1(+)	45	2
AC anti HLA2(+)	26	2

On remarque que les patients qui font la transplantation rénale en Algérie pendant 2006-2012 :

12,53% des patients immunisé contre HLA 1 sont autorisent la greffe par le donneur 1 et **7,24%** des patients immunisé contre HLA 2 sont autorisent la greffe par le donneur 1.

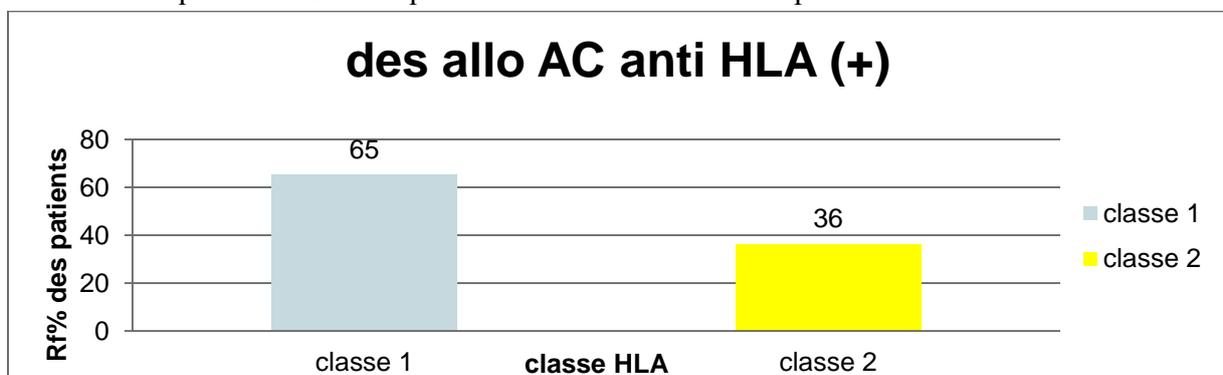
7,14% des patients immunisé qui sont autorisent la greffe par le donneur 2 contre HLA1 et par un même pourcentage contre HLA 2.



Graph 04: Comparaison les résultats de la recherche des allo AC anti HLA(+) de classe 1 et classe 2.

On remarque que les patients qui font la transplantation rénale en Algérie pendant 2006-2012 majoritairement immunisé contre HLA de classe 1.

L'orsque on considère que AC anti HLA douteux est positive.

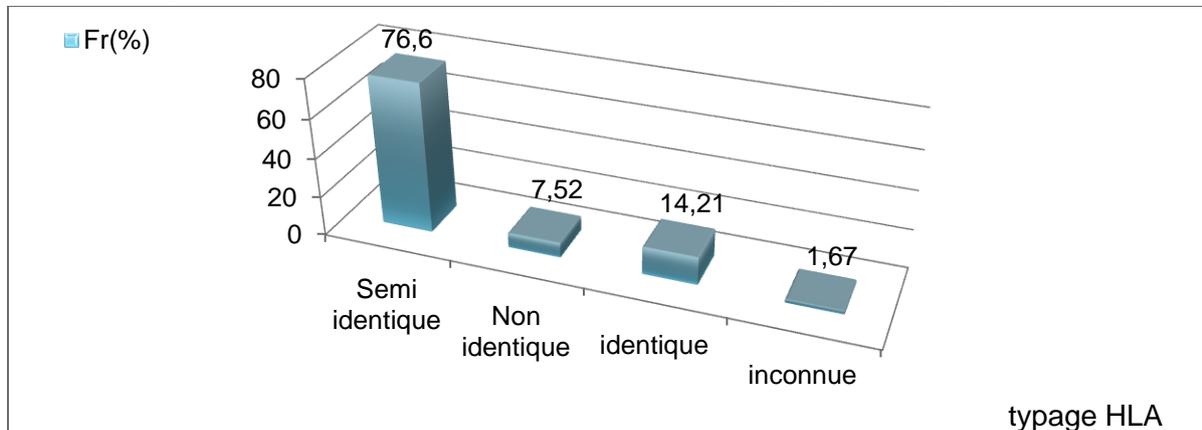


Graph 05: Répartition des allo AC anti HLA des sujet selon AC anti HLA(+)

On remarque que les receveurs possèdent des AC anti HLA classe1 **18,11%** et les receveurs possèdent des AC anti HLA classe2 **10,03%**.

Réparation des sujets selon les résultats typage HLA de donneur 1

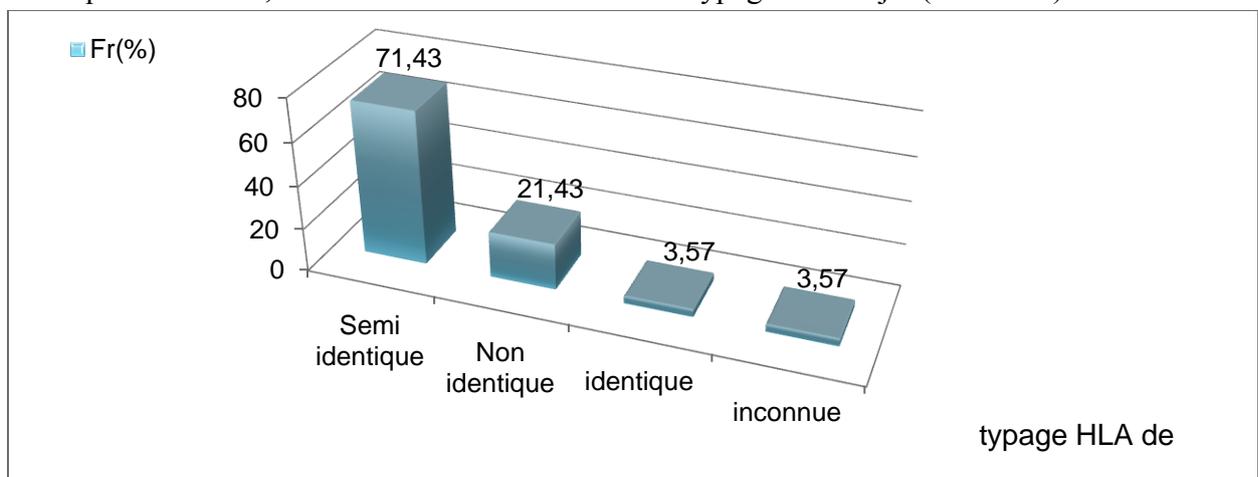
Sur l'ensemble des donneurs1 adressés au laboratoire, **76,60%** d'entre eux disposent d'un typage HLA semi identique à receveur et seulement **14,21%** des donneurs sont d'un typage HLA identique à receveur, avec l'absence des résultats du typage de 6 sujets (donneur1)



Graphe 06: Répartition de la population étudiée selon le typage HLA de donneur1

Réparation des 28 sujets selon les résultats typage HLA de donneur 2

Sur les 28 des donneurs2 adressés au laboratoire, **71,43%** d'entre eux disposent d'un typage HLA semi identique à receveur et seulement **3,57%** des donneurs sont d'un typage HLA identique à receveur, avec l'absence des résultats du typage d'un sujet (donneur2).

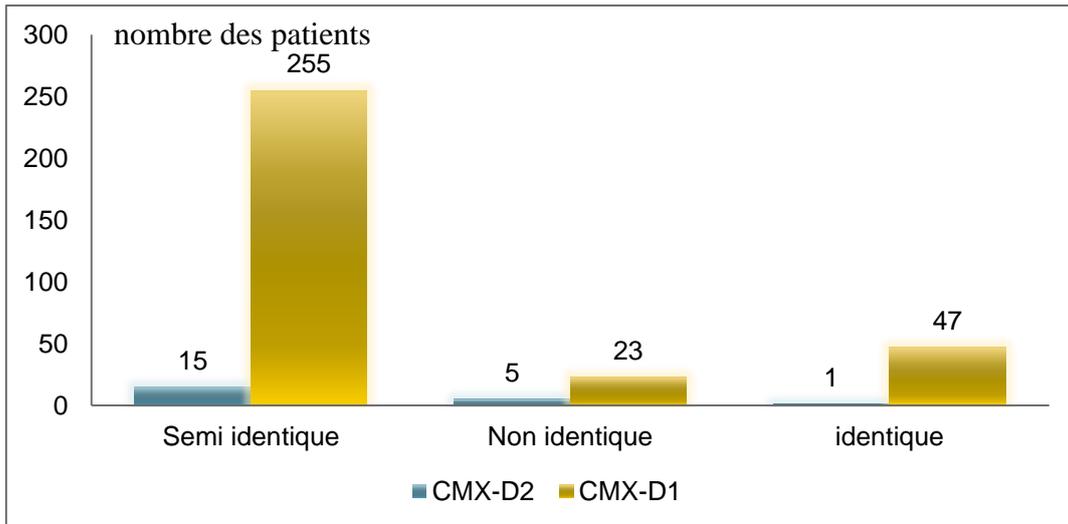


Graphe 7 : Répartition des 28 sujets selon le typage HLA de donneur2

Réparation des patients selon les résultats de cross match de donneur

NB : l'absence de résultat d'un typage HLA

Ce tableau récapitulatif montre que le nombre des cross match (-) par rapport au typage HLA de donneur 2 semi identique est le plus fréquent **53,57%**.



Graphe 8: Comparaison cross match négatif selon type HLA.

On remarque que pour le typage semi identique est le plus existé pour les transplantations rénales dans l'Algérie.

Réparation des patients selon le nombre de greffe par années :

Tableau 8: Réparation des patients selon le nombre de greffe par années.

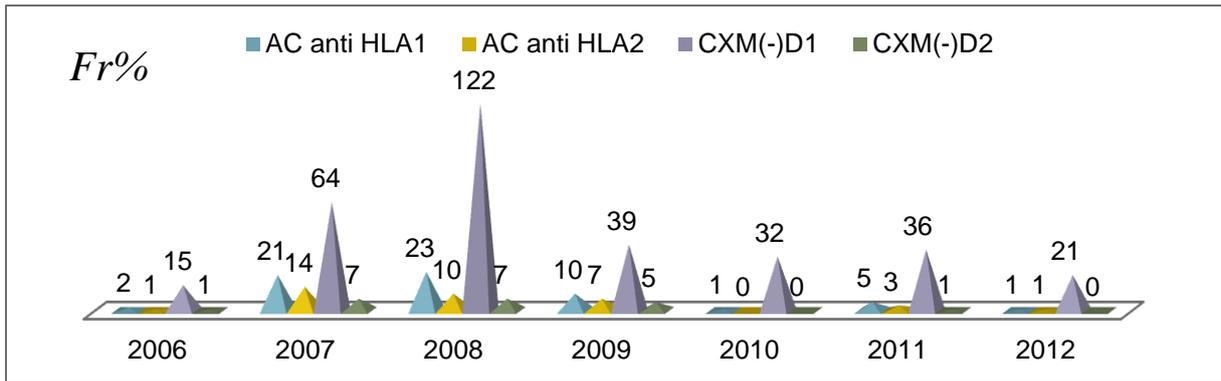
Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Nbr de Greffe	9	36	52	8	0	0	0
Fr%	8,57	34,26	49,52	7,62	0	0	0

On remarque que les greffons étaient retrouvés dont les plus fréquents sont **49,52%** en 2008 retrouvés chez 52 patients, suivi par **34,26%** retrouvés chez 36 patients en 2007, avec l'absence de greffe dans les années 2010, 2011, 2012.

Réparation des patients pour chaque années selon les résultats du cross match(-) D1 et l'année de greffe, AC anti HLA:

On remarque que la majorité des patients qui ont bénéficié d'un cross match quelle que soit le donneur et le résultat était négatif, sont transplantés.

En se basant sur l'activité de la réalisation des greffes au niveau du CHU de Blida, on remarque une activité accrue au cours des années **2007, 2008** dont elles présentent dans l'ensemble un pourcentage de **83,79%**.



Graph 9 : Répartition des patients pour chaque années selon les résultats du cross match(-) D1 et l'année de greffe, AC anti HLA.

Les patients allo-immunisés dans le système HLA représentent la population à risque de développer, une fois greffés, ces différentes formes d'expression de rejet humoral avec des conséquences majeures en terme de survie des greffons.

Répartition 460 des sujets typés dans le cadre de transplantation rénale par année :

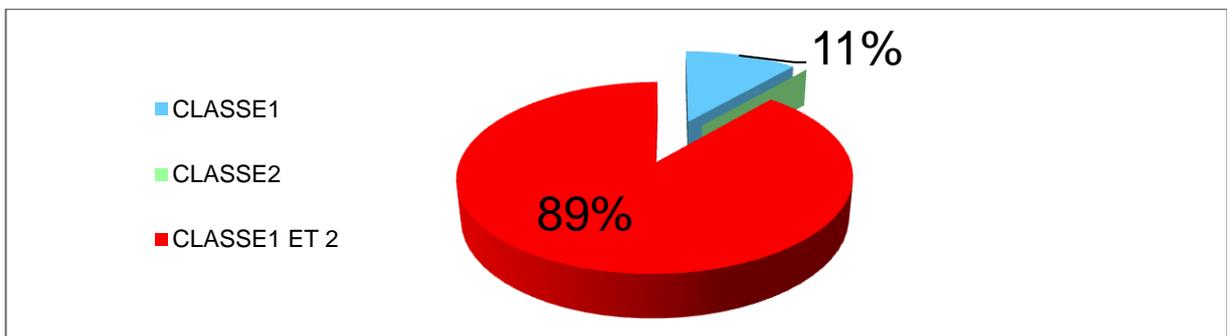
Tableau 9 : Répartition de 460 sujets typés par année.

Année	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL
Effectifs	98	74	75	54	19	57	59	24	460
Fr (%)	21,30	16,09	16,30	11,74	4,13	12,39	12,83	5,22	100%

En se basant sur la fréquence de la population typée par année, on constate que la plus grande fréquence était pendant la période **2009/2011** avec **53,39%**.

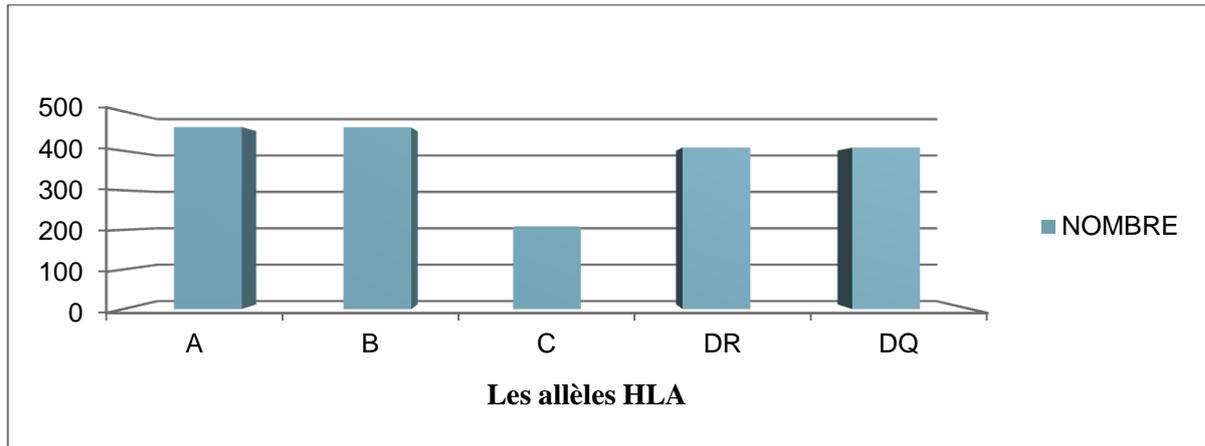
Répartition de 460 sujets selon la classe HLA typée :

Sur l'ensemble des sujets adressés au laboratoire, **88,70%** d'entre eux disposent d'un typage **HLA** de classe **I** et **II** seulement et **11,30%** d'un typage HLA de classe **I**.



Graph 10 : Répartition de la population étudiée selon la classe HLA typée.-

Répartition de la population étudiée selon le locus HLA typé :



Graph 11: Répartition de la population étudiée selon le locus HLA typé.

Dans notre étude, le nombre des sujets qui disposent d'un typage du locus **HLA-A** et **B** est nettement plus élevé que pour les autres loci.

La discordance de nombre des patients typés pour chaque allèle dépend du type de typage (complet ou ciblé) et de la technique utilisée.

III-Étude du polymorphisme HLA chez la population algérienne étudiée :

1-Étude des fréquences des allèles HLA chez la population algérienne étudiée :

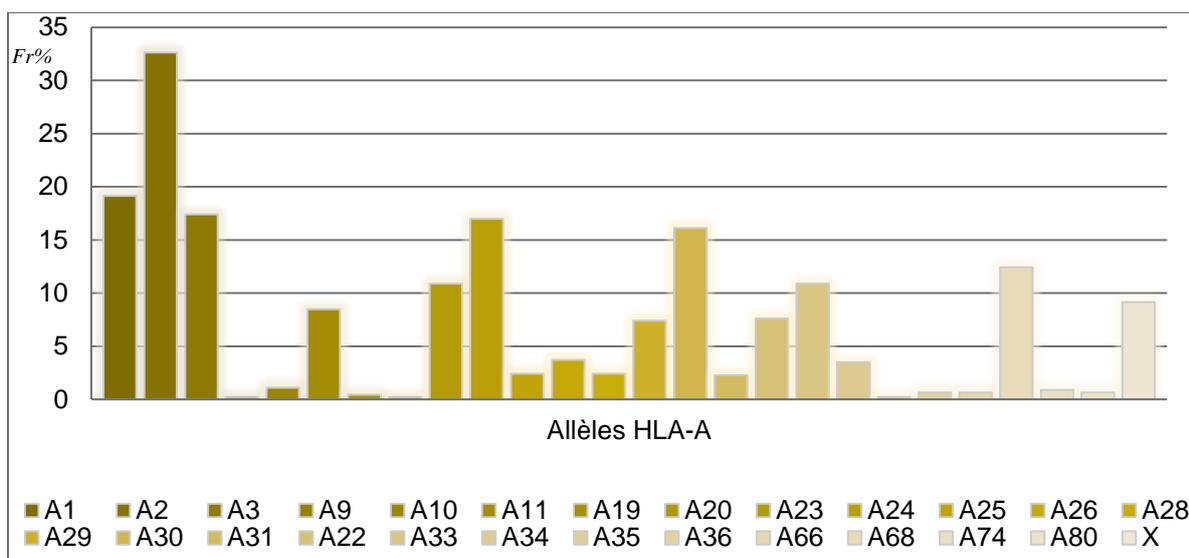
Le **X** dans les tableaux ci-dessous, représente soit un allèle homozygote, soit un allèle absent.

NB : Dans les tableaux ci-dessous, les pourcentages les plus fréquents sont marqués en rouge et les moins fréquents en vert.

1) HLA-A :

L'étude des allèles **HLA-A** chez **460** sujets.

25 allèles **HLA-A** étaient retrouvés dont les plus fréquents sont : **A2 (32,61%)**, retrouvé chez **150** individus, suivi par **A1 (19.13%)** retrouvé chez **88** individus. Pour les allèles **HLA-A** les moins fréquents sont : **A66 (0.65%)** retrouvé chez **3** individus, **A74 (0.87%)** retrouvé chez **4** individus et **A10 (1.09%)** retrouvé chez **5** individus.



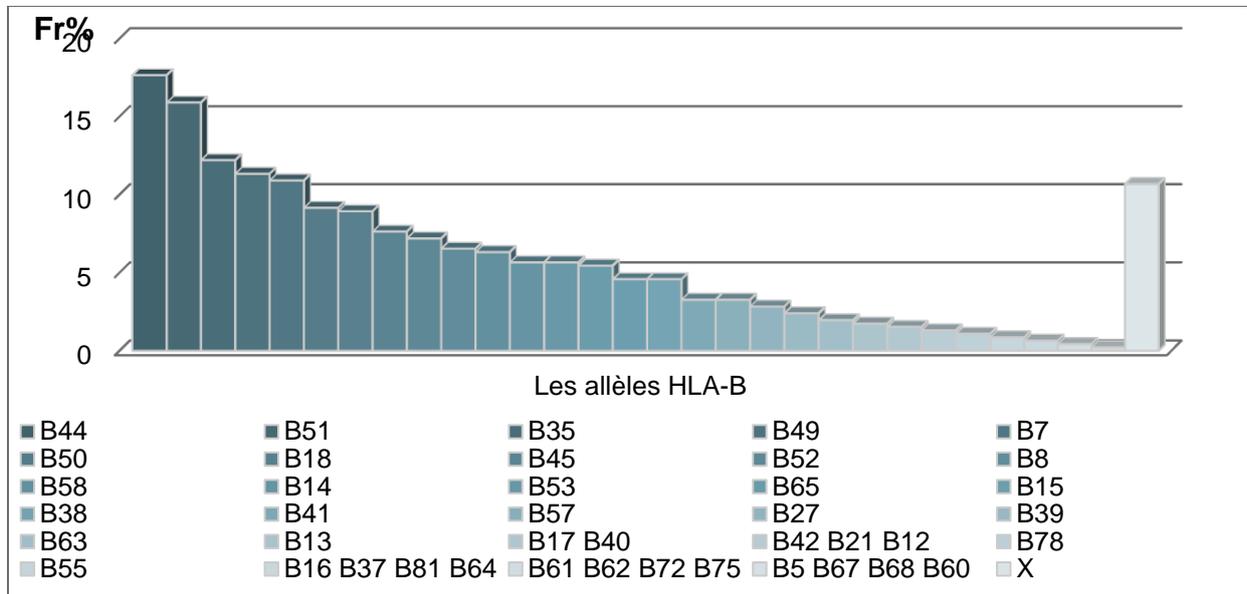
Graph 12 : Fréquences des allèles HLA-A chez 460 sujets

2) HLA-B :

L'étude des allèles **HLA-B** chez **459** sujets.

41 allèles **HLA-B** étaient retrouvés, les plus fréquents sont : **B44 (17,65%)** retrouvé chez **81** individus, suivi par **B51 (15,90%)** retrouvé chez **73** individus.

Pour les allèles **HLA-B** les moins fréquents sont : **B55 (0,87%)** retrouvé chez **4** individus, **B78 (1,09%)** retrouvé chez **5** individus et **B42 (1,31%)** retrouvé chez **6** individus.



Graph13 : Fréquences des allèles HLA-B chez 459 sujets.

3) HLA-C :

L'étude des allèles **HLA-C** chez **172** sujets.

Tableau 10 : Fréquences des allèles HLA-C chez 172 sujets.

HLA-C	Effectifs	(%) Gé
C7	73	42,44
C6	47	27,33
C4	34	19,77
C12	28	16,28
C5	27	15,70
C8	27	15,70
C2	25	14,53
C16	23	13,37
C15	16	9,30
C17	14	8,14
C3	11	6,40
C14	9	5,23
C1	6	3,49
C9	2	1,16
C18	2	1,16

15 allèles **HLA-C** étaient retrouvés, les plus fréquents sont : **C7 (42,44%)** retrouvé chez **73** individus, suivi par **C6 (27,33%)** retrouvé chez **47** individus.

Pour les allèles **HLA-C** les moins fréquents sont : **C9 (1,16%)** retrouvé chez **2** individus et **C1 (3,49%)** retrouvé chez **6** individus.

4) HLA-DR :

L'étude des allèles **HLA-DR** chez **408** sujets.

Tableau 11 : Fréquences des allèles HLA-DR chez 408 sujets.

HLA-DR	Effectifs	(%) Gé
DR52	127	31,13
DR4	100	24,51
DR53	97	23,78
DR3	72	17,65
DR15	68	16,67
DR1	64	15,69
DR7	60	14,71
DR11	58	14,22
DR13	57	13,98
DR51	35	8,58
DR8	20	4,90
DR10	17	4,17
DR14	15	3,68
DR16	11	2,70
DR17	9	2,20
DR12	5	1,23
DR23	1	0,25

-15 allèles HLA-DR β 1 étaient retrouvés, les plus fréquents sont : DR β 1*04 (19,86%) retrouvé chez 81 individus, suivi par DR β 1*03 (12,5%) retrouvé chez 51 individus.

Pour les allèles HLA-DR β 1 les moins fréquents sont : DR β 1*17 (0,25%) retrouvé chez 1 individu, suivi par DR β 1*8 et DR β 1*12 avec une même fréquence (1,96%) retrouvé chez 8 individus.

-On a 3 autres allèles HLA-DR : DR β 3 (22,30%) retrouvé chez 91 individus, DR β 4 (11,27%), retrouvé chez 46 individus et DR β 5 (15,93%), retrouvé chez 65 individus

5) HLA-DQ :

L'étude des allèles **HLA-DQ** chez **408** sujets.

Tableau 12: Fréquences des allèles HLA-DQ chez 408 sujets.

HLA-DQ	Effectifs	(%) Gé
DQ2	123	30,15
DQ6	105	25,74
DQ3	64	15,69
DQ7	64	15,69
DQ1	62	15,20

DQ5	40	9,80
DQ4	33	8,09
DQ8	20	4,90
DQ9	2	0,50

9 allèles **HLA-DQ** étaient retrouvés, les plus fréquents sont : **DQ2 (30,15%)** retrouvé chez **123** individus et suivi **DQ6 (25,74%)**, retrouvé chez **105** individus,

Pour l'allèle **HLA-DQ** le moins fréquent, on a : **DQ9 (0,5%)** retrouvé chez **2** individus.

3-Étude des fréquences haplotypiques chez la population algérienne étudiée :

L'étude haplotypiques a intéressée **460** sujets apparentés semi identiques disposant de typage HLA.

Les haplotypes HLA ont été établis selon les caractéristiques du système HLA (transmission en bloc et codominance), en associant des allèles HLA, dont les associations les plus fréquentes sont les suivantes : **A/B, B/C, DR/DQ, A/B/DR, A/B/DR/DQ** et **B/C/DR**.

Devant le grand nombre des haplotypes retrouvés, nous avons représenté aux tableaux ci-après les haplotypes les plus fréquemment retrouvés pour chaque association allélique.

Fréquence = Nombre d'effectif / Nombre d'haplotypes possibles

Nombre d'haplotypes possibles = 460×2

Total d'effectif : nombre des haplotypes les plus fréquents pour chaque association allélique.

a) Haplotype A/B :

Total d'effectif = 941.

Tableau 13 : Fréquences des haplotypes A/B retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.

	Effectif	Fr%		Effectif	Fr%
A2B53	39	4,24	A2B14	11	1,20
A30B44	26	2,83	A30B18	10	1,20
A2B50	24	2,61	A24B51	10	1,20
A2B44	22	2,40	A33B14	10	1,20
A2B45	20	2,17	A1B7	10	1,20
A2B7	19	2,07	A1B52	10	1,20
A2B18	18	1,96	A3B50	10	1,20
A24B35	18	1,96	A3B18	10	1,20
A24B18	17	1,85	A30B7	9	0,98
A1B51	17	1,85	A30B50	9	0,98
A1B44	16	1,74	A24B44	9	0,98
A30B51	14	1,52	A24B45	9	0,98
A1B58	13	1,41	A24B8	9	0,98
A3B7	13	1,41	A33B65	9	0,98
A2B58	13	1,41	A11B52	9	0,98
A24B7	13	1,41	A68B7	9	0,98
A68B18	13	1,41	A1B8	9	0,98
A3B44	12	1,30	A2B8	9	0,98
A3B45	12	1,30	A3B45	9	0,98
A2B35	12	1,30	A3B49	9	0,98
A23B49	11	1,20	A1B53	8	0,87
A23B44	11	1,20	A2B49	8	0,87
A3B51	11	1,20	A3B65	8	0,87
A1B35	11	1,20	A3B9	8	0,87
A1B49	11	1,20	A68B44	8	0,87
A1B57	11	1,20			

	Effectif	Fr%
A68B49	8	0,87
A68B53	8	0,87
A33B44	7	0,76
A11B44	7	0,76
A11B51	7	0,76
A11B49	7	0,76
A23B35	7	0,76
A1B18	7	0,76
A68B51	7	0,76
A2B53	7	0,76
A2B41	7	0,76
A2B39	6	0,65
A1B50	6	0,65
A2B27	6	0,65
A2B52	6	0,65
A30B52	6	0,65
A24B14	6	0,65
A33B49	6	0,65
A33B53	6	0,65
A23B45	6	0,65
A68B65	6	0,65
A1B14	5	0,54
A1B38	5	0,54
A1B27	5	0,54
A1B63	5	0,54
A1B17	5	0,54
A2B15	5	0,54
A2B13	5	0,54

	Effectif	Fr%
A3B63	5	0,54
A1B17	5	0,54
A2B15	5	0,54
A2B13	5	0,54
A24B38	5	0,54
A33B7	5	0,54
A33B50	5	0,54
A11B35	5	0,54
A23B18	5	0,54
A30B49	4	0,43
A24B49	4	0,43
A24B50	4	0,43
A24B65	4	0,43
A33B52	4	0,43
A33B35	4	0,43
A33B51	4	0,43
A68B35	4	0,43
A68B50	4	0,43
A33B51	4	0,43
A68B35	4	0,43
A68B50	4	0,43
A68B52	4	0,43
A68B15	4	0,43
A1B41	4	0,43
A1B41	4	0,43
A2B17	4	0,43
A2B21	4	0,43
A3B38	4	0,43

Dans cette série de **460** sujets, les haplotypes les plus fréquemment rencontrés sont : **A2 B53, A30 B44, A2 B50, A2B44, A2 B45, A2 B7, A2 B18, A24 B35, A24 B18, A1 B51, A1 B44, A30 B51.**

b) Haplotype B/C :

Total d'effectifs = 415.

Tableau 14 : Fréquences des haplotypes B/C retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.

	Effectif	Fr%
B49C7	20	2,17
B14C8	19	2,07
B50C6	18	1,96
B44C5	17	1,85
B7C7	16	1,74
B51C15	15	1,63
B8Cw7	14	1,52
B45C7	14	1,52
B35C4	13	1,41
B44C7	13	1,41
B45C6	13	1,41
B38C12	12	1,30
B15C7	11	1,19
B58C7	11	1,19
B44C4	11	1,19
B41C17	9	0,98
B15C3	8	0,87
B51C16	8	0,87
B7 C3	7	0,77
B18 C5	7	0,77
B57 C6	7	0,77
B51 C7	7	0,77
B44C12	7	0,77
B40C2	6	0,65
B27C2	6	0,65

	Effectif	Fr%
B14C6	6	0,65
B44C6	6	0,65
B14C7	6	0,65
B51C8	6	0,65
B50C12	6	0,65
B51C12	6	0,65
B51C14	6	0,65
B44C2	5	0,54
B58C2	5	0,54
B53C4	5	0,54
B52C7	5	0,54
B44C16	5	0,54
B45C16	5	0,54
B42C17	5	0,54
B50C17	5	0,54
B52C1	4	0,43
B15C2	4	0,43
B45C2	4	0,43
B50C4	4	0,43
B8C4	4	0,43
B35C6	4	0,43
B49C6	4	0,43
B18C7	4	0,43
B39C7	4	0,43
B44C8	4	0,43
B44C15	4	0,43

Dans cette série de **415** sujets, les haplotypes les plus fréquemment rencontrés sont : **B49C7**, **B14C8**

a) Haplotype DR/DQ :

Tableau 15: Fréquences des haplotypes DR/DQ retrouvés au sein de la population algérienne étudié

	Effectif	Fr%		Effectif	Fr%
DR7DQ2	72	7,83	DR11DQ1	13	1,41
DR52DQ2	67	7,29	DR3DQ1	13	1,41
DR3DQ2	65	7,07	DR11DQ5	12	1,30
DR15DQ6	64	6,96	DR11DQ6	12	1,30
DR4DQ3	59	6,41	DR7DQ5	11	1,20
DR53DQ2	52	5,65	DR13DQ1	11	1,20
DR13DQ6	50	5,43	DR52DQ5	10	1,09
DR52DQ6	45	4,90	DR7DQ1	10	1,09
DR52DQ7	44	4,79	DR13DQ7	10	1,09
DR4DQ 2	36	3,91	DR10DQ 1	10	1,09
DR11DQ2	34	3,70	DR13DQ5	10	1,09
DR11DQ3	33	3,59	DR51DQ1	9	0,98
DR51DQ6	31	3,37	DR4DQ5	9	0,98
DR15DQ2	28	3,05	DR17DQ2	9	0,98
DR11DQ7	28	3,05	DR8DQ7	9	0,98
DR53DQ3	26	2,83	DR7DQ7	8	0,87
DR13DQ2	26	2,83	DR16DQ5	8	0,87
DR4DQ4	26	2,83	DR15DQ1	8	0,87
DR4DQ6	26	2,83	DR3DQ7	8	0,87
DR1DQ 5	26	2,83	DR3DQ4	7	0,76
DR7DQ6	26	2,83	DR3DQ8	7	0,76
DR1DQ2	25	2,72	DR14DQ2	6	0,65
DR1DQ 6	25	2,72	DR15DQ8	6	0,65
DR53DQ1	24	2,61	DR14DQ5	6	0,65
DR7DQ3	22	2,40	DR15DQ5	6	0,65
DR53DQ7	21	2,29	DR11DQ8	6	0,65
DR3DQ 6	21	2,29	DR53DQ5	5	0,54
DR52DQ1	21	2,29	DR8DQ6	5	0,54
DR51DQ2	21	2,29	DR13DQ8	5	0,54
DR4DQ8	21	2,29	DR11DQ4	5	0,54
DR53DQ8	20	2,17	DR51DQ7	5	0,54
DR1DQ 3	20	2,17	DR15DQ7	5	0,54
DR3DQ 3	20	2,17	DR13DQ4	5	0,54
DR52DQ3	19	2,07	DR51DQ3	4	0,43
DR53DQ4	18	1,96	DR1DQ8	4	0,43
DR4DQ7	18	1,96	DR1DQ4	4	0,43
DR13DQ3	18	1,96	DR12DQ7	4	0,43
DR53DQ6:16	16	1,74	DR3DQ5	4	0,43
DR4DQ1	16	1,74	DR16DQ6	4	0,43
DR52DQ8	15	1,63	DR10DQ6	4	0,43
DR52DQ4	14	1,52	DR8DQ8	4	0,43
DR1DQ1	14	1,52	DR8DQ2	4	0,43
DR15DQ3	14	1,52	DR7DQ8	4	0,43
			DR16DQ2	4	0,43
			DR17DQ6	4	0,43

Dans cette série de **408** sujets, les haplotypes les plus fréquemment rencontrés sont : **DR7DQ2, DR52DQ2, DR3DQ2, DR15DQ6**

d) Haplotype A/B/DR :

Total d'effectifs = 249

Tableau 16 : Fréquences des haplotypes **A/B/DR** retrouvés au sein de la population algérienne étudiée

	Effectif	Fr%		Effectif	Fr%
A30B44DR7	14	1,52	A2B44DR53	6	0,65
A2B50DR7	12	1,30	A2B44DR51	6	0,65
A30B44DR53	9	0,98	A2B45DR4	6	0,65
A30B4DR1	8	0,88	A2B7DR52	6	0,65
A30B4 DR4	8	0,88	A2B18DR52	6	0,65
A30B4 DR52	8	0,88	A2B50DR52	5	0,54
A24B35DR52	8	0,88	A2B45DR7	5	0,54
A2B44DR52	8	0,88	A2B7DR11	5	0,54
A2B44 DR7	8	0,88	A2B7DR15	5	0,54
A2B18DR3	8	0,88	A2B18DR4	5	0,54
A2B44DR4	7	0,76	A33B65DR1	4	0,54
A2B45DR53	7	0,76	A30B44DR3	4	0,43
A2B45 DR1	7	0,76	A30B44DDR15	4	0,43
A2B45 DR11	7	0,76	A2B50DR1	4	0,43
A2B45 DR15	7	0,76	A2B50DR3	4	0,43
A2B18DR11	7	0,76	A2B44DR7	4	0,43
A2B35DR4	7	0,76	A2B44DR15	4	0,43
A33B14DR1	6	0,65	A2B7DR3	4	0,43
A23B49DR11DR5	6	0,65	A2B18DR15	4	0,43
2					
A2B50DR53	6	0,65			

Dans cette série de **249** sujets, les haplotypes les plus fréquemment rencontrés sont : **A30B44DR7, A2B50DR7 et A30B44DR5**

e) Haplotype A/B/DR/DQ:

Tableau 17: Fréquences des haplotypes **A/B/DR/DQ** retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.

	Effectif	Fr%
A2B50DR7DQ2	13	1,41

Dans cette série l'haplotypes les plus fréquents sont : **A2 B50 DR7 DQ2**.

e) Haplotype B/C/DR:

Total d'effectifs = 95.

Tableau 18: Fréquences des haplotypes **B/C/DR** retrouvés au sein de la population algérienne étudiée.

	Effectif	Fr%
B14C8DR1	12	1,30
B44C5DR4	11	1,20
B8C7DR3	10	1,09
B44C5DR53	9	0,98
B44C5DR7	8	0,87
B50C6DR4DR53	7	0,76
B44C5DR1	6	0,65
B44C5DR1	6	0,65
B14C8DR4	5	0,54
B8C7DR53	5	0,54
B14C8DR11DR13DR5 2	4	0,43
B8C7 DR4DR7DR51	4	0,43
B50C6 DR7DR52	4	0,43
B44C5 DR13DR52	4	0,43

Dans cette série de **95** sujets, l'haplotype **B14 C8 DR1** est le plus fréquemment retrouvé.

Discussion

La prise en charge immunologique de la transplantation est capital car celle conditionne la réussite de cette dernière .Elle consiste à établir le statut immunologique (recherche des anticorps anti HLA) de chaque patient, établir la compatibilité HLA entre donneur et receveur d'organe et assurer un suivi régulier avant et après la greffe.

Notre étude rétrospective a été réalisée sur 359 patients algériens issus de cinq région du territoire national ayant bénéficié d'un typage HLA (typage complément ou typage ciblé).

A l'unité d'immunologie **Hassiba Ben Bouali CHU de Blida**, la prise en charge des examens immunologique (typage HLA, recherche et identification des aloo anticorps anti HLA et cross match lymphocytaire) dans le cadre da la transplantation et dans le cadre de la recherche d'une association HLA et maladies, d'année 2006 jusqu'à 2012.

Nous nous sommes intéressées dans ce travail à l'exploration des résultats de la prise en charge immunologique des patients candidats à une greffe rénale entrant dans le cadre d'un donneur vivant apparenté ou cadavérique non apparenté et dans le cadre de le recherche d'une association HLA et maladies .

Caractéristiques démographiques de la population algérienne étudiie

Service demandeur :

L'analyse des résultats de cette étude montre que la majorité de nos patients ont été adressés par **CHU de Blida(57%)** parce que unité immunologique Hassiba Ben Bouali fait partie du **CHU Blida**, suivi par le **CHU de Parnet(12%)**et du **CHU de Tizi ousou(10%)**,les autre patients, ont été adressés par d'autres structures hospitalières du pays à cause de l'absence du laboratoire pour le typage HLA à leur niveaux.

Répartition de359sujets selon l'année de recrutement:

L'existence d'infrastructure au **CHU de Blida** comme celle de l'unité de l'immunologique, lieu de notre étude, nous a permis de recruter la populart de nos sujets(**70%**) ainsi que d'autre rentrant dans le cadre de la collaboration inter **CHU**.

Caractéristique biologique de la population algérienne étudiée :

Exploration du système HLA :

Suite au programme national de translation rénale dont le CHU de Blida fait partie, la majorité des patients adressés à notre niveau pour un typage HLA à la demande des médecins traitants sont des candidats pour la transplantation rénale d'un donneur vivant, lorsque cette dernière est envisagée comme solution thérapeutique.

Statut du couple receveur/donneur dans le cadre de transplantation rénale :

Au total, le laboratoire a été réalisé des examens immunologiques sur **359** receveurs et **359** donneurs1 et **28** donneur2 dans le cadre de transplantation, ce qui explique la possibilité de multipliés des donneurs pour un même receveur.

Années de typage des sujets recrutés dans le cadre de transplantation rénale :

Le nombre élevé des sujets explorés à notre niveau dans le cadre de transplantation rénale durant la période **2007/2008** est expliqué par la collaboration inter hospitalière durant cette période.

Classe et locus HLA typés :

Le typage HLA se fait soit par une méthode sérologique (**LCT**), qui permet d'identifier les Ag exprimés à la surface des cellules, soit par une technique de biologie moléculaire qui permet l'identification des gènes HLA du patient. Au début, le laboratoire a utilisé la technique sérologique pour le typage HLA de classe I en considérant la classe II presque identique en cas de compatibilité de la classe I (les loci A et B) entre le donneur et le receveur. Ceci explique la discordance dans le nombre des allèles explorés entre les deux classes.

Ensuite, la technique de biologie moléculaire a été lancée au niveau du laboratoire ce qui nous a permis d'identifier le locus HLA-C. Et par la suite, il y avait l'utilisation des 2 techniques pour le typage des 2 classes HLA, à l'exception du locus HLA-DP en raison d'absences des moyens.

La discordance dans le nombre des allèles explorés HLA-DR et DQ est expliquée par la présence des malades adressés au laboratoire pour un typage HLA ciblé (HLA et maladies).

Cross match :

Le cross match pré transplantation est pratiqué systématiquement pour détecter les différents allo anticorps anti donneur pouvant être présents chez le receveur. C'est le reflet du statut immunitaire sérologique du receveur vis-à-vis de l'organe greffé.

a-Cross match donneur1 :

Dans notre série d'étude **6,41**^{°/°} des patients qui ont bénéficié d'un test cross match ont présenté un résultat positif, du à la présence des DSA dans leur sérums .La greffe dans ce cas est contre indiquée.

Le test était négatif chez **91,64**^{°/°} des patients, ce qui autorise la greffe.

b- Cross match donneur2 :

Parmi les patients ayant un CXM donneur1 négatif, seul **12,82**^{°/°} ont fait un CXM pour donneur 2.

La positivité des résultats est observée chez **10,71**^{°/°} des patients, laisse suggérer la pratique des transfusions, alors que la négativité de ce dernier est observée chez **75**^{°/°} des patients ce qui autorise la greffe.

Les allo AC anti HLA de classe 1et 2 :

Les résultats de notre étude montrent que **17,26**^{°/°} des receveurs ont développé des allo-AC-anti HLA de classe 1et **10,03**^{°/°} de classe 2et sont donc immunisé. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné que ces patients suivis ont des antécédents d'immunisation (transfusion, grossesse, avortement, transplantation, rejet de greffe).

Le nombre de greffe par années :

En Algérie la première greffe rénale a été réalisée en juin **1986** avec un rieur de donneur vivant apparenté , mais les programmes ont été assez rapidement interrompus et n'ont repris que lentement dans les années **2000** sous l'impulsion de nouvelles directives ministérielles

qui ont permis d'ériger trois centres de transplantation rénale : Le **CHU d'Alger** centre (Service de Réanimation Polyvalente), **la clinique Daksi de Constantine** (Etablissement Hospitalier Spécialisé en Uro-Néphrologie) et **le CHU de BLIDA** (Service de Chirurgie Générale).

La réaction de ces centres et l'existence d'un cadre de collaboration inter hospitalière afin de répondre au nombre croissant des demandes de greffe rénale , a permis de greffer un grand nombre de patients durant la période **2007/2009**.

La première greffe rénale en Algérie avec un rein d'un donneur cadavérique a été réalisée à Constantine en **2002**.

En **2010**, un typage HLA a été réalisé, pour la première fois, au niveau du **CHU de Blida**, par une équipe de spécialistes en immunologie dans le cadre d'une greffe rénale avec un rein d'un donneur cadavérique , avec la réalisation d'un cross match initial et d'une recherche des allo-anticorps anti-HLA .Pour le cross match final, il a été réalisé au niveau **du CHU de Mustapha Bacha**.

Étude du polymorphisme HLA chez la population algérienne étudiée :

1-Fréquences génotypiques des allèles HLA :

-A l'échelle internationale :

a) HLA-A :

Les allèles HLA-A les plus fréquemment rencontrés au sein de la population algérienne sont **HLA-A2** (23,61%), **A1** (19,13%), **A3** (17,39%) et **A24** (16,96%) ceci est comparable à ceux de la population marocaine pour les allèles **A1**, **A2**, **A3** et **A36**. Ainsi à la population mauritanienne pour les allèles **A1** et **A2** et **A30**. Suggérant des relations entre ces populations. L'allèle **HLA-A36** et **A66** (0,65%) est moins prévalent dans la population algérienne, alors qu'il est fréquent au Mali (3,13%).(**Hamed et al.,2018**)

b) HLA-B :

Les allèles HLA-B les plus fréquents au sein de notre population sont **HLA-B7**, **B35**, **B72**, **B51**, ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour les pays maghrébins (**Amroun H et al.,2010**) beaucoup proche à Mauritanie et qui peuvent être expliqués par la proximité géographique entre ces pays

c) HLA-C :

Concernant les allèles HLA-C, les plus prévalent sont **HLA-C7** (42,44%), **C6** (27,33%), ces résultats sont en concordance avec la population tunisienne qui peut être expliqués par la distance géographique entre ces deux pays. Ainsi, pour l'allèle **HLA-C4** (19,77%) est plus rencontré chez la population algérienne par rapport à la population mauritanienne (0,88%). (**C. Bricka et al.,2015**)

d) HLA-DR :

Les allèles HLA-DR les plus fréquemment rencontrés au sein de la population algérienne sont **HLA-DR4, DR11, DR3** ceci est comparable à celles des populations marocaine (**Amroun Het al.,2010**) et tunisienne. Ainsi nos résultats est similaire à ceux de la Tunisie à l'exception de l'allèle **HLA-DR15** qui est moins fréquent chez eux, ce qui caractérise la population algérienne.

e) HLA-DQ :

D'après nos résultats, les allèles **HLA-DQ2 et DQ3, DQ6** sont fréquents chez toutes les populations mentionnées.

L'allèle **HLA-DQ4** est moins fréquent en Algérie ainsi qu'en Mauritanie avec des fréquences voisines, ce qui caractérise les pays du nord-africain. (**GAOH Hadiza.,2006**)

2-Fréquences haplotypiques :

Dans cette partie, on n'a pas trouvé des études similaires en **Algérie** et en **Maroc** (**Amroun H et al.,2010**) pour les haplotypes : **A/B, B/C**.

a) Haplotypes A/B :

Les haplotypes **A/B** les plus fréquemment rencontrés dans notre étude :

L'haplotype **A2/B7 (2,07%)** est le plus représentatif de notre population étudiée. Ce résultat est en accord avec celui observé à **Mauritanie** (**C. Bricka et al.,2015**), suggérant une relation entre ces deux pays.

b) Haplotypes B/C :

Nos résultats concernant les haplotypes **B/C** montrent une similarité avec ceux obtenus pour la population tunisienne. (**ADEME et al.,2015**)

c) Haplotypes DR/DQ :

Les résultats des haplotypes **DR/DQ** une similarité concernant majorités des haplotypes cité pour la population algérienne et marocaine. (**Amroun H et al.,2010**)

d) Haplotypes A/B/DR :

L'haplotype **A33 B14 DR1** est retrouvé chez les populations méditerranéennes (**Hamed et al.,2018**) (**S. Manor et al.,2016**) (**GAOH Hadiza.,2006**) avec des fréquences voisines.

e) Haplotypes A/B/DR/DQ:

L'haplotype **A2 B50 DR7 DQ2** est rencontré chez la population algérienne et italienne (**D. Reviron et al.,1993**) avec des fréquences proches. Laisse suggérer une relation historique (migration) entre les deux populations

Conclusion:

Notre étude met en évidence une augmentation de la prévalence des anticorps anti-HLA chez les patients de greffe rénale au CHU de Blida, mais sont difficiles à suspecter : ils apparaissent indépendamment de l'âge, du sexe, des événements immunisants, et ne sont pas associés à un profil particulier sur les résultats de dépistage. avec un impact sur l'accès à la greffe. Près de la moitié de ces patients immunisés n'ont pas d'antécédent d'événement immunisant. Ces résultats demandent à être confirmés en raison du faible effectif de l'étude, de sa nature rétrospective.

Nous avons mené cette étude dans le but d'explorer les résultats du typage HLA des patients candidats à la transplantation rénale et en les comparant avec d'autres études similaires.

L'analyse de nos résultats montre parfois des discordances des nombres des allèles HLA obtenus, ces discordances peuvent être la cause indirecte du manque des informations récoltées par difficulté d'accès aux données.

Ainsi, notre travail montre que nos résultats sont comparables à ceux obtenus par d'autres études menées précédemment, ce qui conforte la notion de l'homogénéité existante au sein de la population maghrébine dont fait partie notre population algérienne.

Notre étude a montré que les allèles les plus fréquents sont : HLA-A2, HLA-B44, HLA-C7, HLA-DRβ1*04 et HLA-DQ2. Et concernant les haplotypes les plus fréquents, on a : A2/B53, A30/B44/DR7, A2/B50/DR7/DQ2, B14/C8/DR1 et DR7/DQ2

Il sera utile de :

- Compléter notre travail, par des typages HLA de haute résolution pour une meilleure définition des allèles ainsi que des haplotypes les plus fréquemment rencontrés dans notre série.
- Créer de forts liens de collaboration entre les professionnels de santé principalement de service de néphrologie et le laboratoire d'histocompatibilité.
- Etablir une bonne communication entre les différents centres nationaux de transplantation.

Dans notre population étudiée, parmi 359 patients receveurs typés dans le cadre de transplantation rénale, seul 105 patients ont bénéficié de la greffe. Ce nombre réduit des patients greffés peut être expliqué par :

- L'incompatibilité HLA du couple receveur/ donneur.
- Désistement des donneurs.
- Le non-retour de l'information et l'absence de la collaboration inter CHU.

REFERENCES :**A**

- A. Maffei and P. E. Harris, "Peptides bound to major histocompatibility complex molecules" *Peptides*, vol. 19, no. 1, pp. 179–198, 1998.
- A. Maffei, K. Papadopoulos, and P. E. Harris "MHC class I antigen processing pathways," *Hum. Immunol.*, vol. 54, no. 2, pp. 91–103, 1997.
- A. Maffei and P. E. Harris, "Peptides bound to major histocompatibility complex molecules" *Peptides*, vol. 19, no. 1, pp. 179–198, 1998.
- A. Maffei, K. Papadopoulos, and P. E. Harris "MHC class I antigen processing pathways," *Hum. Immunol.*, vol. 54, no. 2, pp. 91–103, 1997 EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 2004;5:889-99.
- A. L. Hughes, "Origin and evolution of HLA class I pseudogenes" *Mol. Biol. Evol.*, vol. 12, no. 2, pp. 247–258, 1995.
- A.-M. Fillet and B. Sénéchal, "Infection à cytomégalo virus" *John Libbey Eurotext*, vol. 6, no. 1, pp. 46–65, 2000
- Abdelhafidh Hajjej, Wassim Y. Almawi, Lasmar Hattab, Amel El-Gaaied Slama Hmida, « HLA Class I and Class II Alleles and Haplotypes Confirm the Berber Origin of the Present-Day Tunisian Population », 2015.
- Augustine JJ, Woodside KJ, Padiyar A, Sanchez EQ, Hricik DE, Schulak JA. Independent of nephrectomy, weaning immuno suppression leads to late sensitization after kidney transplant failure. *Transplantation*. 2012 Oct 15;94(7):738–43.
- A_B_DRB1 haplotype frequencies from the Ezer Mizion Bone Marrow Donor Registry, *Hum Immunol* 2016.
- A. P. Brézin, D. Monnet, J. H. M. Cohen, and R. D. Levinson, "HLA-A29 and Birdshot Chorioretinopathy" *Ocul. Immunol. Inflamm.*, vol. 19, no. 6, pp. 397–400, Dec. 2011.
- ADEME. Jean-Michel Monier et Sébastien Cécillon. 2015. Les outils de biologie moléculaire et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollués – Synthèse. 39 pages.
- Amroun H. Mecabih F., Bensalah N., Yourmouche H., Babaci K, Attal N., Abbadi M.C. « Fréquences alléliques et haplotypiques HLA-A-A, -B et -Cw dans la population algérienne » *PLOS ONE* | DOI : 10.1371/journal.pone.0136909 August 28, 2015.

B

- Bryan CF, Martinez J, Muruve N et al. IgM antibodies identified by a DTT-ameliorated positive crossmatch do not influence renal graft outcome but the strength of the IgM lymphocytotoxicity is associated with DR phenotype. *Clin Transplant* 2001;15(suppl. 6):28-35.
- Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2:401-9.
- Bonsib SM, Abul-Ezz SR, Ahmad I, et al. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2000;58:2206-14.
- Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE, «The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases» *Nucleic Acids Research* 43: D423-431, 2015.
- Baron C, Pastural M, Lang P et al. Long-term kidney graft survival across a positive historic but negative current sensitized cross-match. *Transplantation* 2002;73,2:232-6.
- Bryan CF, Shield CF, Warady BA et al. Influence of an historically positive crossmatch on cadaveric renal transplantation. *Transplant Proc* 1999;31,1- 2:225-7.

C

- C. Bricka, O. Atoufa, M. Essakallia, *b Transfusion Clinique et Biologique* 22 (2015) 299–311.
Hamed et al. *BMC Medical Genetics* (2018) 19:2 mauritanie.

- Charron DJ, Lotteau V, Turmel P. Hybrid HLA-DC antigens provide molecular evidence for gene trans-complementation. *Nature* 1984;312: 157-9.
- Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001;71,5:652-8.
- Cardella CJ, Falk JA, Nicholson MJ, Harding M, Cook GT. Successful renal transplantation in patients with T-cell reactivity to donor. *Lancet* 1982;2,8310:1240-3.
- Carosella ED. From MAC to HLA: Professor Jean Dausset, the pioneer. *Hum Immunol* 2009;70(9):661-2.
- Chapman JR, Taylor CJ, Ting A, Morris PJ. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Relationship to renal transplant outcome. *Transplantation* 1986;42,6:608-13.

D

- Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 1975;256: 50-2.
- D. Russell, "A binding site for the TCR co-receptor CD8 and the alpha3 domain of HLA-A2" *Nature*, vol. 345, 1990.
- Del Bello A, Congy-Jolivet N, Muscari F, Lavayssière L, Esposito L, Cardeau-Desangles I, et al. Prevalence, incidence and risk factors for donor-specific anti-HLA antibodies in maintenance liver transplant patients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2014 Apr;14(4):867-75.
- D. Reviron, M. Andr6, J.F. Cantaloube, P. Biagini, C. Chicheportiche, P. Mercier, « Polymorphisme HLA-DRB1 et HLA-DQB1 dans la population algérienne originaire d'Alger », 1993.
- Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Long-term follow-up patients with leukemia receiving platelet transfusions: identification of a large group of patients who do not become alloimmunized. *Blood.* 1981 Nov;58(5):1007-11.
- Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, et al. Angiotensin II type 1-receptor Activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005;352:558-69.
- Djamali et al. *Am J Transplant* 2014.

E

- Elsevier Masson SAS. *Néphrologie & Thérapeutique* Volume 11, Issue 5, September 2015, Page 435PME.
- E. Hosseini, A. P. Schwarzer, and M. Ghasemzadeh, "Do human leukocyte antigen E polymorphisms influence graft-versus-leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation?" *Exp. Hematol.*, Nov. 2014.
- E. D. Carosella, "From MAC to HLA" *Hum. Immunol.*, vol. 70, no. 9, pp. 661-662, Sep. 2009.
- Essakalli M, Atouf O, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S, Brick C. Toll-like récepteurs. *Pathol Biol* 2009;57:430-8.
- El-Awar N, Terasaki P, Lazda V, Nikaein A, Manning C, Arnold AN. Almost all patients who are waiting for a regraft of a kidney transplant have anti- HLA antibodies. *Transplant Proc* 2002; 34, 7:2531-2.
- E. D. Carosella, "From MAC to HLA" *Hum. Immunol.*, vol. 70, no. 9, pp. 661-662, Sep. 2009.

F

- Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993;43,6:1333-8.

Farkash EA, Colvin RB. Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection. *Nat Rev Nephrol.* 2012 Mar 27;8(5):255–7.

G

Cid J, Carbassé G, Andreu B, Baltanás A, Garcia-Carulla A, Lozano M. Efficacy and safety of plasma exchange: an 11-year single-center experience of 2730 procedures in 317 patients. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis.* 2014 Oct;51(2):209–14.

Goeken NE. Outcome of renal transplantation following a positive cross-match with historical sera: the ASHI survey. *Hum Immunol* 1985;14,2:77- 85.

Goldstein DR. Toll-like receptors and allograft rejection. *Transpl Immunol* 2006;17:11–5.

Goekmen MR, Lombardi G, Lechler RI. The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:568–74.

H

Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2018;18(2):293–307.

Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, DellaPelle P, Madsen JC, Russell PS, et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2010 Mar;10(3):510–7..

Halloran PF, Venner JM, Madill-Thomsen KS, Einecke G, Parkes MD, Hidalgo LG, et al. Review: The transcripts associated with organ allograft rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2018 Apr;18(4):785–95.

Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I mediated rejection. *Transplantation* 1990;49:85-91.

Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 1992;53:550-5.

Hönger G, Fornaro I, Granado C, Tiercy J-M, Hösli I, Schaub S. Frequency and determinants of pregnancy-induced child-specific sensitization. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2013 Mar;13(3):746–53.

I

Ikhtiar et al. *BMC Res Notes* (2018) 11 :324 <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3427-1>.

Imagawa DK, Millis JM, Seu P, et al. The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. III. Evidence that anti-TNF antibody therapy prolongs allograft survival in rats with acute rejection. *Transplantation* 1991;51:57-62.

J

Joosten SA, Van Dixhoorn MG, Borrias MC, Benediktsson H, Van Veelen PA, Van Kooten C, et al. Antibody response against percalan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* 2002; 160:1301–10.

J. Dausset and M. Pla, *HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'Homme*, Flammarion. 1993.

J. Dausset and M. Pla, *HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'Homme*, Flammarion. 1993

J. P.-Y. Ting and J. Trowsdale, “Genetic control of MHC class II expression” *Cell*, vol. 109, no. 2, pp. S21–S33, 2002

<http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>

- J.-F. Eliaou, "Immunité adaptative : structures reconnues (CMH et antigènes)" 2007.
 "HLA Nomenclature @ hla.alleles.org" [Online]. Available:
<http://hla.alleles.org/genes/index.html>. [Accessed: 22-Feb-2015].
- J. Proll, M. Danzer, S. Stabentheiner, N. Niklas, C. Hackl, K. Hofer, S. Atzmüller, P. Hufnagl, C. Gully, H. Hauser, O. Krieger, and C. Gabriel, "Sequence Capture and Next Generation Resequencing of the MHC Region Highlights Potential Transplantation Determinants in HLA Identical Haematopoietic Stem Cell Transplantation" *DNA Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 201–210, Aug. 2011
- J. Klein, "George Snell's first foray into the unexplored territory of the major histocompatibility complex" *Genetics*, vol. 159, no. 2, pp. 435–439, 2001.
- K**
- Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009;119:1417-9.
- Karpinski M, Pochinco D, Dembinski I, Laidlaw W, Zacharias J, Nickerson P. Leukocyte reduction of red blood cell transfusions does not decrease allosensitization rates in potential kidney transplant candidates. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2004 Mar;15(3):818–24. 59
- Kakaiya RM, Triulzi DJ, Wright DJ, Steele WR, Kleinman SH, Busch MP, et al. Prevalence of HLA antibodies in remotely transfused or alloexposed volunteer blood donors. *Transfusion (Paris)*. 2010 Jun;50(6):1328–34.
- Koenig A, Chen C-C, Marcais A, et al. Missing self triggers NK cell-mediated chronic vascular rejection of solid organ transplants. *Nat Commun* 2019 ; 10 : 5350.
- Terasaki Pi, Mac Clelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964 ;204 :998—1000.
- Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007;13:552–9.
- Lolme`de K, Rovere-Querini P. Rôle du facteur high mobility group box 1 (HMGB1) dans l'induction des réponses immunitaires dirigées contre les cellules mortes. *Pathol Biol* 2009;57:217–8.
- Kaneku H, O'Leary JG, Banuelos N, Jennings LW, Susskind BM, Klintmalm GB, et al. De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013 Jun;13(6):1541–8.
- Kyllonen LE, Salmela KT, Koskimies SA. The clinical significance of conversion of complement-dependent cytotoxic T cell crossmatch test after renal transplantation. *Transpl Int* 1999;12,6:423-8.
- K. L. Rock and L. Shen, "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance" *Immunol. Rev.*, vol. 207, no. 1, pp. 166–183, 2005.
- K. L. Rock and L. Shen, "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance" *Immunol. Rev.*, vol. 207, no. 1, pp. 166–183, 2005.
- Khalil I, Deschamps I, Lepage V, al-Daccak R, Degos L, Hors J. Dose effect of cis- and trans-encoded HLA-DQ alpha beta heterodimers in IDDM susceptibility. *Diabetes* 1992;41:378-84.
- L**
- Land WG. Innate alloimmunity: history and current knowledge. *Exp Clin Transplant* 2007;5:575–84
- Legendre C, Zuber J, Anglicheau D, Le Quintrec M, Martinez F, Mamzer-Bruneel MF, et al. Immunosuppression en transplantation renale. *Ann Urol (Paris)* 2007;41:276–84.
- Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med*. 2018 20;379(12):1150–60..

Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the longterm survival of renal allografts. *Kidney Int* 2001;59,1:334-41.

Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002;74,8:1192-4.

L. Klein, B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist, "Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)" *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 6, pp. 377–391, May 2014..

L. Pichon, T. Giffon, B. Chauvel, J.-Y. Le Gall, and V. David, "La région HLA de classe I du CMH: une des régions les plus complexes du génome humain?" 1996.

L. Pichon, T. Giffon, B. Chauvel, J.-Y. Le Gall, and V. David, "La région HLA de classe I du CMH: une des régions les plus complexes du génome humain?" 1996.

M

M. A. Pabón, C. E. Navarro, J. C. Osorio, N. Gómez, J. P. Moreno, A. F. Donado, H. C. Pérez, and E. Lozano, "Impact of Human Leukocyte Antigen Molecules E, F, and G on the Outcome of Transplantation" *Transplant. Proc.*, vol. 46, no. 9, pp. 2957–2965, Nov. 2014.

Mahoney RJ, Taranto S, Edwards E. B-cell crossmatching and kidney allograft outcome in 9031 United States transplant recipients. *Hum Immunol* 2002;63,4:324-35.

Mauviyyedi S, Crespo M, Collins AB et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002;13,3:779-87.

M. Braud, D. S. Allan, and A. J. McMichael, "Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules" *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 100–108, 1999.

Marfo, K., Lu, A., Ling, M. & Akalin, E. Desensitization protocols and their outcome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 6, 922–936 (2011).

Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Rife G. Detection of donor-specific anti- HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2003;76,2: 395-400.

Mauviyyedi S, Pelle PD, Saidman S et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001;12,3:574-82.

Morrell MR, Pilewski JM, Gries CJ, Pipeling MR, Crespo MM, Ensor CR, et al. De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant.* 2014 Dec;33(12):1288–94.

Masson E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I, et al. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum Immunol.* 2013 Aug;74(8):946–51.

Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RNJ, et al. Serial tenyear follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant* 2005;5:2265–72.

Murata K, Baldwin WM. Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev Orlando Fla.* 2009 Jul;23(3):139–50.

Mongkolsuk T, Chiewsilp P, Sujirachato K, Sumethkul V, Jirasiritham S, Chalermksanyakorn P et al. Preexisting antibodies: the clinical relevance of auto-B-lymphocyte antibody and positive B-cell crossmatch. *Transplant Proc* 1996;28,3:1215-6

- M. A. Pabón, C. E. Navarro, J. C. Osorio, N. Gómez, J. P. Moreno, A. F. Donado, H. C. Pérez, and E. Lozano, "Impact of Human Leukocyte Antigen Molecules E, F, and G on the Outcome of Transplantation" *Transplant. Proc.*, vol. 46, no. 9, pp. 2957–2965, Nov. 2014.
- Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Hum Immunol* 2005;66:571-636.
- M. D. Varney, C. E. M. Voorter, G. F. Fischer, K. Fleischhauer, D. Goodridge, W. Klitz, A.-M. Little, M. Maiers, S. G. E. Marsh, C. R. Müller, H. Noreen, E. H. Rozemuller, A. Sanchez-Mazas, D. Senitzer, E. Trachtenberg, and M. Fernandez-Vina, "Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue: CWD 2.0.0 catalogue" *Tissue Antigens*, vol. 81, no. 4, pp. 194–203, Apr. 2013.
- M. Labalette, "Le complexe majeur d'histocompatibilité humain (HLA)".
- T. K. Starr, S. C. Jameson, and K. A. Hogquist, "Positive and negative selection of T cells" *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, no. 1, pp. 139–176, Apr. 2003
- Mizutani K, Terasaki P, Shih RNJ, Pei R, Ozawa M, Lee J. Frequency of MIC antibody in rejected renal transplant patients without HLA antibody. *Hum Immunol* 2006;67:223–9
- N**
- N. Lee, A. Ishitani, and D. E. Geraghty, "HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes" vol. 40, no. 8, pp. 2308–2318, 2010
- Nogueira E, Campos Ponciano V, Naka EL, Marques GDM, Cenedeze MA, Saraiva Ca^mara NO, et al. Toll-like receptors-related genes in kidney transplant patients with chronic allograft nephropathy and acute rejection. *Int Immunopharmacol* 2009;9:673–6.
- O**
- O'Malley KJ, Cook DJ, Roeske L et al. Acute rejection and the flow cytometry crossmatch. *Transplant Proc* 1999;31,1-2:1216-7.
- P**
- Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280:735-9.
- Porrett PM. Biologic mechanisms and clinical consequences of pregnancy alloimmunization. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2018 May;18(5):1059–67.
- Piazza A, Poggi E, Borrelli L et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: post-transplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 2001;71,8:1106-12.
- Piazza A, Borrelli L, Monaco PI et al. Posttransplant donor-specific antibody characterization and kidney graft survival. *Transpl Int* 2000;13(suppl. 1):S439-43.
- Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, et al. Recent advances in renal transplantation: Antibody-mediated rejection takes center stage. *F1000prime Rep* [Internet] 2015 [cited 2017 Apr 11];7. Available from: <http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC4447042/>
- Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998.
- P. Le Bouteiller and F. Lenfant, "Gène HLA-G: le plus classique des non classiques" 1997.
- P. J. van den Elsen, T. M. Holling, H. F. Kuipers, and N. van der Stoep, "Transcriptional regulation of antigen presentation" *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 67–75, Feb. 2004.
- R**
- R. A. Goldsby, T. J. Kindt, and B. A. Osborne, *Immunologie : Le cours de Janis Kuby*, Dunod. p.182, 2000.

Reed E, Hardy M, Benvenisty A et al. Effect of anti-idiotypic antibodies to HLA on graft survival in renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 1987;316, 23:1450-5.
Rhodes DA, Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet* 1999;1: 21-31.

Robertson H, Kirby JA. Post-transplant renal tubulitis: the recruitment, differentiation and persistence of intra-epithelial T cells. *Am J Transplant* 2003;3:3-10.
Racusen LC, Colvin RB, Solez K et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003;3,6:708-14.
Reisner EG, Kostyu DD, Phillips G, Walker C, Dawson DV. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. *Tissue Antigens*. 1987 Oct;30(4):161-6.

S

Sanfilippo F, Vaughn WK, Spees EK, Bollinger RR. Cadaver renal transplantation ignoring peak-reactive sera in patients with markedly decreasing pretransplant sensitization. *Transplantation* 1984;38,2:119-24.

Sarwal M, Chua MS, Kambham N et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003;349:125-38.
Shimizu A, Colvin RB, Yamanaka N. Rejection of peritubular capillaries in renal allo- and xenograft. *Clinical Transplantation* 2000;14,S3:S6-S14.
S. Manor et al./*Human Immunology* xxx (2016) xxx-xxx. Manor et al., High-resolution HLA Variabilité génétique du système HLA après stimulation par des épitopes du VIH-1. *SEYDOU GAOH Hadiza, Juillet 2006*, 17-18.

Speiser DE, Jeannot M. Renal transplantation to sensitized patients: decreased graft survival probability associated with a positive historical crossmatch. *Transpl Immunol* 1995;3:330-4.
Steven K. Takemoto, A. Zeevi, S. Feng, R.B. Colvin, S. Jordan, J. Kobashigawa, J. Kupiec Weglinski, A. Matas, R.A. Montgomery, P. Nickerson, J.L. Platt, H. Rabb, R. Thistlewaite, Doly Tyan, F.L. Delmonico. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation *American Journal of Transplantation*; 2004; 4:1033-1041.
Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Inoko H. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. 1999;167:193-9.

T

Taylor CJ, Chapman JR, Ting A, Morris PJ. Characterization of lymphocytotoxic antibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation. Relationship to primary and re-raft outcome. *Transplantation* 1989;48,6:953-8.

Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion (Paris)*. 2009 Sep;49(9):1825-35.

Thervet E, Zuber J, Sberro R, Canaud G, Anglicheau D, Snanoudj R, et al. Traitements immunosuppresseurs : mécanismes d'action et utilisation clinique. *EMC Néphrologie* 2009 [18-065-F-10]

V

V. M. Braud, D. S. Allan, and A. J. McMichael, "Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules" *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 100-108, 1999.1

Van Oosterhout C. A new theory of MHC evolution: beyond selection on the immune genes. *Proc Biol Sci*. 2009 Feb 22;276(1657):657-65.

Vaidya S, Ruth J. Contributions and clinical significance of IgM and autoantibodies in highly sensitized renal allograft recipients. *Transplantation* 1989;47,6:956-8.

Van Kampen CA, Versteeg-Van der Voort Maarschalk MF, Roelen DL, Claas FH. Primed CTLs specific for HLA class I may still be present in sensitized patients when anti-HLA antibodies have disappeared: relevance for donor selection. *Transplantation* 2002;73,8:1286
van Kampen CA, Versteeg-vd Voort Maarschalk MFJ, Langerak-Langerak J, Roelen DL, Claas FHJ. Kinetics of the pregnancy-induced humoral and cellular immune response against the paternal HLA class I antigens of the child. *Hum Immunol.* 2002 Jun;63(6):452–8.

W

Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2012 May;12(5):1157–67.

Y

Yazdani S, Callemeyn J, Gazut S, Lerut E, de Loor H, Wevers M, et al. Natural killer cell infiltration is discriminative for antibody-mediated rejection and predicts outcome after kidney transplantation. *Kidney Int.* 2019;95(1):188–98.

Z

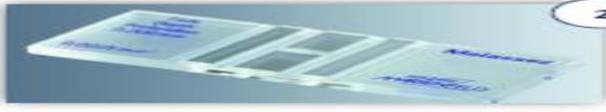
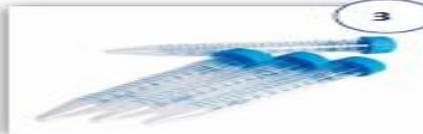
Zorn E, Miklos DB, Floyd BH, et al. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med* 2004;199:1133-42.

Annexe:

Annexe 1 : Version informatisée des dossiers des malades.

N°D	N° Sero	Nom et Prenom	1er prt	Age	Sexe	Service	CHU	1er Dialyse	Nb de Trsf	Grss	Recherche D'Ac		Identification d'Ac		PRA	Greffe	Date G	DOM
											Classe I	Classe II	Classe I	Classe II				
1	01/06	CHIK NOUREDDINE	31/07/2006	23	M	CHG	BLIDA	mai-06	1		neg	neg				oui		CHIKH SAAB
2	03/06	BOUSBAA HALIMA	17/09/2006	19	F	CHG	BLIDA	juil-02	1		neg	neg				oui		BOUSBAA A
3	05/06	ACHOUR MOHAMED	19/09/2006	40	M	CHG	BLIDA	05/01/2006	1		neg	neg						ACHOUR O
4	07/06	DJENANE AMAR	24/09/2006	55	M	CHG	BLIDA	2004	0		neg	neg				oui D2		DJANANE F
5	09/06	BARA SMAIL	26/09/2006	23	M	CHG	BLIDA	juil-04	2		?	?				oui D1		HAMIRA OUL
6	11/06	HALKOU SAID	01/10/2006	32	M	CHG	BLIDA	avr-04	0		neg	neg				oui D1		HALKOU M
7	13/06	HAMRLAIN AL HADJ	03/10/2006	31	M	CHG	BLIDA	2006 JAN	0		neg	neg				oui D1		HAMRLAIN
8	15/06	MANSOUR BELKACEM	08/10/2006	29	M	CHG	BLIDA	2004	6		neg	neg						MANSOUR
9	17/06	ZEKOUDA AMMAR	10/10/2006	30	F	CHG	BLIDA	2005	2		pos	pos						ZEKOUDA
10	19/06	HORMA MOHAMED	15/10/2006	28	M	CHG	BLIDA	janv-05	3		neg	neg						MIMOUN M
11	21/06	BOUKAF ABDELKRIM	17/10/2006	36	M	CHG	BLIDA	avr-06	0		neg	neg				oui D2		BOUKAF O
12	23/06	ACHOUR ZOHRRA	31/10/2006	3	F	CHG	BLIDA	juin-04	0		neg	neg						ACHOUR D
13	25/06	BOURABA YUCEF	04/11/2006	30	M	CHG	BLIDA	oct-05	1		neg	neg						BOURABA
14	27/06	ABIZA SGHIRA	14/11/2006	48	F	CHG	BLIDA	1990	1		pos	neg				oui		YOUSFI AB
15	29/06	METLAINE AMINA	09/11/2006	18	F	CHG	BLIDA	2005	6		neg	neg				oui		NAJARI F
16	31/07	DIB LACERA	25/02/2007	41	F	CHG	BLIDA	2006	0		pos	pos				oui		DIB LALAH
17	33/07	BERRAF YAHIA	27/02/2007	25	M	CHG	BLIDA	sept-06	3		neg	neg						BERRAF N
18	35/07	LARIBI ZINEB	04/03/2007	57	F	CHG	BLIDA	2005	3		pos	pos						TRAKI ZOU
19	41/07	CHAOUCH ABDESAM	18/03/2007	22	M	CHG	BLIDA		2		neg	neg						HAMOUDA
20	43/07	SELLAOUI OURDA	20/03/2007	26	F	CHG	BLIDA	mars-06	7		pos	pos						SANDI HAN
21	45/07	BAKOUCHE ISMAIL	25/03/2007	28	M	CHG	BLIDA	oct-05	1		neg	neg				oui D2		BEKHOUC
22	47/07	OULD AMEUR FADHILA	03/04/2007	55	F	CHG	BLIDA		1		POS	pos						BAHMED FC
23	49/07	HAMDI MOUSSA	15/04/2007	18	M	CHG	BLIDA	2002	3		pos	neg						MOURIA HA
24	51/07	CHEFDJARI FI MOR MAAMFER	23/04/2007	24	M	CHG	BLIDA		1		NEG	neg				oui		OUINPS YAI

Annexe 2 : Matériel non biologiques utilisé au laboratoire

Instruments	
Type	Photos
Tube ACD	
Cellule Malassez	
Tube à fond conique en Plastique	
Tubes secs sur portoir de Tubes	
Eppendorf	
Seringue de Hamilton	
Multi seringue de Hamilton	
Micropipette 50 µl	
Micropipette 100 µl	
Micropipette 200 µl	
Micropipette 500 µl	
Multicanaux	
Embouts	
Distributeur eppendorf	

Apparillages	
Type	Photo
Centrifugeuse « Thermo ELECTRON CORPORATION »	 15
Microscope optique « KROSS »	 16
Portoir aimanté « UCAUTION »	 17
Minuteur	 18
Mikro-centrifugeuse Eppendorf « centrifugeuse 5417C »	 23
BIOROBOT EZ	 24
Gel Doc™ XR+ « BIO RAD »	 25
Thermocycleur « Gene Amp® PCR system 9700 »	 26
Microscope à fluorescence	 19
Vortex	 20
La balance	 21
Thermoblock « FALC »	 22

<p>Micro Gel System box et Générateur de tension 300V</p>	 <p>27</p>
<p>Micro-onde</p>	 <p>28</p>

Réactifs	
Type	Photo
<p>Billes immunomagnétiques « FluoroBeads B »</p>	 <p>29</p>
<p>Fluoroquenche™</p>	 <p>30</p>
<p>Huile de paraffine</p>	 <p>31</p>
<p>Plaque de Terasaki</p>	 <p>32</p>
<p>Complément du lapin</p>	 <p>33</p>
<p>QIAGEN® Protease du KIT QI Aamp®DNA Blood Mini Kit</p>	 <p>34</p>
<p>QIAGEN® Protease Solvent du KIT QI Aamp®DNA Blood Mini Kit</p>	 <p>35</p>
<p>Tampon de QIAGEN du KIT QI Aamp®DNA Blood Mini Kit</p>	 <p>36</p>

<p>Colonne du KIT QI Aamp®DNA Blood Mini Kit</p>	
<p>Ethanol 90°</p>	
<p>Cartouche des reactifs du kit QIAGEN BIOROBOT EZ1</p>	
<p>Tube d'échantillon du kit QIAGEN BIOROBOT EZ1</p>	
<p>Support du cône jetable contenant le cône muni à filtre jetable du kit QIAGEN BIOROBOT EZ1</p>	
<p>Tube d'élution du kit QIAGEN BIOROBOT EZ1</p>	
<p>Taq polymérase</p>	
<p>D-MIX</p>	
<p>Micro SSP™DNA typing Trays</p>	

<p>L'agarose: Sea Kem LE Agarose</p>	
<p>Tri Borate EDTA Buffer</p>	
<p>Solution de Bromure d'éthidium</p>	
<p>Size Marker SSP-SM : marqueur de taille</p>	
<p>Moyens de protection</p>	
<p>Type</p>	<p>Photo</p>
<p>Gants de protection</p>	

Annexe 3 : Dossier du patient (fiche de renseignements, fiche de typage HLA, fiche de cross match).

CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BLIDA
Unité Hassiba Benbouali
Unité d'immunologie- HLA-

Identifiant: _____ Blida le: _____

RECEVEUR

Nom: _____
Prénom: _____
Age: _____
Etablissement hospitalier: _____
Service: _____
Médecin traitant: _____
Groupage sanguin: _____

DONNEUR

Nom: _____
Prénom: _____
Age: _____
Groupage sanguin: _____
Lien de parenté: _____

Fiche de renseignements

N° de dossier: _____

CHU DE BLIDA
UNITE HASSIBA BENBOUALI
Laboratoire de biologie – Unité d'immunologie –
N° de tel : 025 41.18.95/96 Postes : 221/220
Pr A. MEGHIAOUI (Chef d'unité)
Dr Y BOUCHDOUB
Dr M.L BOUDJELLA

Fiche de renseignements – Unité de greffe –
(Donneur/Receveur)

Date : ____/____/____

RECEVEUR :

NOM : PRENOM :
Date et lieu de naissance: à
Adresse :
Origine : N° de tel :
Centre de dialyse : Médecin traitant :

Antécédents familiaux :

Antécédents personnels :

Etiologie de l'insuffisance rénale :

Date de la 1^{ère} dialyse :

Vaccination :

Hépatite <input type="checkbox"/>	Diphtérie <input type="checkbox"/>	Tétanos <input type="checkbox"/>
Rougeole <input type="checkbox"/>	Polio <input type="checkbox"/>	

CHU DE BLIDA
UNITE HASSIBA BENBOUALI
Laboratoire de biologie – Unité d'immunologie –
N° de tel : 025 41.18.95/96 Postes : 221/220
Pr A. MEGHIAOUI (Chef d'unité)
Dr Y BOUCHDOUB
Dr M.L BOUDJELLA

Fiche de renseignements – Unité de greffe –
(Donneur/Receveur)

Date : ____/____/____

RECEVEUR :

NOM : PRENOM :
Date et lieu de naissance: à
Adresse :
Origine : N° de tel :
Centre de dialyse : Médecin traitant :

Antécédents familiaux :

Antécédents personnels :

Etiologie de l'insuffisance rénale :

Date de la 1^{ère} dialyse :

Vaccination :

Hépatite <input type="checkbox"/>	Diphtérie <input type="checkbox"/>	Tétanos <input type="checkbox"/>
Rougeole <input type="checkbox"/>	Polio <input type="checkbox"/>	

Fiche de résultats de Cros

CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BLIDA
 LABORATOIRE DE BIOLOGIE
 Unité Hospitalo-Universitaire d'Immunologie
 Blida, le : _____

Résultats Cross Match Final : CXMF

Receveur : _____ Donneur : _____
 Nom : _____ Nom : _____
 Prénom : _____ Prénom : _____

Technique de microlymphocytotoxicité

Date des sérums	Résultat
—	→
—	→
—	→
—	→
—	→
—	→

Le chef d'unité

CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BLIDA
 LABORATOIRE DE BIOLOGIE
 Unité Hospitalo-Universitaire d'Immunologie
 Blida, le : _____

Résultats Cross Match Final : CXMF

Receveur : _____ Donneur : _____
 Nom : _____ Nom : _____
 Prénom : _____ Prénom : _____

Technique de microlymphocytotoxicité

Date des sérums	Résultat
—	→
—	→
—	→
—	→
—	→
—	→

Le chef d'unité

Annexe 4 : Taille et densité des cellules sanguines

	Taille (µm)	Densité (la masse volumique)	Vitesse de sédimentation
Globules rouges ●	7 (6.5-7.5)	1.098 (1.089-1.105)	+ ↑
Eosinophiles	12 (12-15)	1.091 (1.087-1.096)	
Neutrophiles ●	12 (12-15)	1.088 (1.082-1.097)	
Basophiles	9.5 (9-10)	1.078 (1.074-1.082)	
Monocytes ○	15 (15-20)	1.071 (1.065-1.075)	
Lymphocytes ●	9 (8-10)	1.063 (1.057-1.067)	
Plaquettes	2-3	1.040	

Plaquettes	2-3	1.040	—
Lymphocytes ○	9 (8-10)	1.063 (1.057-1.067)	

Annexe 5 : Protocole de séparation des lymphocytes totaux par technique de Ficoll.



1-Dilution



2-Dépôt de sang



3-Centrifugation



4-Aspiration de la couche lymphocytaire



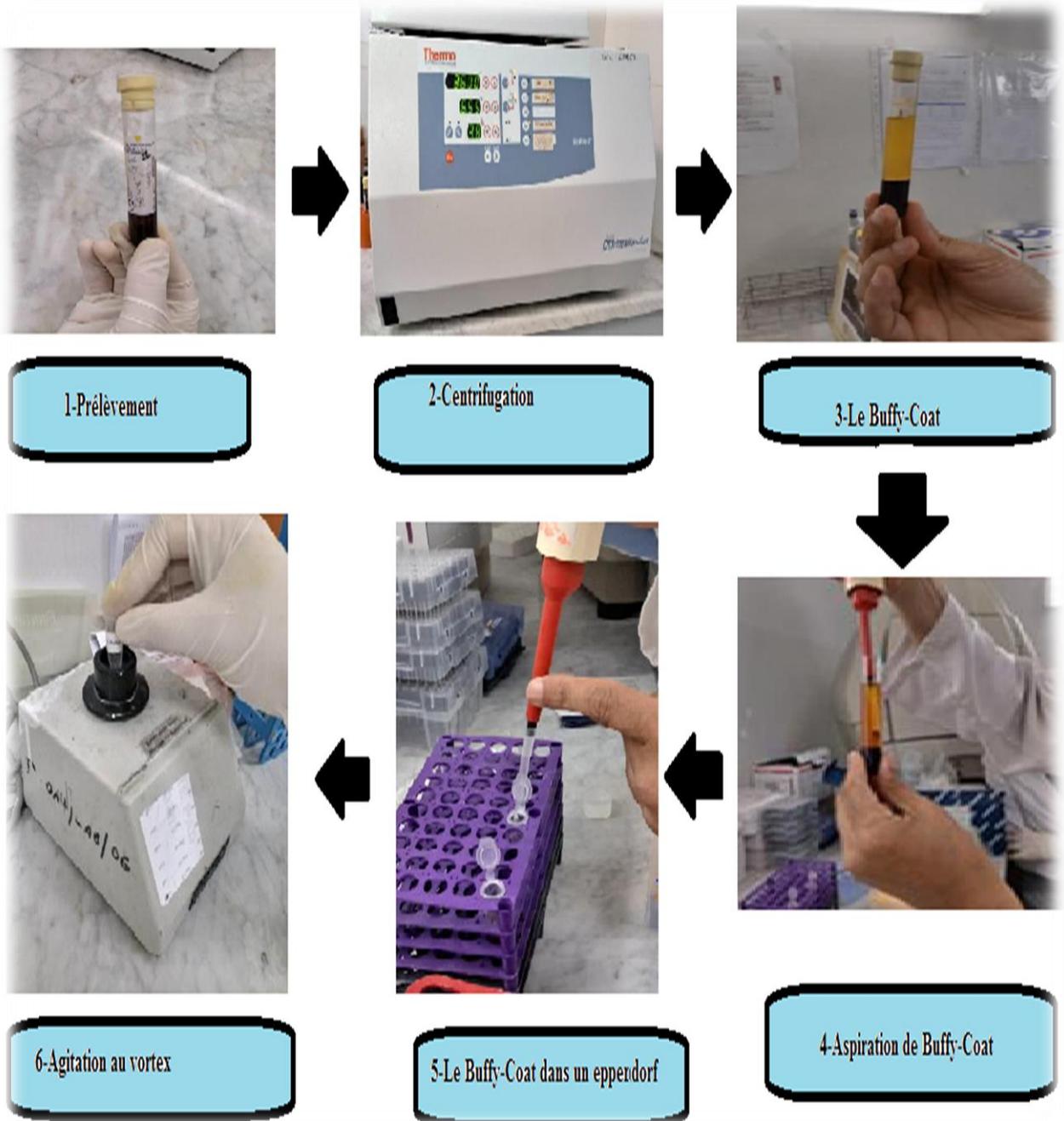
6-Addition de la solution de Hanks

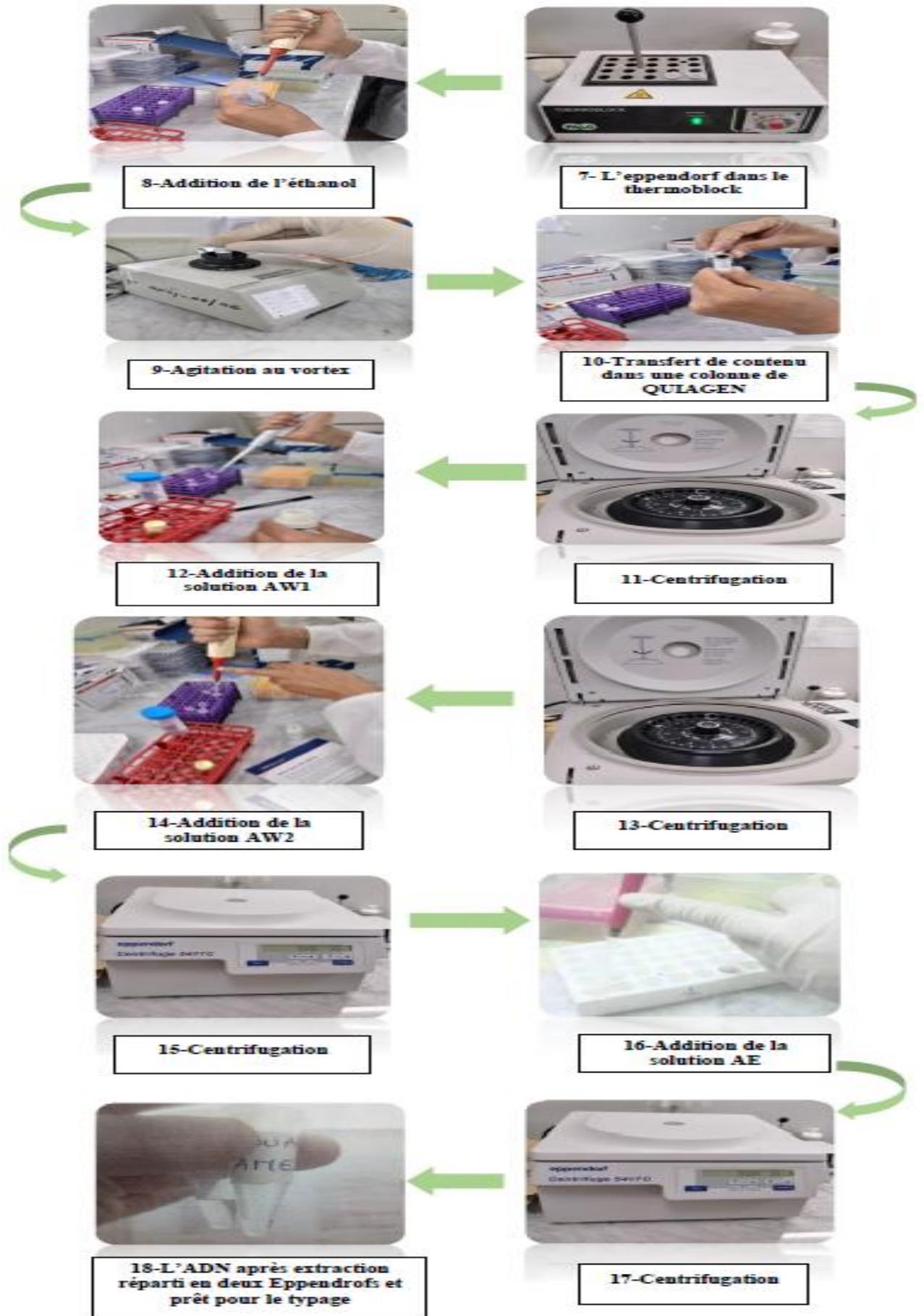


5-Centrifugation

Annexe 6 : Le protocole de typage par biologie moléculaire PCR-SSP

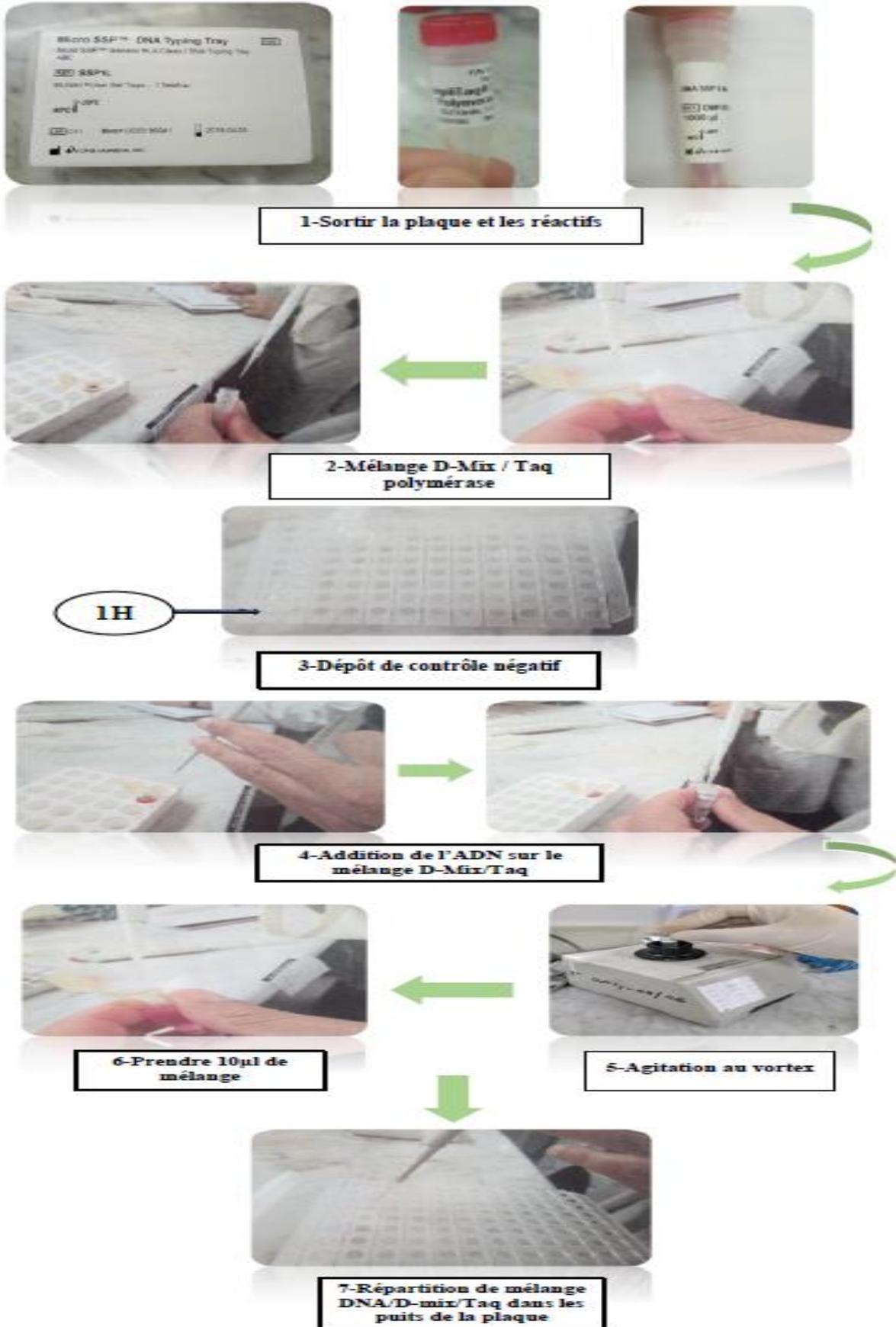
1- Extraction de l'ADN par technique de QIAGEN :





2- Le typage par PCR-SSP :

A) Préparation de la plaque micro-SSP :





8-Fermeture de la plaque

B-Réalisation de la PCR :



9-Placement de la plaque dans le thermocycleur

C-Electrophorèse sur gel d'agarose :

- Préparation de gel :



1-Peser d'agarose



2-Addition de la solution tamponne



3-Placement de mélange dans la micro-onde (3 à 4 min)



□ *La migration sur gel :*



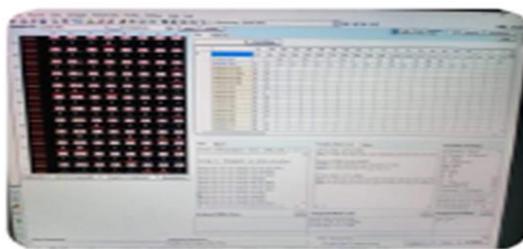
9-Transfert de produits d'amplification dans les puits de la plaque de migration



10-La migration



11-Lecture sous UV Gel Doc



12-Interprétation des résultats par un logiciel HLA Fusion

Annexe 7 : le protocole de typage HLA par la technique sérologique (LCT).

1-Préparation de la plaque de Terasaki :



1-Addition de l'huile de paraffine

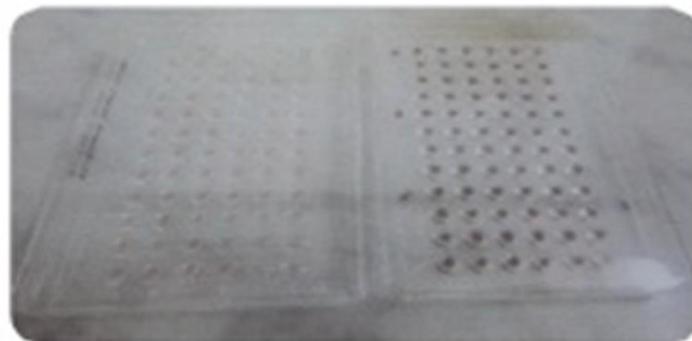


2-Addition de l'eau physiologique

2-Le typage par LCT proprement dit :



3-Rempissage des plaques de Terasaki



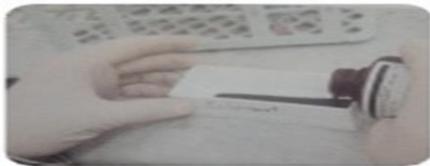
4-Les plaques de typage remplis



5-Incubation des plaques



6-Les plaques après incubation



7-Addition de colorant



8-Incubation des plaques

3-La lecture :

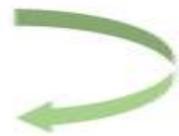


9-La lecture sur microscope à fluorescence inversée



Les résultats possibles

Les résultats possibles



Annexe 8: Les batteries d'anticorps pour typage sérologique.

Terasaki HLA Class I Dry Tissue Typing Tray (72), Lot #5
 Catalogue# A87ZD

Phenotype Assignment
 Lymphocyte Source: PBL-Pneih Spleen Other
 PBL-Frozen Lymph-Node

HLA Panel Specifications and Test Spots

HLA Class	Antigen	Reaction
A1	A1	+
A2	A2	+
A3	A3	+
A23	A23	+
A24	A24	+
A25	A25	+
A26	A26	+
A27	A27	+
A28	A28	+
A29	A29	+
A30	A30	+
A31	A31	+
A32	A32	+
A33	A33	+
A34	A34	+
A35	A35	+
A36	A36	+
A37	A37	+
A38	A38	+
A39	A39	+
A40	A40	+
A41	A41	+
A42	A42	+
A43	A43	+
A44	A44	+
A45	A45	+
A46	A46	+
A47	A47	+
A48	A48	+
A49	A49	+
A50	A50	+
A51	A51	+
A52	A52	+
A53	A53	+
A54	A54	+
A55	A55	+
A56	A56	+
A57	A57	+
A58	A58	+
A59	A59	+
A60	A60	+
A61	A61	+
A62	A62	+
A63	A63	+
A64	A64	+
A65	A65	+
A66	A66	+
A67	A67	+
A68	A68	+
A69	A69	+
A70	A70	+
A71	A71	+
A72	A72	+
A73	A73	+
A74	A74	+
A75	A75	+
A76	A76	+
A77	A77	+
A78	A78	+
A79	A79	+
A80	A80	+
A81	A81	+
A82	A82	+
A83	A83	+
A84	A84	+
A85	A85	+
A86	A86	+
A87	A87	+
A88	A88	+
A89	A89	+
A90	A90	+
A91	A91	+
A92	A92	+
A93	A93	+
A94	A94	+
A95	A95	+
A96	A96	+
A97	A97	+
A98	A98	+
A99	A99	+
A100	A100	+

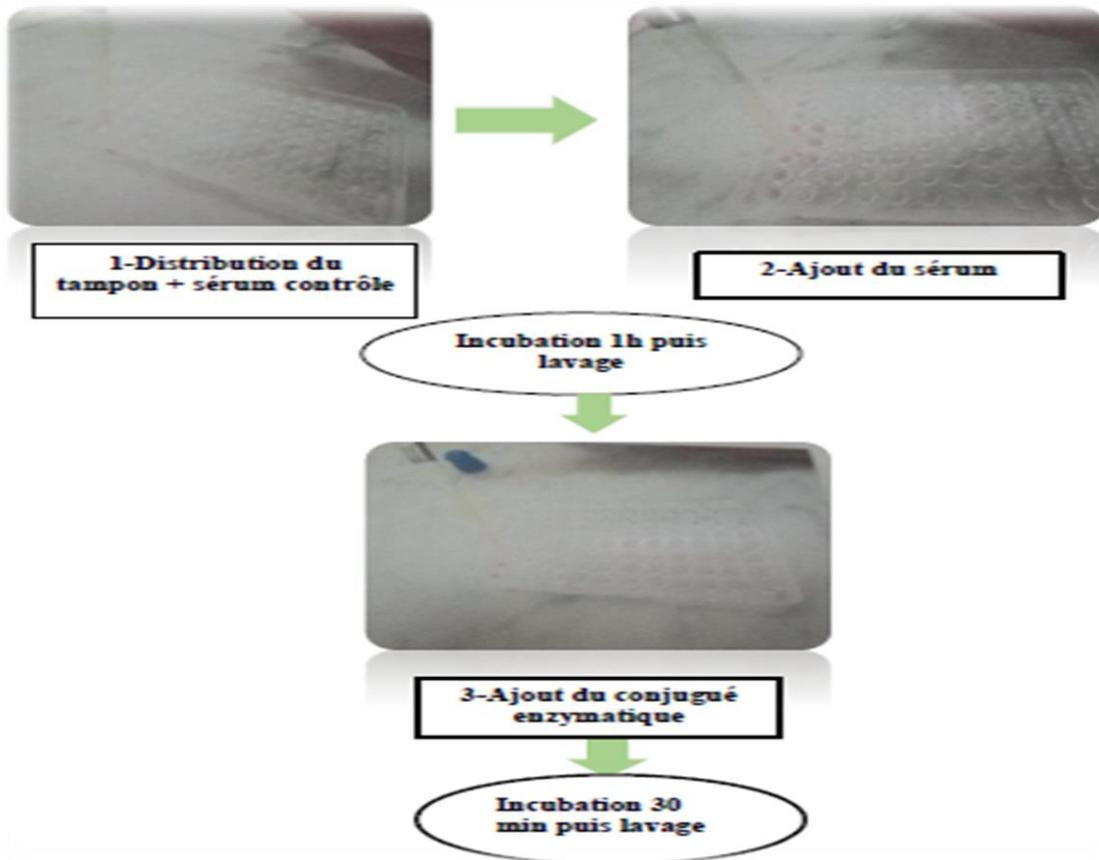
Briefed Associations

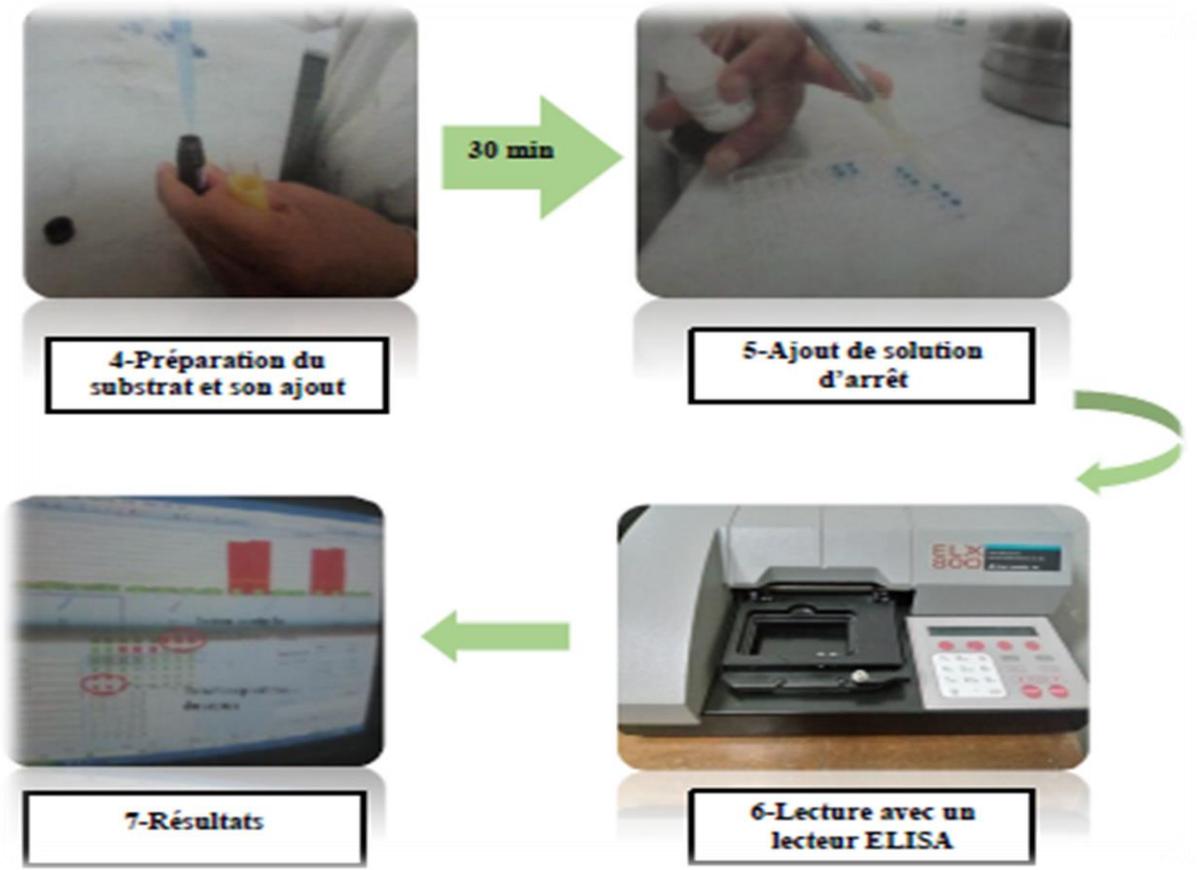
Panel	Spots
Bw4	A23, B27, B51, B53, B59, B41, B56, B57, B73
Bw6	A24, B27, B52, B59, B42, B50, B71, B72, B73, B74, B75, B76, B77, B78, B79, B80, B81, B82, B83, B84, B85, B86, B87, B88, B89, B90, B91, B92, B93, B94, B95, B96, B97, B98, B99, B100

HLA Brief Associations

Panel	Spots
Bw4	A23, B27, B51, B53, B59, B41, B56, B57, B73
Bw6	A24, B27, B52, B59, B42, B50, B71, B72, B73, B74, B75, B76, B77, B78, B79, B80, B81, B82, B83, B84, B85, B86, B87, B88, B89, B90, B91, B92, B93, B94, B95, B96, B97, B98, B99, B100

Annexe 9 : Protocole de la technique ELISA :





Annexe 10 : Protocole du Cross match par LCT.

