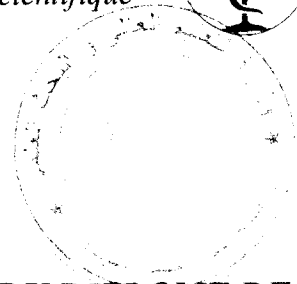




REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Saad Dahleb de Blida  
Faculté de Médecine  
Département de pharmacie



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME DE  
DOCTORAT EN PHARMACIE**

**Thème :**

**SUIVI DES MALADES EN PRE ET EN  
POST TRANSPLANTATION RENALE AU  
NIVEAU DE L'UNITE D'IMMUNOLOGIE DU  
CHU DE BLIDA**

**Présenté par :** LETTREUCH Rima Asma

TCHAOUAOU Amel

KHELALFA Daouia

**Encadré par :**

Dr BOUDJELLA.M.L: Maitre assistant en immunologie.

**Jury:**

**Président de jury:** Pr MEGHLAOUI. A : Professeur chef d'unité d'immunologie de Blida.

**Membre de jury :** Dr BOUCHEDOUB. Y : Maitre assistant en immunologie.

Dr HADDAD.N : Maitre assistante en hématologie.

**Promotion 2012/2013**

## Remerciements :

*A Monsieur le Pr MEGHLAOUI :*

Pr en immunologie, chef d'unité d'immunologie du CHU de Blida, enseignant d'immunologie à la faculté de Médecine de Blida

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations.

Votre simplicité, vos qualités pédagogiques, votre grande culture scientifique font de vous un maître incontestable, admirable et un exemple à suivre.

*A Notre maître et juge, le Dr BOUCHDOUB :*

Médecin spécialiste en immunologie, maître assistant à l'unité d'immunologie du CHU de Blida, enseignant à la faculté de Médecine de Blida.

Merci, pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de siéger dans ce jury. Votre aide à nous pendant la réalisation de ce mémoire. Veuillez, recevoir cher maître le témoignage de notre profond respect.

*A Notre maître et juge, Dr HADDAD :*

Dr en hématologie, maître assistante d'hématologie du CHU de Blida, et enseignante à la faculté de Médecine de Blida

Chère Maître, c'est un grand privilège pour nous de vous avoir dans notre jury.

*A Notre maître et directeur de mémoire, Dr BOUDJELLA :*

Médecin spécialiste en immunologie, maître assistant à l'unité d'immunologie du CHU Blida, enseignant à faculté de médecine de Blida.

Depuis nos premiers pas dans le laboratoire, vous nous avez assuré un encadrement de qualité et une formation exemplaire.

Nous sommes flattés d'avoir appris à vos côtés. Votre richesse scientifique, votre amour pour le travail bien fait, votre rigueur et votre constante disponibilité ont cultivé en nous l'amour pour l'immunologie et nous servirons de modèle.

Vos qualités humaines font de vous un être particulier. Vous resterez pour nous un exemple à suivre. Soyez rassuré, que vos nombreux conseils et enseignements n'auront pas été vains et serviront de repère dans notre vie professionnelle.

Veuillez recevoir, cher maître, l'expression de notre profonde reconnaissance.

*A Monsieur KHERBECH :*

*Personnel du laboratoire*

Vous étiez un bon contribuant et aidant, vos conseils et vos encouragements nous ont profondément servis, vous étiez comme un père pour nous, qui nous donne la force aux moments de faiblesse, merci à vous qu'Allah vous garde.

*A tous les personnels du laboratoire d'immunologie, merci*

*A Dr OULD ALI :*

Médecin résidente en immunologie, merci pour tous vos conseils et vos supports, votre simplicité et vos sourires vous rend un bon exemple à suivre.

## Dédicace

### LETTREUX Rima Asma

Je commence par rendre grâce à Dieu et à sa bonté, pour la patience, la compétence et le courage qu'il m'a donné pour arriver à ce stade... *ALHAMDULILLAH...*

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qui disent...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,

Le respect, la reconnaissance...

Aussi, c'est tout simplement que

Je dédie ce modeste travail ...

A mes chers parents, Lhadj Taher et Lhadja Malika

Merci de m'avoir encouragée, accompagnée et soutenue sur ces longs jours. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui... Qu'Allah me les garde.

A mes frères et sœurs Nassima, Leila, Abd Jmaouf, Maunir, Nesrine, et ma jumelle Soumaya

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

A mon fiancé Maamer

En témoignage de mon affectif et ma gratitude pour avoir soutenu les moments les plus difficiles.

A mes amies, Daouia et Amel et toute la famille de 2012 à 2017

A ma belle famille Mezghou

A mes belles sœurs et mon beau frère

A mes neveux et nièces

A mes professeurs et mes maîtres de stage, à tous ceux qui m'ont permis de me lancer sur le monde, dont le monde pharmaceutique.

A tous merci...

## Dédicace de Tchaouaou Amel :

*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.*

*A ma très chère mère :  
Maman, les mots me manquent : que d'amour, que de tendresse, que d'affection.  
Durant toute ma vie, tu as été présente, et cela sans relâche. Ce travail, maman, est une consécration de plus pour toi pour toute l'énergie consacrée à mon éducation. Qu'Allah te prête longue vie à mon côté, Amen.*

*A mon très cher père :  
Papa, tu as développé en moi le sens de l'honneur, de la dignité, du courage, du travail bien fait, de la logique du rationnel, et de la responsabilité. Ce travail est le fruit des efforts consacrés à mon éducation, puisse tu en être remercié à jamais. Qu'Allah te prête longue vie à mon côté, Amen.*

*A mes chers frères, pour leur soutien, et leurs encouragements. Pour les moments d'humour qui me remonte le moral, et qui me donne autant d'énergie. Qu'Allah vous garde toujours à mon côté.*

*A mes cousines et cousins, mes tantes et oncle qui par vos sincères soutiens me donnent toujours la force d'avancer en toute confiance.*

*A ma grande mère et grand père, qu'ils me guident par leur « doaa », et je dédie ce travail spécialement à mon grand père disparu, j'aurais aimé ta présence et ton soutien mais dieu a voulu autrement.*

*A tous et toutes mes ami(e)s que je partage avec eux tant de souvenirs, et qui m'ont toujours souhaité la réussite.*

*A Daouia et Rima qui étaient mes parfaites partenaires et admirables amies, et avec qui j'ai passé d'agréables moments, qu'Allah vous garde, Merci*

## *Dédicace Khelalfa Daouia*

*Merci à Dieu de sa grâce, source de notre force et courage tout au long de nos études universitaires  
Avec un énorme plaisir et une immense joie, que je dédie ce travail*

*A celle qui m'a transmis la vie, l'amour et le courage, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite,  
à ma très chère mère Ouarda.*

*A mon père, école de mon enfance, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et  
à me protéger.*

*Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.  
Que dieu vous gardes et vous protège.*

*A mes adorables amies /sœurs, Rima et Amel, Pour l'esprit d'équipe et tous les moments inoubliables qu'on  
a passé ensemble, que ce travail soit l'expression de mon grand amour.*

*Je vous souhaite une vie pleine de bonheurs, réussites et joie.*

*A mes frères Mustapha et Abdelwahab.*

*A mes ami(e)s et tous ceux qui me sont chères.*

*A tous mes collègues de pharmacie promotion 2007-2013.*

*A ma deuxième famille, mon groupe «Oxyjeunes »*

*A toute personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.*

*Je vous remercie de votre patience vous m'avez aidée toujours à avancer, merci d'être toujours près de moi.*

## Résumé :

**Introduction :** La transplantation rénale est actuellement la solution la plus efficace et la plus économique pour la prise en charge de l'insuffisance rénale chronique en phase terminale.

Elle entraîne cependant une puissante réponse immunitaire dirigée contre le greffon allogénique qui nécessite la prise d'un traitement immunosuppresseur à vie. Cette réponse allogénique définie par le rejet est dirigée contre des structures tissulaires nommées Ag HLA portés par différents types cellulaires.

Pour prévenir ce risque, les malades sont suivis au cours de leur attente de greffe, et même après, afin de rechercher l'apparition dans leurs sérums d'Ac délétères pour le greffon qui pourront diminuer sa survie à long terme. Ces Ac sont recherchés surtout après un événement immunisant qui favorise l'allo immunisation. L'élément clé du suivi est la constitution de la sérothèque qui englobe tous les sérums prélevés du patient.

La recherche de ces Ac est effectuée par différentes techniques dont leur sensibilité et spécificité sont différentes.

Mettre en évidence les facteurs conduisant à une allo immunisation et influençant par la suite le devenir du greffon, pourrait permettre de mieux gérer les traitements et la prise en charge des patients. Ces traitements sont basés sur l'utilisation des immunosuppresseurs et d'autres moyens thérapeutiques (désensibilisation) selon différents schémas instaurés et afin d'augmenter les chances de survie du nouvel greffon.

**Objectif :** évaluer le suivi les malades en prés et en post greffe rénale, et établir un protocole de suivi qui permet d'optimiser les moyens de la prise en charge des malades.

**Matériel et méthodes :** Il s'agit d'une étude rétrospective menée à l'unité de Hassiba Ben Bouali sur une période de 6 ans (**Janvier 2006- Décembre 2012**) rapportant les patients enregistrés en vu d'une transplantation rénale.

Un bilan d'histocompatibilité a été réalisé pour chaque couple D/R pour s'assurer que la transplantation sera sécuritaire. Il consiste à effectuer un test de cross match par technique sérologique, au même temps une étape d'un typage HLA par technique sérologique(LCT) ou par biologie moléculaire (PCR-SSP) est réalisé afin de classer les couples en fonction des résultats de typage en identiques, semi identiques et non identiques. une recherche d'Ac anti HLA par technique ELISA est effectuée systématiquement dont les résultats révélés positifs en screening seront l'objectifs d'une éventuelle identification.

**Résultats :** Au total **359** couples ont été explorés. **203** d'entre eux font partie du CHU de Blida. La prédominance des receveurs était masculine (**62%**) avec un moyen âge égal à 31ans. Les résultats d'étude de compatibilité ont révélé une compatibilité semi identique majoritaire entre les couples explorés (**78%**) et même pour les couples greffés (**80%**). Un nombre assez remarquable des patients qui ont fait au moins une transfusion avant la greffe (**68%**). La recherche d'Ac anti HLA (de classe I et /ou de classe II), avant la greffe a révélé un résultat positif dans **16%** des cas. Un facteur de risque d'apparition d'Ac anti HLA (de classe I et /ou de classe II) a été clairement observée chez les patients qui ont fait des phénomènes immunisants (Transfusion seule ou en association avec une ou plusieurs grossesses) (**P=0,021 et OR=3,31**), dont une relation dose réponse a été noté chez les malades polytransfusés (**P=0,001 et OR=0,24 pour la classe I**) et (**P=0,001 et OR=3,47 pour la classe II**). Parmi les malades explorés (**359**), **128** ont été greffés dont **66** font partie

du CHU de Blida. La recherche d'Ac chez ces malades greffés a révélé une positivité (classe I et / ou classe II) pour **10%** de la totalité des greffés et **7%** pour les malades de Blida. Sur **66** patients greffés au CHU de Blida, **11** d'entre eux ont développés un rejet malgré qu'ils avaient tous un résultat négatif concernant la recherche d'Ac anti HLA avant la greffe.

**Conclusion :** La greffe est une étape dans le parcours de soin du patient, où elle est positionnée comme le meilleur moyen thérapeutique. Travailler en amont de la greffe, c'est assurer une prise en charge des patients pour éviter le risque de rejet du nouvel greffon. C'est aussi favoriser la collaboration entre professionnels de santé pour inscrire les patients et améliorer l'accès à la greffe par une bonne constitution de sérothèque. Travailler en aval, c'est développer des réseaux de soins qui assurent un suivi coordonné et de qualité au plus près du patient greffé.

**Mots clés :**

Transplantation, rejet, Ag HLA, sérothèque, événement immunisant, l'allo immunisation, immunosuppresseurs.

## Summary:

**Introduction:** Transplanting a kidney is currently the most efficient and the most economical solution in case of a chronic terminal kidney deficiency.

This solution strongly answers the immune system against the allogenic transplant which needs a lifelong treatment. This allogenic answer, defined by the rejection, is directed against cell structures called Ag HLA expressed by different cell types.

To prevent this risk, patients are watched while their waiting for transplantation, and even after being transplanted, in order to look for the appearance of harmful Ab in their serums which may diminish the transplant long life survival. These Ab are mainly searched after an immune event that favours the immune system. The key element of control is the constitution of the sérothèque which involves all the serums taken from the patient.

The search for these Ab is made through different techniques whose specificity and sensitivity are different.

**Objective:** Evaluate the control of patients before and after a kidney transplant, and to set a protocol of control which enables us to optimise the means of caring the patients.

**Materials and methods:** This is a retrospective study made at the Unit of Hassiba Ben Bouali over a period of six years (**January 2006 – December 2012**) about the patients recorded for a transplant of a kidney.

A histocompatibility check-up was made for each D/R couple to guarantee that the transplant would be safe. It consists firstly of a cross match test through a serologic technique. A negative result enables us to move to a second stage where an HLA categorisation is made by a serologic technique (LCT) or by a molecular biology (PCR-SSP) in order to classify the couples according to the results of categorisation into identical, semi-identical, or non-identical. A research of Ab anti HLA by the technique ELISA is systematically made whose positive results in screening will be the objective of identification.

**Results:** 359 couples have been explored, 203 of them belong to the hospital of Blida. Most of the receivers were male (62%) with an average age of 31 years old. The results of the study of compatibility showed a wholly semi-identical compatibility among the explored couples (78%) and even for the transplanted couples (80%). A great number of the patients have undergone a blood transfusion before the transplant (68 %). The search for Ab anti HLA (of class I and/or class II) has revealed, before the transplant, a positive result in 16% of the patients. A risk of the appearance of Ab anti HLA is clearly observed in the patients who have shown immunising phenomena (solo transfusion or in association with one or many pregnancies) ( $P= 0.021$  and  $OR = 3.31$ ), where a relation dose answer is present in the poly transfused patients ( $P= 0.001$  and  $OR= 0.24$  for class I) and ( $P= 0.001$  and  $OR= 3.47$  for class II). Among the explored patients (359), 128 of them have been transplanted among who 66 belong to the hospital of Blida. The research of Ab in the transplanted patients was positive (class I and /or class II) for 10% of the total transplanted patients and 7% of the patients of Blida. Of the 66 transplanted patients at the hospital of Blida, 11 of them have developed a reject though they all had a negative result concerning the research of Ab anti HLA before the transplant.



**Conclusion:** The transplantation is a step in the course of the patient's cure, where it is positioned as the best available therapy. Working before the transplant means assuring patients' care in order to avoid the risk of reject of the new transplant. It also favours the collaboration between the professionals of health in order to register the patients and improve the access to the transplantation through a good constitution of the sérothèque. Working after means developing cure networks which guarantee a coordinated control and quality towards the transplanted patients.

**Key words:** Transplantation, reject, Ag HLA, sérothèque, immunising event, alloimmunisation, immunosupresseurs.

**La liste des tableaux :**

**Tableau 1 :** spécificités larges, subdivisions et spécificités associées.....Annexe 1

**Tableau 2 :** Classification des traitements de rejet .....p 73

**Tableau 3 :** Matériels non biologique utilisés au laboratoire.....Annexe 3

**Tableau 4 :** score d'interprétation des résultats de typage selon l'échelle

Standard ASHI.....p83

**Tableau 5:** Taille et densité des cellules sanguines.....Annexe 5

## Liste des figures :

<b>Figure 01 :</b> localisation des gènes HLA sur le bras court du chromosome 6.....	5
<b>Figure 02 :</b> les exons de HLA I.....	5
<b>Figure 03:</b> les exons de HLA II.....	6
<b>Figure 04:</b> Molécule HLA de classe I. L'aspect tridimensionnel de la molécule et du site de fixation peptidique.....	7
<b>Figure 05 :</b> Molécule HLA de classe II. L'aspect tridimensionnel de la molécule et du site de fixation peptidique.....	7
<b>Figure 06:</b> Expression co-dominante des gènes HLA.....	8
<b>Figure 07 :</b> le polymorphisme HLA de classe I et II.....	9
<b>Figure 08 :</b> la transmission génétique à partir des parents vers leurs enfants.....	11
<b>Figure 09 :</b> exemple d'une nomenclature HLA-A <sub>2</sub> obtenue par une haute résolution.....	12
<b>Figure 10 :</b> la découverte de nouveaux allèles HLA depuis 1987 jusqu'au 2013.....	13
<b>Figure 11 :</b> Activation de système de complément par la voie classique.....	18
<b>Figure 12 :</b> Phénomène ADCC : « Antibody-dependent cellular cytotoxicity ».....	18
<b>Figure (13 :</b> Représentation schématique de la réponse allogénique lors d'un rejet hyperaigu.....	19
<b>Figure 14 :</b> aspect d'un rein rejeté lors d'un rejet hyperaigu.....	19
<b>Figure 15 :</b> Coupe histologique d'un rein présentant un rejet hyperaigu.....	20
<b>Figure16 :</b> Représentation schématique mécanisme d'alloreconnaissance.....	23
<b>Figure 17 :</b> Représentation schématique de l'activation lymphocytaire T.....	26
<b>Figure 18 :</b> Représentation schématique des étapes de la transmigration lymphocytaire.....	28
<b>Figure 19 :</b> Cytotoxicité des lymphocytes T et voies d'apoptose.....	31
<b>Figure 20 :</b> Représentation schématique de la réponse humorale et centre germinatif.....	33
<b>Figure 21 :</b> Représentation schématique du rein présentant un rejet aigu.....	34
<b>Figure 22 :</b> Aspect histologique typique d'un rejet aigu cellulaire.....	36
<b>Figure23 :</b> Aspect histologique typique d'un rejet aigu humoral.....	36
<b>Figure 24 :</b> Des coupes histologiques comparatives d'un rejet aigu cellulaire et humoral.....	37
<b>Figure 25 :</b> représentation schématique d'un rein lors de rejet chronique.....	39
<b>Figure 26 :</b> Néphropathie chronique du transplant.....	40
<b>Figure 27 :</b> Aspect histologique typique d'un rejet chronique.....	41
<b>Figure 28 :</b> schéma représentatif du principe de typage HLA par BM et par sérologie.....	43
<b>Figure 29 :</b> représentation schématique du principe de typage HLA par LCT.....	43
<b>Figure 10 :</b> schéma représentatif des étapes d'amplification de l'ADN par (PCR).....	45
<b>Figure 31 :</b> représentation schématique du principe de la technique PCR SSO.....	46
<b>Figure 32 :</b> schéma représentatif du principe de la technique PCR SSP.....	46
<b>Figure 33 :</b> représentation schématique du principe de la technique PCR SSO-R.....	47
<b>Figure 34 :</b> schéma représentatif des 3 étapes de séquençage.....	49
<b>Figure 35 :</b> schéma représentatif du principe de la recherche des anticorps anti HLA par ELISA (sandwich).....	53
<b>Figure 36 :</b> représentation schématique du principe de la technique de recherche des ACs anti HLA par LUMINEX.....	54
<b>Figure 37 :</b> présentation schématique du principe de CROSS MATCH par LCT.....	56

<b>Figure 38</b> : principe de CXM par cytométrie en flux.....	57
<b>Figure 39</b> : représentation schématique du protocole de suivi.....	61
<b>Figure 40</b> : Représentation schématique des stades de rejet à médiation humorale.....	64
<b>Figure 41</b> : schéma de suivi immunologique en post greffe.....	65
<b>Figure 42</b> : exemple de protocole de désensibilisation chez un patient à haut risque.....	70
immunologique au John Hopkins Hospital (BALTIMOR).....	74
<b>Figure 43</b> : schéma représentatif de mode d'action des inhibiteurs de calcineurines.....	74
<b>Figure 44</b> : schéma représentatif de mode d'action des Ac anti récepteur de l'IL2.....	75
<b>Figure 45</b> : représentation schématique du mécanisme d'action de l'MMF.....	75
<b>Figure 46</b> : représentation schématique du mécanisme d'action des protéines de fusion et des AC monoclonaux.....	
<b>Figure 47</b> : Diagramme des tests d'histocompatibilité effectués en transplantation rénale.....	77
<b>Figure 48</b> : Les prélèvements réalisés pour les différents tests immunologiques.....	78
<b>Figure 49</b> : Le résultat de séparation par technique de Ficoll.....	79
<b>Figure 50</b> : La solution mère de travail.....	80
<b>Figure 51</b> : énumération sur cellule de Malassez.....	80
<b>Figure 52</b> : Le prélèvement de sang total sur ACD diluée avec de l'eau physiologique.....	81
<b>Figure 53</b> : Les plaques de Terasaki après incubation.....	82
<b>Figure 54</b> : Amplification de l'ADN par DNA polymérase.....	85
<b>Figure 55</b> : réactifs du Kit de la PCR.....	86
<b>Figure 56</b> : L'ADN après extraction.....	87
<b>Figure 57</b> : introduction de la plaque de Terasaki dans le thermocycleur.....	88
<b>Figure 58</b> : migration sur gel d'agarose.....	89
<b>Figure 59</b> : lecture et interprétation d'un résultat de typage par PCR SSP.....	89
<b>Figure 60</b> : interprétation des résultats d'Elisa par le logiciel.....	92
<b>Figure 61</b> : Ag dans les puits pour l'interprétation des résultats d'identification des Ac anti classe I.....	93
<b>Figure 62</b> : Ag dans les puits pour l'interprétation des résultats d'identification des Ac anti Classe II.....	94
<b>Figure 63</b> : les lymphocytes après leur séparation.....	95
<b>Figure 64</b> : plaque de Terasaki avant son remplissage.....	96
<b>Figure 65</b> : Représentation schématique d'une plaque de Terasaki pour l'épreuve de CxM.....	96

La liste des graphes :

<b>Graphe 1</b> : Répartition des malades selon le sexe.....	98
<b>Graphe 2</b> : Répartition des malades selon l'âge.....	99
<b>Graphe 3</b> : Répartition des malades selon le service demandeur.....	100
<b>Graphe 4</b> : Répartition des malades selon le recrutement par an.....	101
<b>Graphe 5</b> : Répartition des malades selon les résultats du typage HLA.....	102
<b>Graphe 6</b> : La répartition des malades selon la présence ou l'absence de transfusion.....	103
<b>Graphe 7</b> : Répartition des malades transfusés selon la fréquence de transfusion.....	103
<b>Graphe 8</b> : Répartition des malades selon le nombre de Grossesse.....	104
<b>Graphe 9</b> : Répartition des malades selon les résultats de la recherche d'Ac de Classe I et II....	105
<b>Graphe 10</b> : Répartition des malades selon les résultats de la recherche d'Ac de Classe I.....	106
<b>Graphe 11</b> : Répartition des malades selon les résultats de la recherche d'Ac de Classe II.....	106
<b>Graphe 12</b> : Répartition des malades selon les résultats du cross match.....	107
<b>Graphe 13</b> : Evénements immunisants et apparition d'Ac anti HLA de classe I.....	108
<b>Graphe 14</b> : Evénements immunisants et l'apparition d'Ac anti HLA de classe II.....	109
<b>Graphe 15</b> : Transfusion et l'apparition d'Ac anti HLA de classe I.....	110
<b>Graphe 16</b> : Transfusion et l'apparition d'Ac anti HLA de classe II.....	111
<b>Graphe 17</b> : Fréquence des transfusions et apparition d'Ac anti HLA e classe I.....	112
<b>Graphe 18</b> : Fréquence de transfusion et apparition d'Ac anti HLA classe II.....	113
<b>Graphe 19</b> : répartition des malades greffés.....	114
<b>Graphe 20</b> : Répartition des malades de Blida selon la réalisation de la greffe.....	114
<b>Graphe 21</b> : Répartition des malades greffés à Blida et hors Blida.....	115
<b>Graphe 22</b> : Répartition des malades greffés de Blida par année.....	116
<b>Graphe 23</b> : Répartition des malades greffés selon l'âge.....	117
<b>Graphe 24</b> : Répartition des malades greffés selon le sexe.....	117
<b>Graphe 25</b> : Répartition des malades greffés selon la compatibilité HLA.....	118
<b>Graphe 26</b> : Répartition des greffés de Blida selon la servenu de rejet.....	119
<b>Graphe 27</b> : Répartition des malades qui ont fait le rejet selon la compatibilité HLA.....	119
<b>Graphe 28</b> : Répartition des malades greffés selon les résultats de la recherche des Ac avant la greffe.....	120
<b>Graphe 29</b> : Répartition des malades greffés de Blida selon les résultats de la recherche des Ac avant la greffe.....	121

## **Liste des abréviations**

---

**Aa** : Acide Aminé  
**ADCC** : Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity  
**Ag** : Antigène  
**AGH** : Antiglobuline Humaine  
**AN** : Acide Nucléique  
**AZT** : Azathioprine  
**BCR** : B Cell Receptor  
**BM** : Biologie Moléculaire  
**C** : Composant du Complément  
**CD** : Cellules Dendritiques  
**CG** : Centre Germinatif  
**CMH** : Complexe Majeur D'histocompatibilité  
**CMN** : Cellules Mononuclées  
**CXM** : Cross Match  
**CPA** : Cellule Présentatrice D'antigène  
**CS** : Corticostéroïdes  
**CTLA4** : Cell T Leucocyte Adhésion  
**DAG** : Diacide Glycérol  
**DO** : Densité Optique  
**D/R** : Donneur/Receveur  
**DSA** : Donor Specific Antibody  
**DTT** : Dithiotreitol  
**ELISA** : Enzym Liked Immuno Sorbent Assay  
**EP** : Echange Plasmatique  
**Fcr** : Recepteur de la Partie Fc d'Ac  
**FCXM** : Cross Match par Cytometrie En Flux  
**FIAT** : Fibrose Interstitielle avec Atrophie Tubulaire  
**GAL** : Anticorps Polyclonaux Anti Lym T  
**HLA** : Human Leucocyte Antigen  
**ICAM** Intercellular Adhesion Molecule  
**ICN** : Inhibiteur de Calcineurine  
**Ig** : Immunoglobuline  
**IL** : Interleukine  
**IP3** : Inositol Triphosphate  
**IR** : Insuffisance Rénale  
**IS** : Immunosuppresseur  
**Ivig** : Immunoglobuline Intraveineuse  
**JAM** : Junctional Adhesion Molécules  
**LCT** : Microlymphocytotoxicité Complément Dépendante  
**LFA** : Lymphocyte Function -Associated Antigen  
**Lumxm** : Cross Match par Luminex  
**LY** : Lymphocyte  
**MFI** : Mean Fluorescence Intensity

**MIC (A, B)** : Major Histocompatibility Complex Class I Chain Related Genes A Et B  
**MLR** : Réaction Lymphocytaire Mixte  
**MLC** : Culture Lymphocytaire Mixte  
**MMF** : Mycophénolate Mofetyl  
**MSL** : Milieu de Séparation des Lymphocytes  
**Mtor** : Molecular-Target-Of-Rapamycin  
**NCA** : Néphropathie Chronique d'Allogreffe  
**NFAT** : Facteur Nucléaire des Lymphocytes T Activé  
**Nfkb** : Facteur Nucléaire Kb  
**NK** : Natural Killer  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**PCR** : Réaction en Chaîne par Polymérase  
**PCR-SSP** : Sequence Specific Oligonucleotide  
**PCR-SSO** : Séquence Specific Primer  
**PCR-SSOR** : Séquence Specific Oligonucleotide Reverse  
**PCR-SBT** : Sequence Based Typing  
**PIP2** : Phosphatidylinositol 4,5-Bi Phosphate Membranaire  
**PRA** : Panel Réactive Antibodies  
**TCR** : T Cell Receptor  
**Tgfβ** : Transforming Growth Factor  
**Th** : Cellule T Helper  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**TR** : Transplantation Rénale  
**VCAM** : Vascular Cell Adhesion Molecule  
**VLA** : Very Late Activation Antigen

Remerciements

Dédicaces

## Sommaire

Introduction .....1

### RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

#### CHAPITRE I : Rappel sur le système majeur d'histocompatibilité

I. Histoire et découverte du système HLA .....	3
II. Implication du système HLA dans la transplantation rénale.....	4
II-1 : Description du système HLA .....	4
II-1-1 : Organisation génétiques du complexe HLA .....	4
II-1-2 : Structure des molécules HLA .....	6
II-1-3 : Expression des molécules HLA .....	8
II-1-4 : Les caractéristiques du système HLA .....	8
II-1-4-1 : Le polymorphisme .....	9
II-1-4-2 : Etude du polymorphisme (typage HLA).....	9
II-1-4-2-1 : Technique sérologique.....	9
II-1-4-2-2 : Technique de biologie moléculaire.....	10
II-1-4-3 transmission génétique .....	10
II-1-5- Nomenclature du système HLA .....	11
III -Principales fonctions du HLA .....	13
IV- molécules apparentés au HLA : MIC (A, B).....	14

#### CHAPITRE II : MECANISME DE LA REPONSE ALLOGENIQUE : LE REJET

I- Le rejet hyperaigu.....	16
I-1 Cible antigénique.....	16
I-2 Circonstances d'apparition des Ac préformés :.....	16
I-2-a Transfusion.....	16
I-2- b Grossesse.....	17
I-2- c Transplantation.....	17
I-3 Déroulement de la réponse immunitaire.....	17
I-4 Conséquences .....	19
I-5 Diagnostic.....	19
I-5-a Clinique.....	19
I-5 -b Histologique.....	20
I-6 Prévention et traitement .....	20
II- Le rejet aigu.....	20
II-1 Cible antigénique .....	21
II- 2 Déroulement de la réponse immunitaire .....	21
II- 2-1Mécanismes moléculaire et cellulaires de l'allorecognition .....	21
II-2-1- a : Allorecognition directe .....	21
II-2-1 b : Allorecognition indirecte .....	23
II-2-2 Localisation et cinétique de sensibilisation des LYT alloreactifs.....	23
II-2-3 Phase d'activation lymphocytaire .....	25



II-2-3-a : Activation des LY T CD4+	25
II-2-3-b : Activation des LY CD8+	27
II-2-3-c : Activation des LY B	27
II-2-4 Migration des cellules effectrices vers le greffon	28
II-3 Mécanismes effecteurs du rejet de greffe	29
II-3-1 Rôle des effecteurs cellulaires	29
II-3-1-a : La reconnaissance directe à la phase effectrice	29
II-3-1-b : La reconnaissance indirecte à la phase effectrice	30
Cytotoxicité des LY CD8+	30
Hypersensibilité retardée	31
Phénomène de tolérance	32
II-3-2 Rôle des effecteurs humoral	32
II-4 Les Conséquences :	33
II-4-a : Les effecteurs cellulaires sont responsables d'	33
II-4-b : Les effecteurs humoraux sont responsables d'	34
II-5 Le diagnostic	34
II-5-a : Clinique	34
II-5-b : Déséquilibres associés	35
II-5-c : Histologique	35
II-6 : Prévention et traitement	37
<b>III Le rejet chronique et la néphropathie chronique du transplant</b>	<b>38</b>
III-1 : Déroulement de la réponse immunitaire	38
III-2 : Rôle des Ac dans le rejet chronique	38
III-3 : Conséquences	39
III-4 : Diagnostic	40
III-4-a : Clinique	40
III-4-b : Histologique	40
III-5 : Prévention et traitement	41

## **CHAPITRE III : PRISE EN CHARGE IMMUNOLOGIQUE DES MALADES EN PRE ET POST GREFFE RENALE**

<b>I : Evaluation et préparation du receveur</b>	<b>42</b>
<b>II: L'étude de la compatibilité HLA</b>	<b>42</b>
II-1 : Le typage HLA	43
II-1-1 : le typage HLA par sérologie	43
II-1-2 : le Typage HLA par biologie moléculaire	44
II-1-2-a : Typage HLA par PCR - SSO « séquence specific oligonucléotide »	45
II-1-2-b : Typage HLA par PCR - SSP « Sequence Specific Primer »	46
II-1-2-c : PCR SSO Reverse « Technologie Luminex »	47
II-1-2-d : Le Séquençage « PCR SBT : Sequence Based Typing »	48
II-2 : L'intérêt de typage HLA	50
II-3 : Recommandation	50
<b>III: le suivi des malades</b>	<b>51</b>
- La constitution d'une sérothèque	51
III-1 : La surveillance d'une allo immunisation	52
III-1-1 : Technique de recherche et d'identification des Ac anti-HLA	52
III-1-1-a : Lymphocytotoxicité complément dépendante	52
III-1-1-b: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	53
III-1-1-c : Technologie Luminex	54

III-1-2 : Technique de cross match.....	55
III-1-2-a: Cross match par Lymphocytotoxicité.....	55
III-1-2-b: Cross match par Cytométrie en flux .....	57
III-1-2-c : Cross match par Luminex.....	58
III-2 : Intérêt de recherche et d'identification des Ac anti HLA.....	58
III-2-1 : Prévention en amont de la greffe.....	59
III-2-2 : La surveillance des malades greffés.....	62
III-2-2-a : Le protocole de suivi d'apparition des Ac.....	62
III-2-2-b : Conduite à tenir devant les résultats de la recherche des Acs.....	63

## CHAPITRE IV : PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

I- Le traitement préventif de rejet.....	67
I-a : Traitement d'induction.....	67
I-b : Traitement d'entretien.....	68
II- Le Traitement curatif du rejet.....	70
III-Tableau de classification des traitements immunosuppresseurs.....	72

### Partie pratique

#### Matériels et méthodes

I-Matériels .....	76
I-1 Matériels biologiques.....	76
I-2 Matériels non biologiques .....	76
II- Méthodes .....	77
II-1 : Prélèvement .....	77
II-2 : Etude de polymorphisme HLA .....	78
II-2-1 : Techniques sérologique.....	78
II-2-1-1 : Principe de la réaction de microlymphocytotoxicité (LCT) .....	78
II-2-1-1-A : Ac utilisés.....	78
II-2-1-1-B : Cibles utilisées.....	78
II-2-1-2 Technique de séparation des Ly.....	79
II-2-1-2-A : Séparation des Ly totaux (T+B).....	79
II-2-1-2-B : Séparation des Ly B.....	80
II-2-1-3 : Typage HLA par technique de LCT.....	82
II-2-1-3 -A : Préparation des plaques de Terasaki.....	82
II-2-1-3-B : Pour le typage HLA.....	82
II-2-1-3-C : Lecture des résultats de LCT.....	82
II-2-1-3-D : Interprétation des résultats.....	84
II-2-2 : Techniques de biologie moléculaire.....	84
II-2-2-1 : La PCR .....	84
II-2-2-2 : Extraction de l'ADN à partir du sang périphérique.....	86
II-2-2-3 : Typage HLA classe I Générique par PCR-SSP .....	87
II-3 : Techniques de recherche des anticorps anti-HLA .....	90
II-3-1 : Recherche des anticorps anti HLA classe I et II d'isotypes IgG par technique immunoenzymatique ELISA .....	90
II-3-1-a : Principe .....	90
II-3-1-b : Mode opératoire .....	90
II-3-1-c : Lecture des résultats et interprétation.....	92
II-3-1-d : Identification des Ac anti HLA et interprétation.....	93

II-3-2 : Cross match par Lymphocytotoxicité .....	94
II-3-2-a : Principe .....	94
II-3-2-b : mode opératoire.....	95
II-3-2-c : Interprétation des résultats.....	97
Résultats .....	98
Discussion.....	122
Conclusion.....	129
Bibliographie	
Annexes	

# Partie bibliographique

# Introduction

## **Introduction :**

La transplantation rénale (TR) est une thérapie qui consiste à remplacer un rein défectueux par un autre prélevé sur un donneur vivant ou cadavérique. Cette intervention est devenue le traitement de choix car elle améliore non seulement la qualité mais également l'espérance de vie des patients (65).

Une transplantation réalisée entre individus génétiquement différents mais appartenant à la même espèce est définie comme une allogreffe ou greffe allogénique, c'est le cas d'une TR.

L'obstacle majeur d'une allogreffe qui est à l'origine des différences génétiques entre le donneur et le receveur est le rejet qui est un phénomène de nature immunologique, faisant intervenir aussi bien les mécanismes de l'immunité cellulaire que ceux de l'immunité humorale, entraînant des lésions du parenchyme rénal pouvant évoluer jusqu'à la destruction totale du greffon et la perte de sa fonction, dont les principaux alloantigènes incriminés dans cette réponse sont les produits des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimés par le greffon (109).

En plus de ces Ag HLA, interviennent dans le rejet les Ag érythrocytaires ABO, les Ag de systèmes mineurs d'histocompatibilité et des Ag propres aux monocytes, aux cellules endothéliales et épithéliales (198).

La réponse immune de type cellulaire et/ou humorale, dirigée contre tous ces antigènes portés par le greffon, permet de distinguer différents types de rejets qui selon leurs mécanismes immunopathologiques, leurs intensités et leurs délais d'apparition peuvent être : hyper aigus, aigus ou chroniques (198).

Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années, dans le cadre de réduire l'action du système immunitaire et donc prévenir et maîtriser ces rejets, d'une part la connaissance de l'histocompatibilité pour un meilleur choix des couples donneur-receveurs est primordiale, et d'autre part la place majeure du suivi immunologique dans tout programme de TR.

Le paramètre clé du suivi immunologique est représenté par la constitution d'une sérothèque qui est une collecte des sérums historique en pré et en post greffe permettant le dépistage des anticorps (Acs) anti-HLA, ainsi que la surveillance de leurs apparitions suite à un événement immunisant.

Au même temps la maîtrise de ces connaissances permettant d'instaurer un schéma thérapeutique adapté pour chaque patient.

Ce présent travail a porté sur un suivi des malades greffés ou candidats à la greffe recrutés au niveau de l'unité d'immunologie de Hassiba Ben Bouali, il a pour objectifs :

1. Evaluer la qualité de la prise en charge des malades recrutés dans notre échantillon.
2. Evaluer les moyens de suivi des malades en pré transplantation et établir un protocole pour assurer la réussite de la TR.
3. Adopter des moyens de suivi des malades en post greffe et proposer un protocole adapté pour améliorer le choix du donneur d'une part et les moyens thérapeutique d'autre part et donc assurer la survie du greffon.
4. Améliorer les moyens de diagnostic des rejets tout en limitant leur progression.

# Chapitre I



## **Chapitre I : Rappel sur le système majeur d'histocompatibilité**

### **I-Histoire et découverte du système HLA :**

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est un ensemble de gènes, qui s'expriment sous forme de molécules de surface de nature glycoprotéique. Ces molécules sont des alloantigènes impliqués dans le phénomène de rejet, qui peut survenir lors des transplantations rénales. (18)

Sa découverte a connu plusieurs étapes établies à travers des différents travaux au cours de l'histoire :

En 1936, les travaux de Gorer et Snell, sur le transfert de tumeurs de souris greffées à d'autres souris, ont montré que la greffe était rejetée en cas d'histoincompatibilité ou tolérée en cas d'histocompatibilité. Ce rejet et cette tolérance sont génétiquement dépendants. Cela amène à la découverte d'un système d'histocompatibilité appelé H<sub>2</sub> chez la souris et de plusieurs systèmes mineurs. L'existence du CMH a été confirmée ensuite chez tous les mammifères, où il porte des noms différents. (18)

En 1958, J. Dausset met en évidence, dans le sérum d'un sujet atteint d'aplasie médullaire et polytransfusé, un alloanticorps qui agglutine les leucocytes de certains sujets. Cela est à l'origine de la découverte d'un système allotypique humain appelé HLA ultérieurement mis en évidence au niveau de la surface des leucocytes, puis de presque toutes les cellules de l'organisme. A l'origine, HLA correspondait à human leucocyte locus A, mais est maintenant souvent traduit par human leucocyte antigen. (18)

Au cours des études de survie de greffe cutanée, entre donneur et receveur HLA identique ou différent, ce système s'est révélé le CMH de l'homme. (18)

La fonction physiologique du CMH n'a été découverte qu'ultérieurement. La propriété de répondre à un antigène particulier dépend du CMH, appelé pour cette raison gènes de la réponse immune. Ultérieurement, Doherty et Zinkernagel firent en 1974 une découverte extrêmement importante : la réponse immune vis-à-vis d'un agent viral est restreinte au CMH de l'individu. (18)

En 1969, Patel et Terasaki apportèrent une preuve convaincante de la responsabilité des anticorps anti-HLA dans la survenue des rejets de type humoral et décrivaient la technique du cross-match par microlymphocytotoxicité dépendante du complément (*complement-dependent cytotoxicity* : CDC), qui est encore utilisée à l'heure actuelle. (123)

En 1987, Cristallisation de la première molécule du CMH de classe I. (69)

En 1996, Cristallisation du premier complexe TCR-CMH-peptide. (69)

La connaissance de ce système (CMH) a permis de comprendre les mécanismes de rejet d'une greffe d'organe survenant de façon quasi inévitable entre deux individus non apparentés. (60)

## **II-Implication du système HLA dans la transplantation rénale :**

L'importance et l'implication du système HLA était clairement définie dans les transplantations rénales depuis tant d'années, grâce aux différentes études établies sur ces gènes et leurs molécules. Actuellement, il est reconnu comme étant l'élément central dans le contrôle de la réponse immune. (176)

### **II-1 Description du système HLA :**

La connaissance des gènes HLA, les molécules qui résultent de leur expression ainsi leurs caractéristiques permettent de comprendre le rôle qu'ils peuvent assurer dans les réponses face à un greffon.

#### **II-1-1 Organisation génétique du complexe HLA :**

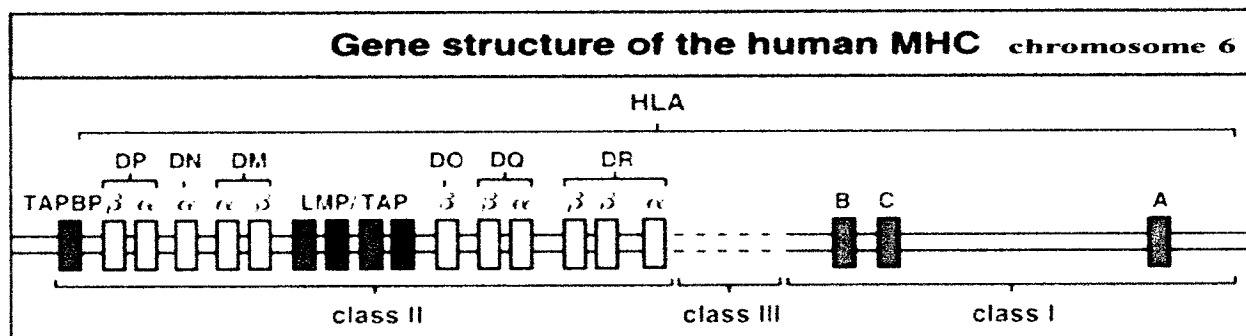
La région HLA est située sur le bras court de la sixième paire chromosomique, elle comporte de nombreux gènes, partagés en trois classes de structure similaire mais non identique, et de fonctions différentes. (60) **(Fig.1)**

Ces gènes sont dit classiques ou non classiques.

-Les gènes classiques sont repartis en 3 classes:

- **le système HLA de classe I :** comprend principalement les gènes HLA-A, -B et -C, ils codent pour la chaîne  $\alpha$  des molécules de classe I (60). Leur désignation reflète l'ordre historique de leur découverte et non leur localisation sur le Chromosome. (176)
- **le système HLA de classe II :** situé dans la région D, est constitué d'un ensemble de familles de gènes dont les principales sont HLA-DR (gènes DRA et DRB1), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DP (DPA et DPB). Pour chacune des familles, il existe des gènes fonctionnels et des gènes non fonctionnels (pseudo-gènes). Ils codent pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules de classe II. (60)
- Située entre les régions I et II (entre B et DR), la **région III** ne renferme pas de gènes intervenant dans la présentation antigénique. Elle contient des gènes codant pour des protéines du système du complément (C2, C4, facteur B), pour le TNF et pour les lymphotoxines. (60)

-Les gènes HLA non classiques, de classe I ou de classe II, présentent une structure proche, plus ou moins polymorphes, pouvant être impliqués dans certaines étapes des réponses immunitaires. (60)

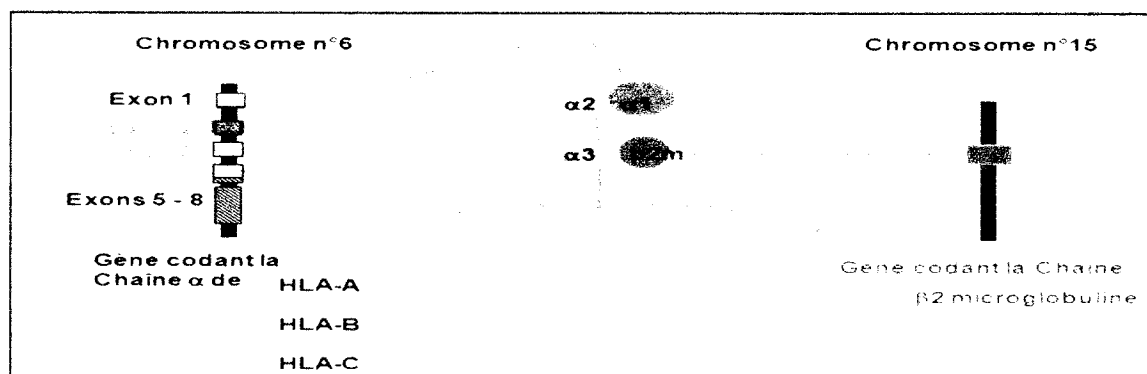


**Figure 1 :** schéma représentatif de la localisation des gènes HLA sur le bras court du chromosome 6.

Les gènes HLA sont organisés en plusieurs exons qui correspondent à différents domaines.

- *Exons de classe I :* sont en nombre de 8, le premier exon code la région 5' non traduite et les 24 acide aminé (aa) du peptide signal. Les exons 2, 3 et 4 codent respectivement les 3 domaines extramembranaires, les derniers exons codent le peptide de connexion, les régions transmembranaires et cytoplasmiques et la région 3' non traduite. (45)

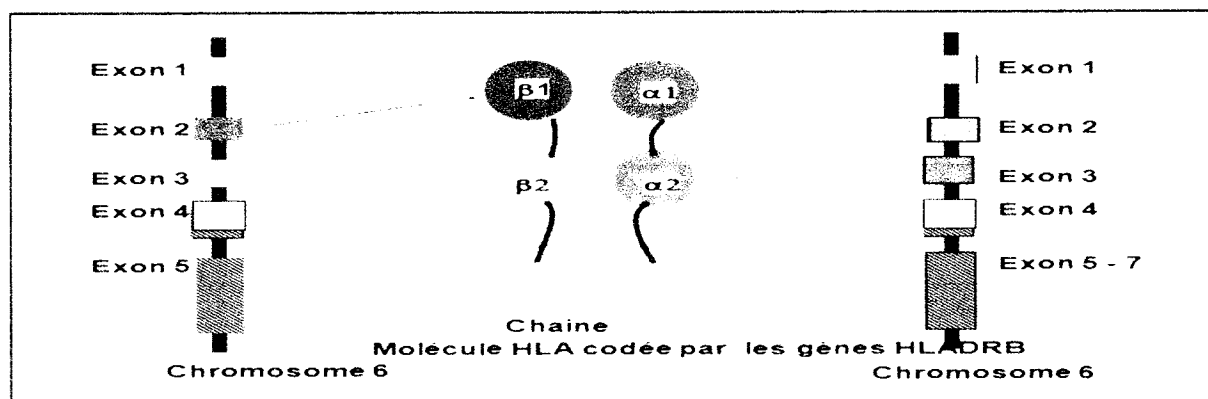
L'exon 8 code seulement la région 3' non traduite pour les gènes du locus B, il code également la fin de la chaîne intra cytoplasmique des gènes du locus A. (45) (Fig.2)



**Figure 2:** schéma représentatif des exons de HLA I. (03)

- *Exon de classe II :* sont au nombre de 5, le premier exon code la séquence 5' non traduite et le peptide signal. Les exons 2 et 3 codent respectivement les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  de la chaîne  $\alpha$ , ou  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  de la chaîne  $\beta$ . L'exon 4 code les régions transmembranaires et cytoplasmiques. (45)

Le dernier exon code la région 3' non traduite. Dans les régions DRB1 et DPB1, la région cytoplasmique est codée par un 5<sup>ème</sup> exon. (45) (Fig. 3)



**Figure 3:** schéma représentatif des exons de HLA II. (03)

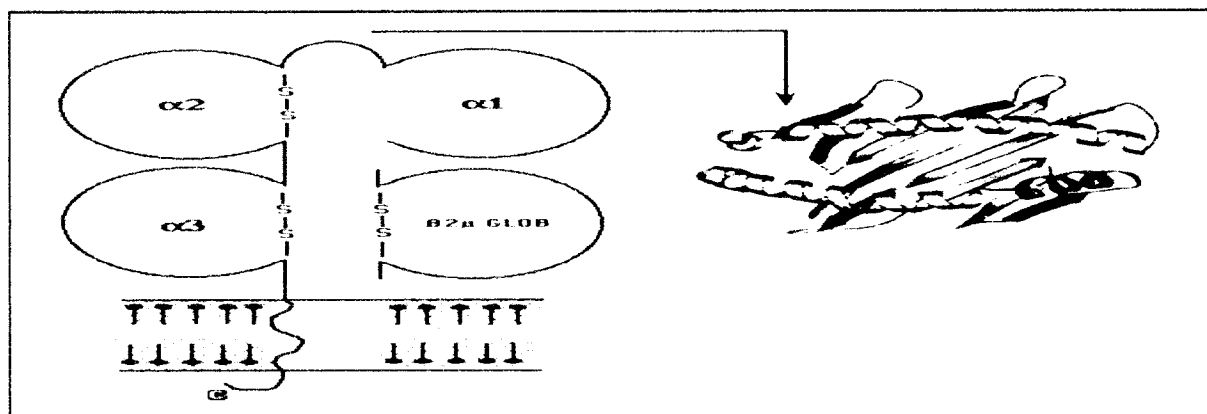
### II-1-2 : Structure des molécules HLA:

Toutes les molécules du HLA ont en commun d'être composées d'une poche extramembranaire fixant les peptides, d'une paire de domaine « Immunoglobuline-like », d'un domaine transmembranaire de fixation à la cellule puis d'une région intra cytoplasmique. (141)

Les *molécules HLA- I* sont composés de deux chaînes polypeptidiques ; une chaîne lourde  $\alpha$ , implantée dans la membrane cellulaire, et une chaîne légère, la  $\beta_2$ microglobuline, qui est protéine non glycosylée, associée de façon non covalente à la chaîne lourde  $\alpha$  (45), dont son gène correspondant est situé sur le chromosome 15. (60)

La partie extracellulaire de la chaîne  $\alpha$  est formée de trois domaines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , comportant chacun 90 aa. (45)

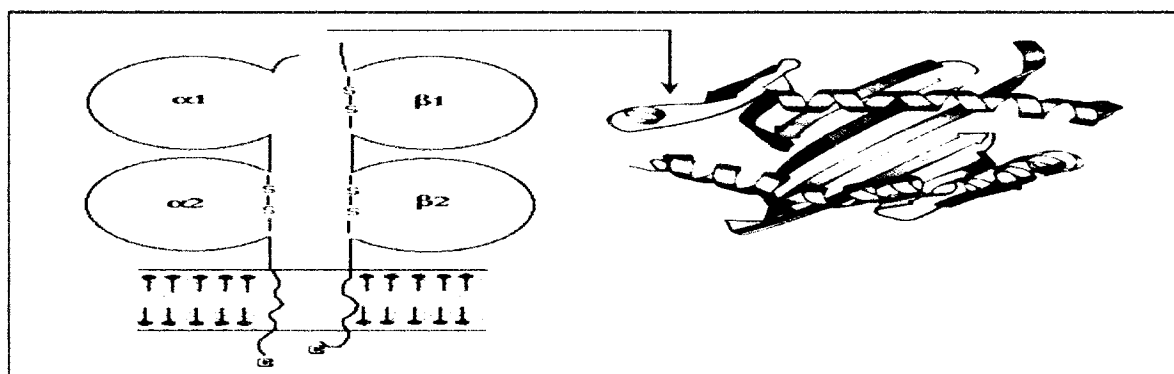
Chaque domaine correspond à un exon distinct. Les domaines  $\alpha_3$  et  $\beta_2$ microglobuline sont relativement conservés et son homologues à un domaine constant d'une immunoglobuline. (45)



**Figure 4** : Molécule HLA de classe I. Les régions hypervariables sont indiquées sur les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . L'aspect tridimensionnel de la molécule et du site de fixation peptidique est représenté à droite. (60)

En ce qui concerne les *molécules HLA- II*, elles sont formées de deux chaînes glycoprotéiques transmembranaires  $\alpha$  et  $\beta$  associées de façon non covalentes. La chaîne  $\alpha$  est plus glycosylée que la chaîne  $\beta$ . (45)

La molécule avec 4 domaines a une structure tridimensionnelle comparable à celle de la molécule I : les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  immunoglobuliniques juxta membranaires supportent les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  N-terminaux qui forme le site de présentation du peptide antigénique. (45)



**Figure 5** : Molécule HLA de classe II. L'aspect tridimensionnel de la molécule et du site de fixation peptidique est représenté à droite (45)

### II-1-3 Expression des molécules HLA :

L'expression des molécules HLA dépend de leur classe, du type cellulaire et est influencée par des cytokines pro inflammatoires. (60) Par exemple, L'interféron- $\gamma$  induit soit une hyper expression membranaire des molécules HLA de classe I et II, soit une expression de ces molécules à la surface des cellules qui en sont normalement dépourvues.

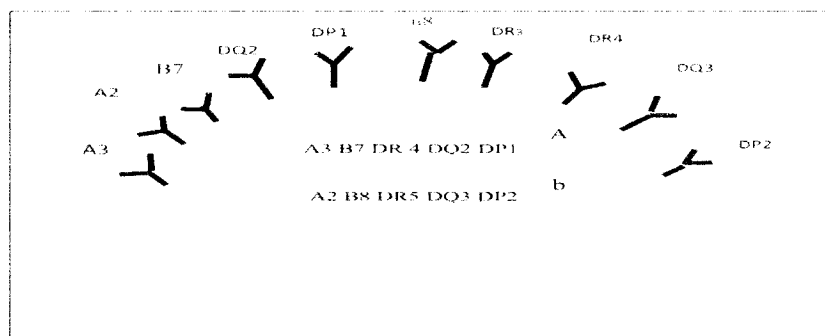
Les molécules HLA de classe I sont exprimées à la surface de pratiquement toutes les cellules nucléées de l'organisme (les érythrocytes sont donc dépourvus) (107). Cependant des travaux ont montré que certains types cellulaires n'exprimaient pas de molécules HLA de classe I (hépatocytes, par exemple) ou en exprimaient un taux très faible. (60)

Quant aux molécules de classe II, ils ont une expression cellulaire plus restreinte. Ils ne sont exprimées que par un nombre réduit de types cellulaires, principalement : les lymphocytes B, les cellules de la lignée myélo-monocytaire et les lymphocytes T activés. (60)

### II-1-4 Les caractéristiques du système HLA :

Dans leur ensemble, les gènes HLA possèdent 3 caractéristiques importantes :

- ✓ *Polymorphisme* : chaque gène est multi-allélique, sauf HLA-DRA.
- ✓ *Codominance* : chez un sujet hétérozygote, les deux allèles sont exprimés. (Fig.6)
- ✓ *Etroite liaison* : tous les gènes situés sur un même chromosome se transmettent en bloc à la descendance sous forme d'haplotype. (18)



**Figure 6 :** Expression co-dominante des gènes HLA

#### II-1-4-1 Le polymorphisme : (60)

C'est par la comparaison des individus d'une population que peut être défini le polymorphisme du système HLA.

Il existe plusieurs dizaines de gènes HLA de classe I. Les trois principaux sont : les gènes HLA-A, -B et -C. Ces gènes sont polymorphes (polyalléliques).

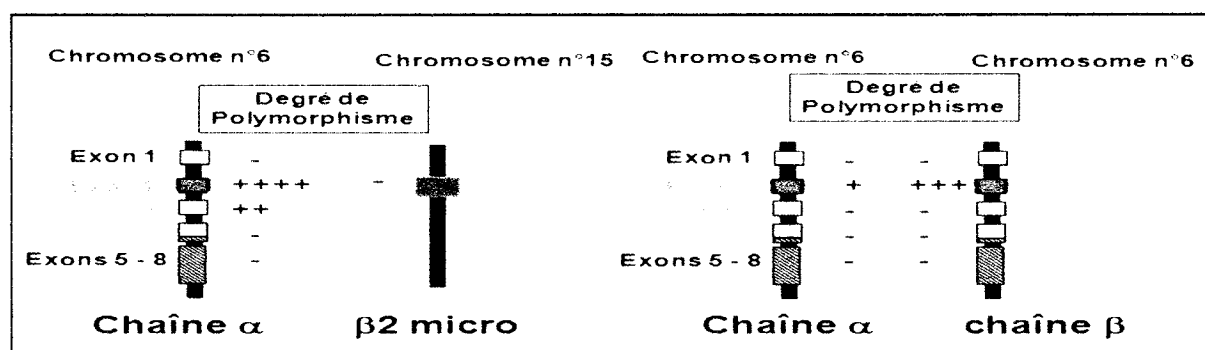
Les principales familles de gènes HLA de classe II: HLA-DR -DQ -DP, sont constituées de plusieurs gènes. On dénombre des centaines de gènes au niveau de la famille DR : le gène

DRA invariant codant pour la chaîne DR $\alpha$  et plusieurs aussi pour DRB dont quatre sont fonctionnels et polymorphes (B1, B3, B4 et B5), codant pour les chaînes DR $\beta$ . La molécule membranaire mature HLA-DR est formée de l'association d'une chaîne DR $\alpha$  et d'une chaîne DR $\beta$ . Seuls les gènes DRB sont responsables du polymorphisme du composant HLA-DR. En ce qui concerne les composants HLA-DQ et HLA-DP, les gènes DQA, DQB et DPA sont polyalléliques.

En effet, il existe une correspondance entre les exons au niveau des gènes HLA et des entités structurales et fonctionnelles appelées " domaines " au niveau des protéines. Cette correspondance est parfaite pour les domaines extramembranaires.

Le polymorphisme au niveau des molécules HLA de classe I est porté par les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , les plus distaux par rapport à la membrane cellulaire. En effet, la chaîne légère la  $\beta 2$ -microglobuline est monomorphique.

Quant aux molécules HLA de classe II, Les variations des séquences en nucléotides et en acides aminés sont encore ici, principalement localisées aux domaines extérieurs  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  sous forme de régions hypervariables. Les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  sont par contre conservés.



**Figure 7:** schéma représentatif des exons porteurs du polymorphisme (03)

#### II-1-4-2 Etude du polymorphisme (typage HLA):

L'analyse et la dénomination des antigènes HLA se pratiquent habituellement au moyen de test appelé « sérologique » et par « biologie moléculaire ».

##### II-1-4-2-1 La technique sérologique :

Les méthodes sérologiques recherchent à identifier les protéines exprimées à la surface des cellules à l'aide d'anticorps spécifiques. On parle alors de typage HLA (141).

La technique de référence est la « microlymphocytotoxicité » utilisée surtout pour le phénotypage du HLA A (24 Spécificités), HLA B (52 spécificités), HLA C (18 spécificités), mais elle ne permet de discriminer que peu de spécificité pour HLA II (18).

Cette méthode consiste, à l'aide d'anticorps anti-HLA caractérisés, à rechercher la présence de l'antigène correspondant sur les cellules que l'on veut typer. (208)

Les antisérums utilisés peuvent reconnaître soit des épitopes privés correspondant aux segments polymorphes spécifiques d'antigènes, soit des épitopes publics qui sont partagés entre différents antigènes HLA (BW4, BW6, DR53) soit des splits sérologiques. (18)

Cette technique est rapide, mais la reconnaissance ne dépasse pas le niveau générique. (208)

#### **II-1-4-2-2 Le typage par biologie moléculaire :**

Les progrès des techniques moléculaires ont conduit à un changement fondamental dans la méthodologie du typage des molécules HLA de Classe II. Elles offrent plusieurs avantages par rapport à la méthode sérologique. (208) elles donnent le génotypage HLA.

Elle permet une détermination au niveau générique et allélique. Plusieurs techniques existent, toutes passent par une étape de PCR (réaction en chaîne par polymérase), qui permet d'amplifier la région du gène que l'on veut étudier. (208)

##### **II-1-4-2-2-a PCR-SSO (séquence specific oligonucléotide):**

Consiste à amplifier la région de l'ADN génomique qui représente un polymorphisme d'intérêt. Les amorces choisies sont localisées dans des régions hautement conservées encadrant la zone polymorphe.

##### **II-1-4-2-2-b PCR-SSP (séquence specific primer) :**

Elle désigne une amplification basée sur l'utilisation d'amorces localisées dans la région polymorphe de façon à permettre une amplification spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèle.

##### **II-1-4-2-2-c Typage HLA par séquençage ou PCR-SBT (séquence based typing) :**

Il consiste à séquencer directement la région polymorphe du gène HLA obtenue par PCR en déterminant la succession des nucléotides qui le compose. (208)

#### **II-1-4-3 Transmission génétique : (18)**

Les différents gènes proches les uns des autres se transmettent en bloc à la descendance et constituent un haplotype. Il existe un grand nombre de gènes dans le HLA et un grand polymorphisme : le nombre d'haplotypes différents est très important.

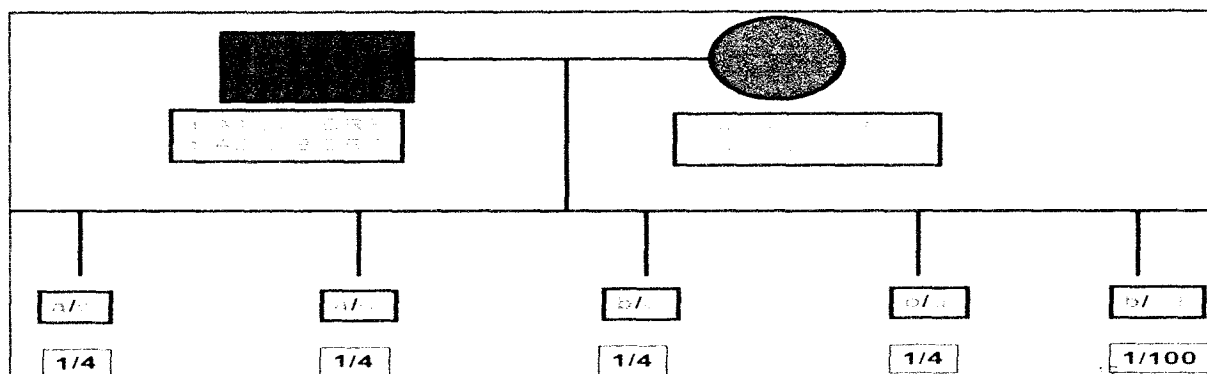
Exemple : pour élucider la transmission génétique à partir des parents à leur enfants, on donne aux deux haplotypes paternels l'appellation a et b et ceux de la mère c et d. il existe 4 possibilités d'enfants : ac ; ad ; bc ; bd avec en plus, mais rarement, des enfants avec des gènes paternels ou maternels recombinés.

Dans les fratries, on observe 4 situations :



- ✦ HLA *identique* : dans 25% de cas. Les deux frères ou sœurs ont reçus le même haplotype. Ils sont donc identiques pour HLA A, B, C, DR, DQ et donc pour toute la région du CMH humain.
- ✦ HLA *semi-identique* (50% de cas) : ils ont entre eux qu'un seul haplotype identique maternel ou paternel.
- ✦ HLA *différent* (25% de cas) : aucun haplotype n'est semblable.

Ce mode de transmission est important à connaître dans la transplantation rénale. La meilleure solution pour un receveur est de trouver un donneur intrafamilial représenté par un frère ou une sœur HLA identique, il faut tenir compte de la carte génétique, pour avoir une compatibilité maximale.



**Figure 8** : schéma représentatif de la transmission génétique à partir des parents vers leurs enfants. (03)

### II-1-5 Nomenclature du système HLA :

La nomenclature des gènes HLA classiques est très précise et harmonisée au niveau international (107). Elle a été mise au point par un groupe d'experts de l'OMS (IMGT/HLA) qui en garantit la mise à jour et la pérennité. Elle permet d'intégrer les nouveaux allèles HLA au fur et à mesure de leur découverte. (60) ce comité responsable de la nomenclature a été créé en 1968 (220).

Il existe deux niveaux pour définir le typage HLA : (01)

- Typage HLA de niveau générique qui est de basse résolution et est obtenue par méthode sérologique et aussi par biologie moléculaire, il permet d'identifier des familles d'allotypes désignées par le nom du gène et un numéro ou deux précédé ou non de la lettre w (workshop signifiant une nomenclature provisoire). Exemple : HLA A1, HLA BW41, HLA DRW4, HLA DP1 (101)

-Les spécificités larges sont indiqués entre parenthèses après la division (ou splits). (07)

Exemple :

HLA A23(9)

HLA A24 (9)

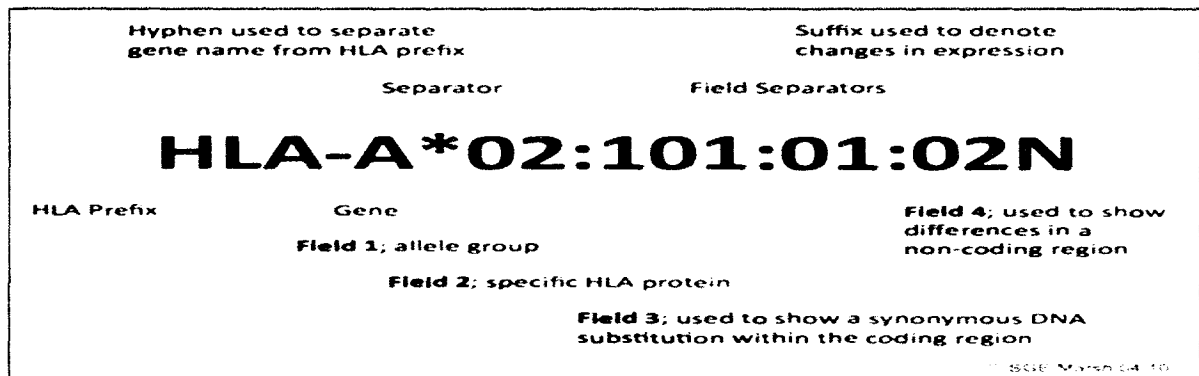
HLA B51 (5)

HLA DR11 (5)

HLA DR12 (5)

-Pour le locus C, la lettre w est accolée à C pour éviter toute confusion avec les protéines du complément. Exemple : HLA CW4. (07)

- Typeage HLA de niveau allélique qui est de haute résolution, donne l'allèle exact présent sur le chromosome de la personne à typer. Il est obtenu par technique de biologie moléculaire. Sur le plan de la nomenclature, un allèle défini au niveau génomique est désigné comme suit : gène étudié et son numéro suivi d'un astérisque \* puis de 4 à 5 chiffres :
  - Un chiffre pour la chaîne elle-même. Par exemple pour le DR, il existe plusieurs chaînes  $\beta$  :  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$
  - Un \* sépare cette partie localisant le gène, de l'allèle ou du variant allélique.
  - Les allèles sont désignés par 2 chiffres qui correspondent, en général, à la spécificité antigénique définie par technique sérologique.
  - Les deux derniers chiffres correspondent aux variants alléliques de l'allèle.
  - Exemples :
    - HLA B27 s'écrit HLA B\*2701 à 24.
    - HLA DR4 s'écrit HLA DR $\beta 3$ \*0201 ; 0402 ect...
    - HLA DR53 s'écrit HLA  $\beta 4$ \*0401. (101)

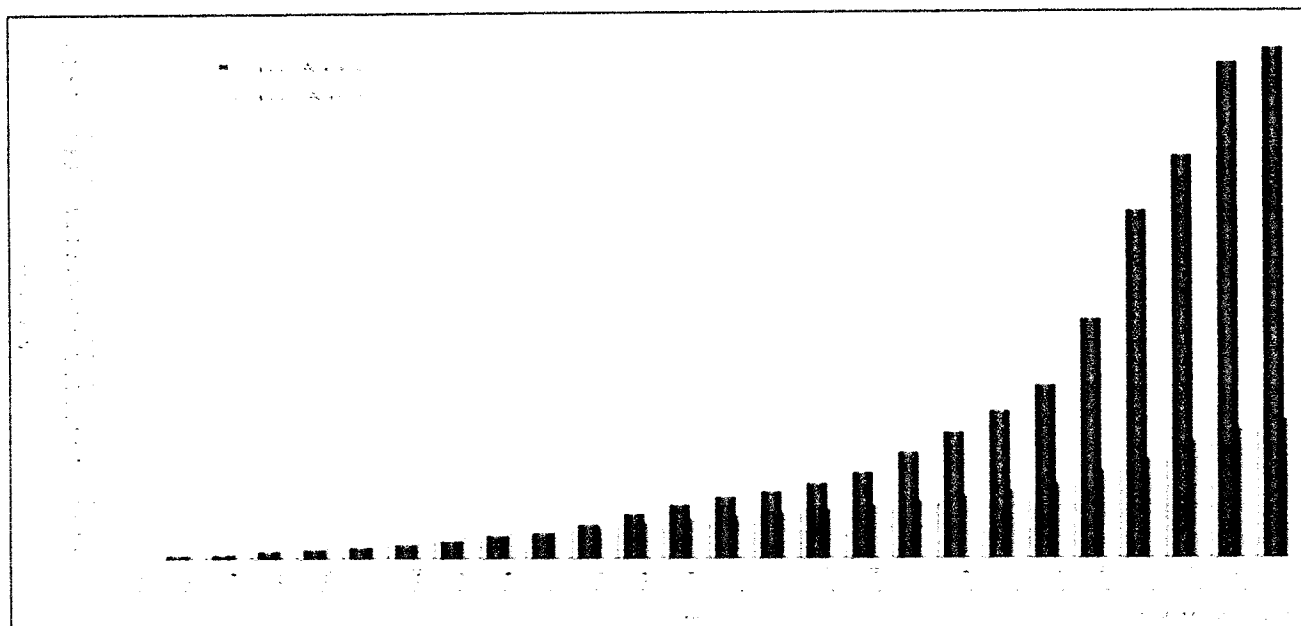


**Figure 9** : exemple d'une nomenclature HLA-A<sub>2</sub> obtenue par une haute résolution.

- En Janvier 2011, le nombre des Allèles HLA est 6 074 (D'après [http:// hla.alleles.org](http://hla.alleles.org)):

- o HLA classe I: 4721.
- o HLA classe II : 1353.

**Note :** la nomenclature officiellement reconnue pour les spécificités HLA ainsi que celle des différents allèles identifiés est donnée en **Annexe N°1**.



**Figure 10:** représentation graphique montrant la découverte de nouveaux allèles HLA depuis 1987 jusqu'au 2013 (220).

### **III -Principales fonctions du HLA :**

Les molécules d'histocompatibilité ont un rôle fondamental de présenter le peptide dégradé à partir de l'antigène aux lymphocytes auxiliaires et cytotoxiques. La spécificité de la reconnaissance est une réaction à trois partenaires : la molécule du HLA, le peptide antigénique dégradé et le TCR (208).

#### **III-1 Molécules HLA-I :**

Leur rôle est essentiel dans les réactions qui font intervenir les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup>. Les molécules HLA-I présentent au TCR des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> un peptide endogène virale ou un autopeptide. La plupart des peptides présentés aux lymphocytes CD8 par le HLA de classe I comportent 9 aa. (141)

Le lym T CD8<sup>+</sup> n'interagit avec une cellule infectée que s'il reconnaît par son TCR l'antigène viral et le CMH de la cellule.

La molécule T CD8<sup>+</sup> se lie au CMH au niveau du domaine  $\alpha 3$  renforçant l'adhésion du TCR à son ligand.

### **III-2 Molécules HLA- II:**

Ces molécules présentent aux lymphocytes CD4+ un peptide d'origine exogène issu de protéine antigénique endocytée et dégradée par les cellules présentatrices d'antigène. Les peptides présentés par les molécules HLA de classe II sont plus longs (autour de 15 aa).

Le lym T auxiliaire CD4+ par son TCR reconnaît l'antigène et le CMH. La molécule CD4+ complète la reconnaissance par une interaction avec le domaine  $\beta 2$  du CMH.

Elles interviennent aussi dans les interactions entre le lym B et T auxiliaires qui conduisent à la production d'Ac. De même que dans les interactions entre deux lymphocytes auxiliaires CD4+ conduisant à la production de lymphokines (141).

### **III-3 Réponse allogénique et rejet de greffe :**

La surface d'une cellule est une mosaïque de molécules HLA I et II. Au cours d'une réponse allogénique, les lymphocytes éduqués pour tolérer les molécules HLA et les antigènes du soi reconnaissent comme étrangères les molécules du HLA d'autrui.

La réaction allogénique est une réaction immunitaire de rejet comportant une étape de prolifération (induite par le HLA II) et une étape de cytotoxicité spécifique (induite par le HLA I) (181). (Voir chapitre II)

### **VI- Les molécules HLA apparentées MIC (A, B) et Les Ag mineurs d'histocompatibilité :**

Entre les gènes HLA-A et HLA-B, on retrouve des gènes appelés MIC (A et B) pour *Major Histocompatibility Complex class I chain related genes A et B* (18).

Ces molécules « HLA-I like » possèdent la structure minimale des molécules HLA de classe I. cependant, ils ne sont pas associés à la  $\beta 2$ -microglobuline à la surface cellulaire, et ils ne fixent pas de ligands peptidiques conventionnels (141).

Ces molécules sont essentiellement exprimées par les cellules épithéliales intestinales et thymiques, leur l'expression n'est pas induite par l'interféron, mais par le stress cellulaire.

Ce phénomène est lié à la présence dans la région promotrice des gènes MIC d'éléments régulés par le choc thermique. Elles sont reconnues par certains récepteurs de cellules NK (NKG2D) ou de lymphocytes T non conventionnels. L'interaction MICA/MICB et NKG2D provoque une réponse cytolytique des lymphocytes T et NK dirigée contre les cellules exprimant les protéines MIC. (141)

La molécule MIC, en raison de son polymorphisme important, est considérée aujourd'hui comme un des systèmes antigéniques mineurs les plus robustes par sa capacité à induire des alloanticorps. Cependant, un effet pathogène des anticorps anti-MIC sur le greffon rénal demeure à ce jour, non formellement établi (126).

En effet, leur rôle a été suggéré dans les phénomènes de rejet tardif ou chronique (37).

# Chapitre II

## **Chapitre II : Mécanisme de la réponse allogénique : Le Rejet**

La TR est avant tout caractérisé par une réponse immunitaire contre l'organe, qui conduit au rejet. Il existe schématiquement trois types du rejet :

### **I- Le rejet hyperaigu :**

Le rejet hyperaigu survient dans les heures (quelque secondes à quelque minute) qui suivent la transplantation. Il est lié à l'existence d'anticorps(Ac) préformés (Ac lymphocytotoxiques de nature IgG de haute affinité retrouvés dans le sérum du receveur, et dirigés contre les antigènes du donneur) (10).

#### **I- 1- cible antigénique :**

L'alloimmunisation est le phénomène d'apparition d'Ac dans un organisme qui a reçu des Ag d'un sujet de la même espèce dont les alloAg incriminés sont:

- Les alloAg des groupes sanguins ABO exprimés par les cellules endothéliales du donneur.
- Les alloAg HLA présentés sous la forme de complexe HLA/peptide.

#### **I- 2- circonstances d'apparition des Ac préformés :**

- AlloAc naturels préformés vis-à-vis des Ag des groupes sanguins ABO : sont des Ac naturels réguliers, c'est à dire qu'ils existent de façon constante chez tout individu qui ne possède pas le(s) Ag(s) A et/ou B, en dehors de toute stimulation antigénique.
- AlloAc anti-HLA apparaissent dans trois circonstances, transfusions, grossesse ou transplantation peuvent conduire à une immunisation dans le système HLA. Cette immunisation est d'autant plus forte en intensité (titre d'Ac), plus polyréactive (nombre de spécificité anti HLA détectées) et plus prolongée lorsque ces circonstances sont combinées :

##### **I-2-a Transfusion :**

Haward a montré en 1978 que l'immunisation anti HLA était un phénomène fréquent chez les patients recevant des transfusions plaquettaires puisque 70% d'entre eux développaient des Acs (205).

La relation entre le nombre de transfusion et l'apparition des Acs est discutée : alloimmunisation résultant de transfusion ne semble pas être en rapport avec le nombre de transfusion pour certains, (35) Pour d'autres auteurs, la relation dose- réponse existerait en dessous de vingt transfusions (36).

L'allo immunisation primaire anti HLA apparaissent après 3 à 4 semaines suivant le premier épisode transfusionnel, une apparition plus rapide serait en faveur d'un épisode anamnestique, une sensibilisation antérieure augmente de façon significative la fréquence de l'apparition des Acs lors des transfusions (193).

### **I-2- b- Grossesse :**

Une allo immunisation anti HLA est très fréquente 10% après la première grossesse et 30% chez les multipares au-delà de deux grossesses et surtout après l'accouchement. De même, si seulement 10% des patientes s'immunisent dans les suites d'une grossesse, ce chiffre passe à 50% en cas de transfusion (179).

### **I-2- c Transplantation :**

Après détransplantation d'un greffon rénal, moins de 10% des patients développent des anticorps anti-HLA en l'absence de transfusion. Si, pendant cette période, les Patients sont transfusés, 80% d'entre eux développent alors des anticorps anti HLA à un titre élevé (180).

### **N.B :**

Une immunisation forte et durable est presque toujours la conséquence de l'association de transfusions à une grossesse ou une transplantation. Cette immunisation évolue au cours du temps de trois manières possibles :

- Persistance des anticorps, même en l'absence de stimulations ultérieures.
- Disparition « simple » des Acs.
- Disparition par un mécanisme actif, lié à l'apparition d'anticorps anti-anticorps appelés anti-idiotypes (15).

La présence de tels Ac anti-idiotypes est responsable d'une inhibition de l'action des Ac anti-HLA, par exemple dans un test de cytotoxicité (131) ce qui explique leur effet bénéfique sur la survie du greffon après transplantation (169).

### **I-3- Déroulement de la réponse immunitaire :**

Les Acs préformés se fixent sur leur Ag cibles exprimé à la surface des cellules endothéliales dont la plupart des fonctions effectrices des allo-Acs sont médiés par leur fragment Fc (47).

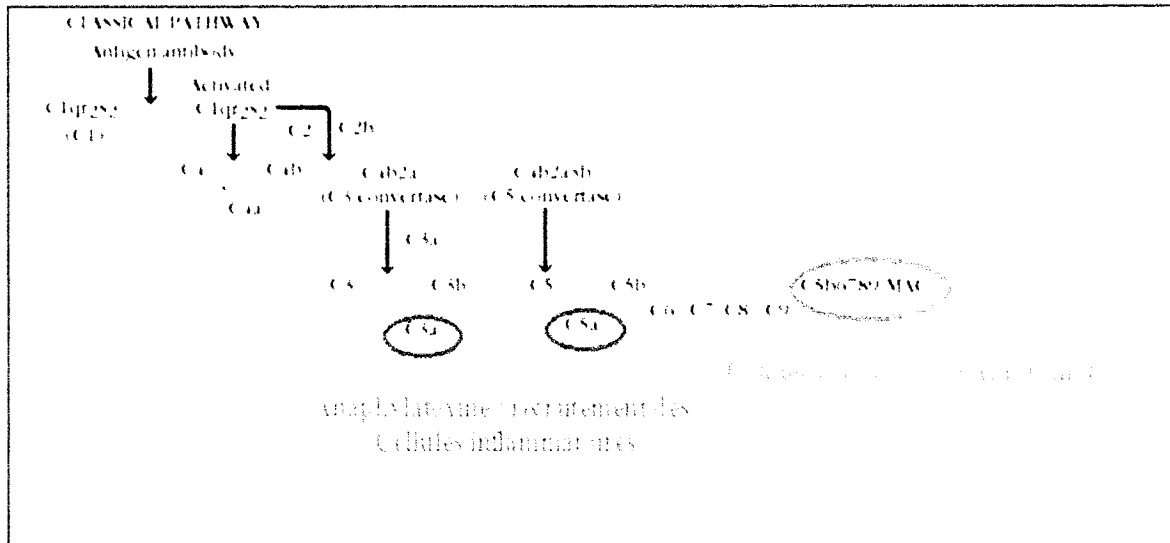
L'activation du complément et de la cytotoxicité dépendante des Acs (cytotoxicité dépendante de la présence d'Ac (antibody-dependent cell cytotoxicity) (ADCC)), sont les principaux mécanismes capables d'infliger des dommages à l'organe transplanté :

L'activation de la cascade du complément par voie classique suite à la fixation de C1q au fragment Fc d'un Ac (les Acs capable de fixer C1q sont de classe IgM, IgG1, IgG2 et IgG3), lié à son Ag cible à la membrane cellulaire entraîne la formation du complexe d'attaque membranaire (C5b6789), structure polyprotéique formant un pore à travers les membranes plasmiques et induisant la lyse cellulaire. Il s'agit de cytotoxicité dépendante du complément (complément dependent cytotoxicity).

En parallèle d'activation de système de complément, certains produits de clivage solubles des protéines du complément (C3a, C5a) sont chimiotactiques et favorisent le recrutement de cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles et les cellules NK). D'autres facteurs de complément (C3b) fixés sur les membranes endothéliales peuvent d'ailleurs induire l'activation



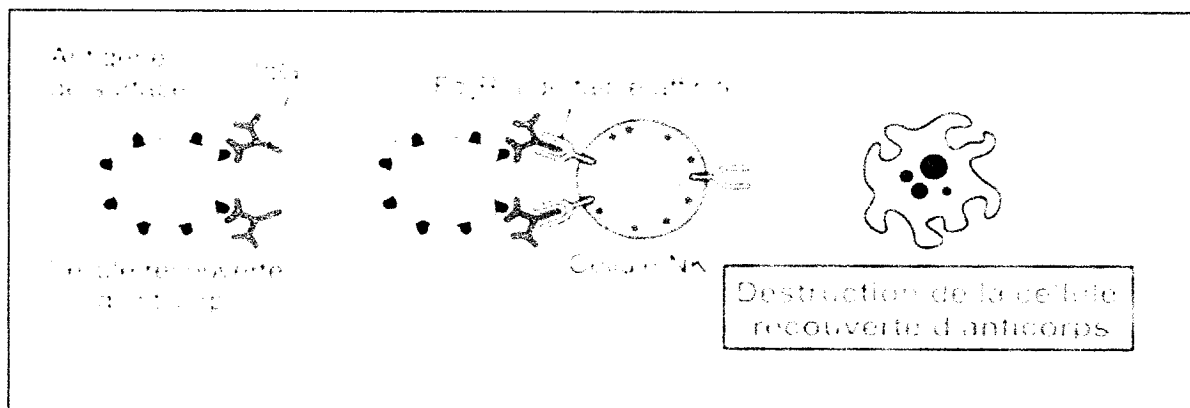
des cellules endothéliales elles –même (augmentation de l’expression de molécules d’adhésion, de cytokines pro inflammatoires, de chémokines) exprimant des récepteurs du complément (CR1et CR3) (37). (Fig. 11)



**Figure 11** : Activation de système de complément par la voie classique (EMC 2007)

Les Acs anti HLA liés à leur Ag cible sur une membrane cellulaire peuvent se lier simultanément par leur fragment Fc à des récepteurs du Fc (Fc  $\gamma$ RIII) exprimés à la surface de divers cellules (Natural killer (NK) et macrophage). La molécule CD16 est un FcR exprimé par les cellules NK. La liaison de CD16 à un fragment Fc d’Ac induit l’activation de la cellule NK, la sécrétion de cytokines (IFN  $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) et la libération du contenu de granules cytotoxiques en contact avec la cellule cible de l’alloAc, induisant sa lyse c’est le phénomène d’ADCC (31)

Les macrophages expriment également des FcR et sont capables de sécréter des cytokines pro inflammatoires. (Fig. 12)

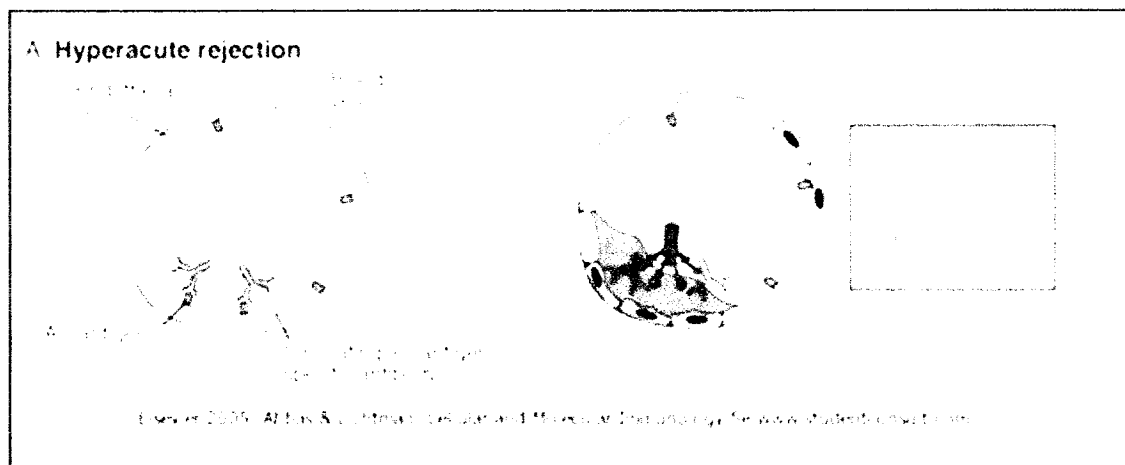


**Figure 12** : Représentation schématique du Phénomène ADCC : « Antibody-dependent cellular cytotoxicity » (EMC 2007)

Les lésions de l'endothélium par les mécanismes effecteurs précédents entraînent des modifications secondaires locales comprenant l'activation plaquettaire et de la coagulation grâce au facteur de Von Willebrand, la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses subintimales, et des lésions parenchymateuse du greffon liées au recrutement local de cellules immunes et inflammatoires (37).

#### 1-4 Conséquences :

Par conséquent une destruction de l'endothélium du greffon, entraînant une thrombose et une nécrose hémorragique du greffon, nécessitant la transplantectomie d'urgence (**Fig. 13**)

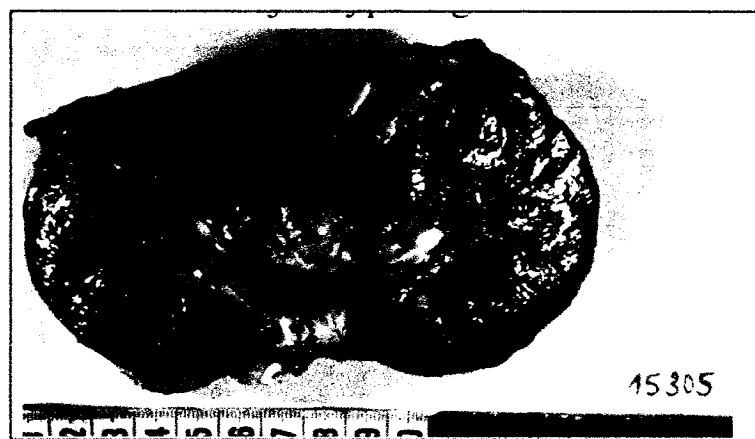


**Figure 13** : représentation schématique de la réponse allogénique lors d'un rejet hyperaigu

#### 1-5 diagnostic:

##### 1-5-a-Clinique:

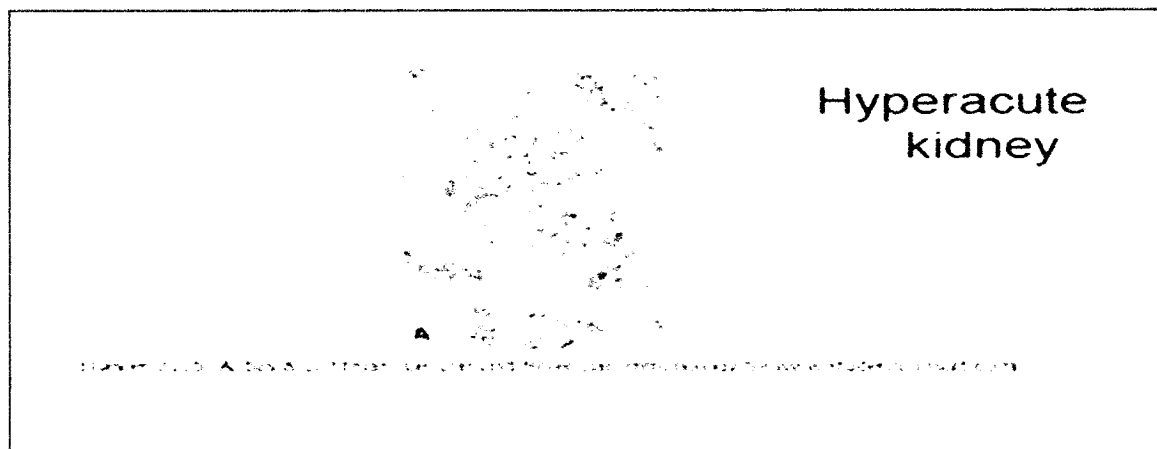
Le rein devient mou et de couleur aubergine dès le déclampage artériel, des taches cyaniques apparaissent à sa surface, la détransplantation est immédiate. Parfois aussi, en présence d'une anurie postopératoire immédiate (10). (**Fig. 14**)



**Figure 14** : aspect d'un rein rejeté lors d'un rejet hyperaigu (Elsevier 2005)

**I-5 –b- Histologique:**

Les lésions sont principalement vasculaires avec congestion des capillaires péri-tubulaires (avec rupture de certains d'entre eux), thrombose de toutes les sections vasculaires avec nécrose fibrinoïde des parois et nécrose du parenchyme associée à de larges zones de suffusion hémorragique. De nombreux polynucléaires sont présents dans les capillaires glomérulaires. (214). (Fig. 15)



**Figure 15 :** Coupe histologique d'un rein présentant un rejet hyperaigu

**I-6 Prévention et traitement :**

Il n'existe pas de traitement médicamenteux, le seul traitement est chirurgicale qui consiste à la détransplantation en urgence, Par contre on peut prévenir l'apparition de ces épisodes de rejet hyperaigu tout on prend par considération que la grande majorité des anticorps responsables du rejet hyper aigu sont les Ac anti HLA spécifique du donneur (DSA), la prévention repose sur :

- ✓ La réalisation d'un cross match juste avant la transplantation, et donc l'exclusion des donneurs qui partage des Ag HLA contre lesquels le receveur est immunisé .

**II-Le rejet aigu:**

Le premier épisode du rejet aigu survient souvent dans les trois premiers mois qui suivent la transplantation , comme il peut survenir dès le quatrième jour post opératoire.

Sur le plan physiopathologique, les rejets aigus peuvent être divisés en deux catégories : le rejet aigu cellulaire et le rejet aigu humoral. Approximativement 90 % des épisodes du rejet aigu sont principalement médiés par un mécanisme cellulaire alors qu'on estime qu'il existe une participation de l'immunité humorale dans 20 à 30 % des cas (214).

## **II-1-Cible antigénique :**

Les cibles de la réaction immunologique du rejet aigu sont les alloAg de transplantation (principalement les antigènes d'histocompatibilité : HLA) propres au donneur et portés par le greffon.

Le rôle de molécules apparentées aux molécules du HLA, telles que MICA, a été suggéré, ainsi que d'autres systèmes antigéniques encore mal définis, tels que les Ag de l'endothélium, pourraient contribuer au rejet aigu d'allogreffe (143).

## **II- 2- Déroulement de la réponse immunitaire :**

La réponse du système immunitaire se produit en trois phases distinctes : **la phase de reconnaissance des allo antigènes**, suivie de **l'activation des lymphocytes spécifique d'Ag**, et enfin de **la phase effectrice** qui aboutit inéluctablement, en l'absence d'immunosuppression, au rejet et à la perte de fonction de l'organe greffée.

### **II- 2-1- Mécanismes moléculaire et cellulaires de l'alloreconnaissance :**

Cette reconnaissance peut avoir lieu selon deux modes, non mutuellement exclusifs, directe et indirecte, qui se distinguent par l'origine de la CPA interagissant avec la cellule T. une troisième voie d'alloreconnaissance dite semi-directe a récemment été proposée.

#### **II-2-1- a : alloreconnaissance directe :**

Les lymphocytes T reconnaissent les molécules du HLA allogénique sous leur forme native, exprimées à la membrane cellulaire des CPA du donneur. Cette reconnaissance directe n'obéit pas aux lois de restriction syngénique puisqu'elle n'est pas restreinte par le HLA autologue. Bien que le répertoire lymphocytaire T soit sélectionné dans le thymus sur la base d'une affinité du TCR suffisante pour les complexes HLA autologue/peptide du "soi", la fréquence des lymphocytes T capables de reconnaître par la voie directe les molécules du HLA vis-à-vis desquelles elles n'ont pas été "éduquées" est paradoxalement très élevée. Il est en effet estimé que 0,1% à 10% du répertoire T d'un individu est capable de reconnaître des alloAg (21), tandis que la fréquence des cellules T spécifique d'un peptide antigénique conventionnel donné, d'origine infectieuse par exemple, est de moins de 1 sur 100000 (98).

Ces fréquences élevées des lymphocytes T alloreactifs explique en partie l'intensité particulière de la réponse allogénique directe in vitro en dehors de toute sensibilisation préalable. De façon similaire, elle est responsable in vitro des fortes réponses prolifératives, observées lors de la culture de lymphocyte T en réponse de CPA allogéniques (réaction ou culture lymphocytaire mixte, MLR ou MLC).

Les lymphocytes T alloreactifs appartiennent au répertoire lymphocytaire T normal et un phénomène de réactivité croisée (ou de mimétisme moléculaire) permet la reconnaissance directe : les cellules T spécifiques d'un complexe du HLA autologue "A+peptide X" sont également capable de reconnaître un complexe HLA allogénique de type "B+peptide Y».

Certaines caractéristiques intrinsèques de la reconnaissance du TCR(177) sont à la base de l'allorecognition directe :

- La diversité intrinsèque de la réponse du répertoire T (de l'ordre de  $25 \cdot 10^6$  spécificités représentées).
- La sélection du répertoire T périphérique sur la base d'une affinité relativement faible du TCR pour les ligands thymiques HLA autologue / peptides de soi, permettant une réactivité croisée en périphérie (vis-à-vis de ligands HLA autologue / peptides exogènes).
- Enfin la relative "dégénérescence" de la reconnaissance T".

Deux hypothèses distinctes mais non exclusives ont été proposées pour expliquer la fréquence particulièrement élevée des lymphocytes T alloréactifs (117).

La première hypothèse postule que la reconnaissance des lymphocytes T alloréactifs est dépendante des peptides présentés par les molécules de HLA allogénique(24).

Celle-ci peut en théorie former des complexes avec des peptides issus du donneur (peptides allogéniques) ou du receveur (peptide de soi). Chaque complexe formé peut stimuler un clone lymphocytaire indépendant. Le large panel de complexes HLA allogénique + peptide (allogénique ou autologue) susceptibles d'être reconnus comme étrangers serait donc à l'origine de la fréquence élevée du répertoire alloréactifs.

Il existe des arguments expérimentaux en faveur de cette hypothèse, parfois appelé modèle de la haute fréquence des déterminants allogénique.

La seconde hypothèse, appelée modèle de la haute densité des déterminants allogéniques, stipule à l'inverse que l'allorecognition directe est dirigée vers la molécule du HLA allogénique, de façon indépendante des peptides présentés (12). Ainsi, toutes les molécules du HLA allogénique exprimées à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène du receveur représenteraient autant les ligands potentiels pour les Ly T alloréactifs. Dans ce modèle, la fréquence des précurseurs T alloréactifs n'est pas particulièrement élevée des déterminants allogéniques présentés qui est responsable de l'engagement dans le répertoire alloréactif d'un grand nombre de lymphocytes T, même de faible affinité. Ceci s'oppose à la faible densité de complexes HLA autologue / peptide exogène présente à la surface des CPA du receveur, qui limite la réponse lymphocytaire T aux cellules dont le récepteur est de haute affinité.

**N.B :**

L'identification de clones alloréactifs et l'étude cristallographique des interaction entre TCR alloréactif et complexes HLA-peptide n'ont pas permis de favoriser définitivement l'une ou l'autre de ces hypothèses, probablement toutes deux valides suivant le degré de dépendance individuelle des TCR alloréactifs vis-à-vis des peptides présentés (175).

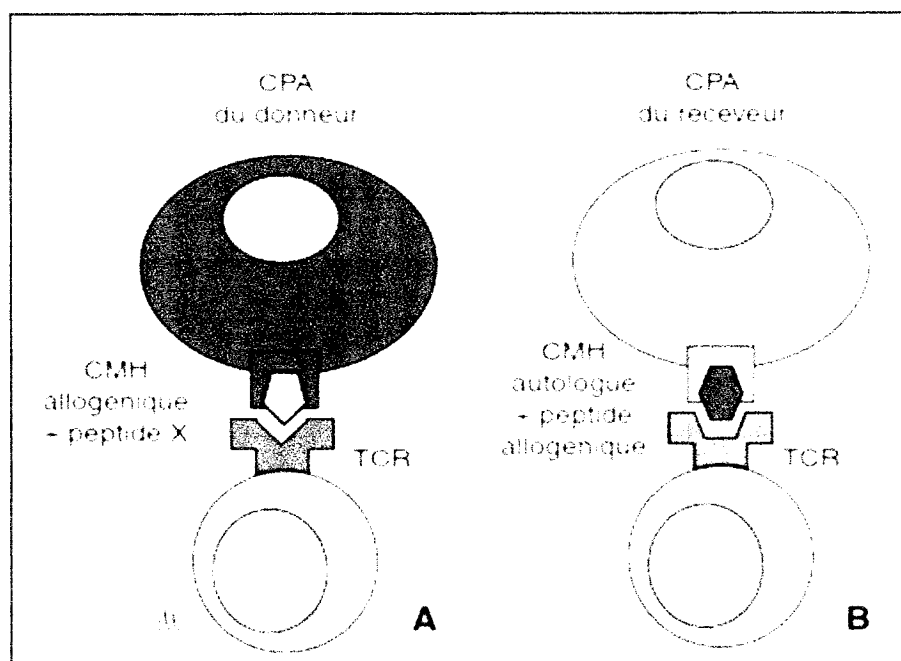
**II-2-1 b : alloreconnaissance indirecte :**

Les LYT du receveur reconnaissent les molécules du HLA allogénique qui ont été capturées et dégradées par les CPA du receveur avant d'être présentées sous forme de peptides complexés aux molécules du HLA autologue(20).

Ce mode de reconnaissance obéit donc aux lois de restriction syngénique. La plupart des peptides présentés par la voie indirecte aux LYT du receveur sont dérivés des régions polymorphes des molécules du HLA du donneur.

Les LYT CD4+ sont naturellement activés par une voie indirecte puisque les Ag exogènes rejoignent le circuit d'apprêtement / présentation antigénique des molécules HLA de classe II.

Le phénomène de présentation croisée (cross priming) permet aux allo Ag internalisés de rejoindre la voie d'apprêtement : présentation des molécules HLA de classe I, et donc l'activation de LYT CD8+ par la voie indirecte (183). (Fig. 16)



**Figure 16 :** Représentation schématique mécanisme d'alloreconnaissance (EMC 2007)

A : directe      B : indirecte

**II-2-2- Localisation et cinétique de sensibilisation des LYT alloreactifs :**

Le lieu des événements de reconnaissance allogénique initiaux (organe transplanté ou organes lymphoïde secondaires), ainsi que des CPA impliqués restent des questions encore débattues, et les modèles proposés dépendent de la voie d'alloreconnaissance considérée.

In vivo, les phénomènes d'alloreconnaissance directe sont initiés par la présentation aux LY T alloreactifs des molécules du HLA allogénique exprimées à la surface de CPA du donneur présentes dans le greffon au moment de la transplantation. Il s'agit essentiellement de cellules dendritiques(CD), mais également de LY B et de monocytes. Ces leucocytes issus du donneur : dits "passagers", migrent hors de la greffe 24 à 48 heures après la transplantation vers les

organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatique et rate) (114), où ils activent par la voie directe les LY T allo-réactifs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> du receveur(192).

Expérimentalement, la déplétion des CD issues du donneur avant la transplantation permet d'améliorer la survie du greffon allogénique (118), et l'absence de l'organe lymphoïde secondaire conduit à l'absence d'initiation de la réponse allogénique (112).

Les LY T allo-réactifs naïf CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont en principe activés dans les organes lymphoïdes secondaires. Il est cependant possible que l'activation de certaines cellules T allo-réactives se produise au sein même du greffon, soit par les CPA du donneur encore présentes dans le greffon, soit par les cellules endothéliales activées (101).

Quelques études ont en effet suggéré que des cellules non hématopoïétiques, telle que les cellules endothéliales du greffon, puissent activer par la voie directe les cellules T du receveur, tout au moins les cellules CD8<sup>+</sup> (103).

Il est généralement admis que la voie directe d'allo-reconnaissance intervient essentiellement à la phase suivant la transplantation, et serait peu ou pas impliquée dans les phénomènes de rejet tardif. En effet, la fréquence des LY T capables d'allo-réactivité directe décroît au cours du temps chez les transplantés rénaux (Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP et al 2001). Cette diminution de fréquence est liée d'une part à la disparition des CPA issues du donneur mais également à l'induction de phénomène de tolérance périphérique (délétion, anergie) par les cellules parenchymateuse du greffon(14).

Les phénomènes d'allo-reconnaissance indirecte nécessitent la capture et la présentation des alloAg du greffon par les CPA du receveur. Plusieurs mécanismes de présentation peuvent en théorie être impliqués. La source des alloAg capturés par les CPA du receveur dans les organes lymphoïdes secondaire peut être constituée par des CPA du donneur apoptiques du fait de l'activation locale de réponse directes, ou bien par des molécules solubles du HLA allogénique relarguées du greffon vers la circulation sanguine / lymphatique(55).

Les CPA du receveur qui remplacent progressivement les CPA du donneur dans le greffon sont également susceptible de capter des alloAg au sein même du greffon et de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires(53). La nature de mécanisme intervenant de façon prédominante *in vivo* reste à élucider.

En l'absence d'immunosuppression, la fréquence des LY T activés par la voie indirecte d'allo-reconnaissance est inférieur à celle des cellules T activées par la voie directe. IL a pu être estimé que les LY T capables d'allo-reconnaissance indirecte représentaient de 5 à 10% du répertoire allo-réactif total (67).

### II-2-3 Phase d'activation lymphocytaire :

#### II-2-3-a : Activation des LY T CD4+ :

Une activation efficace des LY T aboutissent à leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrices nécessite la génération de trois types de signaux lors de l'événement de reconnaissance antigénique.

- ↳ **Le premier signale** est représenté par l'interaction du TCR avec un complexe HLA/ peptide exprimé par une CPA. Ce signale, auquel participe le corécepteur CD4, est traduit à l'intérieur de la cellule grâce au complexe CD3 associé au TCR à la surface du LY selon les étapes suivants :

- Il début par l'activation de récepteur T, schématiquement les PIP2 (phosphatidylinositol 4,5- bi phosphate membranaire ) sont dégradés en IP3 (l'inositol triphosphate ) et en DAG ( diacide glycérol ) ; l'IP3 se fixe sur un récepteur cytosolique spécifique et libère le calcium ionisé de ses réserves, l'augmentation de taux de Ca ionisé combiné à l'action d'une enzyme : calmoduline active une autre enzyme : la calcinurine , la calcinurine activé permet la déphosphorylation d'un facteur nucléaire NFAT( Facteur Nucléaire des Lymphocytes T Activé) la quelle migres à l'intérieur de noyaux de LY.

- Dans le même temps DAG actives une protéine kinase C est d'une part agit en synergie avec IP3 et d'autre part dissocié le facteur nucléaire NFκB de son inhibiteur, les deux facteurs (NFAT et NFκB) migrent vert le noyaux pour déprimer les gènes déterminant la synthèse de cytokines comme l'interleukine (IL) 2 : amorce de la prolifération lymphocytaire

- NFAT et NFκB induisent au même temps le passage de la cellule de la phase G0 (l'état quiescente) à la phase G1 (debut de la préparation à la mitose et à la prolifération) (10).

N.B : en effet on sait que l'activation lymphocytaire n'est possible qu'en présence d'un 2eme signale.

- ↳ **Le second signale**, dit de costimulation, est constitué par des interactions entre molécules accessoires exprimées de la part et d'autre de l'interface LY T/CPA. Trois groupe de molécules sont impliquées dans le second signale : les molécules d'adhésion, des molécules dites accessoires et les molécules de costimulation(174).

Les intégrines à la surface de la cellule T, et en particulier *lymphocyte function associated antigen* (LFA) 1 qui se lie à *intercellular adhesion molecule* (ICAM) 1 ou 2 sur la CPA, sont responsables d'une adhésion optimale entre deux cellules, permettant à la synapse immunologique de s'établir. Les molécules accessoires ont pour rôle de stabiliser cette interaction, et comprennent notamment CD2 sur le LY T et LAF-3 sur la CPA.

Les molécules de costimulation sont des protéines membranaire exprimés par le LY T qui appartient à la superfamille CD28 ou à la superfamille du TNF et des récepteurs du TNF

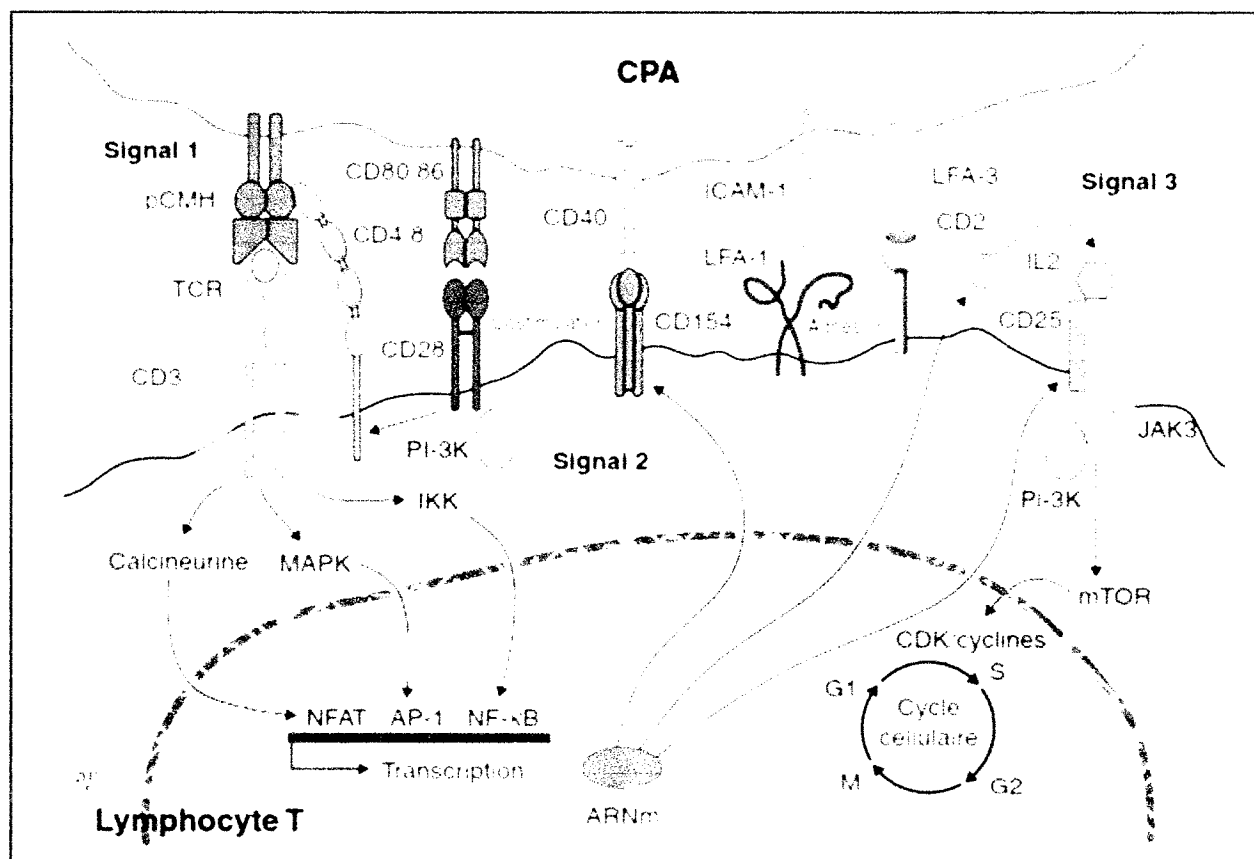


(telle que CD40 L), elles ont un rôle de coopération avec les signaux intracellulaire issus de TCR.

En présence de signale 1 (TCR) et du signale 2 (costimulation positive), les cellules T est activées permettent outre la synthèse des IL comme IL2, IL4, IL5, et IL6, L'expression des gènes codant pour la chaîne  $\alpha$  (ou CD25) du récepteurs de IL2, c'est elle qu'il lui confère une haute affinité pour IL2.

↓ **Le troisième signale** : La stimulation de ce récepteurs par IL2 initié la prolifération et présente le troisième signale, cette stimulation est autocrine, et paracrine lorsque l'IL2 agit sur un LY T situé à proximité.

La fixation de l'IL2 sur son récepteur entraîne une nouvelle cascade de phosphorylation qui aboutit à une activation d'une Kinase dénommé mTOR (molecular-target-of-rapamycin), l'activation de mTOR permet la traduction des ARNm codants pour les protéines de progression de cycle cellulaire et autorise ainsi le passage de la phase G1 à la phase S celle de la réplication de l'ADN puis son entrée en mitose, celle-ci nécessite une duplication de l'ADN et une synthèse d'acide nucléique à partir de bases puriques ou pyrimidiques (80). (Fig. 17)



**Figure 17** : Représentation schématique de l'activation lymphocytaire T (EMC 2007)

L'activation de LY T CD4+ aboutit à sa prolifération clonale et sa différenciation en cellule effectrices de type auxiliaires productrices de cytokines. Certains LY T CD4+ sont toutefois doués de cytotoxicité

De façon simplifiée on distingue deux profils de production cytokinique par les lymphocytes auxiliaires :

- **Le profil Th1 (IL2, INF $\gamma$ , mais aussi TNF $\alpha$ )** qui favorise la réponse à médiation cellulaire et on parle donc de rejet aigu cellulaire
- **Le profil Th2 (IL4, IL13, IL5, IL6 et IL10)** qui favorise les réponses de type humoral et on parle donc de rejet aigu humoral (18).

### **II-2-3-b : Activation des LY CD8+ :**

Cette activation nécessite comme premier signal la reconnaissance de peptides issus de la molécule HLA de classe I du donneur présentés par des cellules dendritiques. Cette présentation peut être assurée de façon directe par des cellules dendritiques interstitielles du greffon et dans un deuxième temps par les cellules dendritiques du receveur via un mécanisme de cross présentation. Cette présentation croisée prend place après phagocytose de cellules parenchymateuses du greffon et génération d'un signal antigénique constitué par des peptides allogéniques de classe I fixés sur des molécules de classe I autologue. La différenciation des clones CD8+ est dépendante d'un deuxième signal représenté par la fixation de l'IL2 sur son récepteur spécifique. L'IL2 est fournie principalement par les LY CD4+ alloréactifs(73).

L'activation de LY T CD8+ aboutit à sa prolifération clonale et sa différenciation en cellule effectrices cytotoxiques tandis que les LY T CD8+ sont également capables de produire des cytokines, notamment de l'INF $\gamma$ .

### **II-2-3-c : Activation des LY B :**

En l'absence de sensibilisation allogénique antérieure (grossesse, transfusion, transplantation) les réponses lymphocytaire B primaire dirigée contre des alloAg HLA survient dans les organes lymphoïdes secondaires où résident les LY B naïfs au sein de follicules lymphoïdes primaires.

Elles sont initiées par la liaison du récepteur du LY B (BCR, qui est une Ig M membranaire) aux molécules HLA allogéniques. Celles-ci sont exprimées à la surface des CPA du donneur, mais peuvent également être libérées sous forme de molécules solubles ou de vésicules membranaire (exosomes). Le BCR reconnaît en effet les Ag HLA sous leur forme native, non apprêtée par des CPA. Cette reconnaissance a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires à la phase d'activation initiale de la réponse allogénique, mais également dans l'organe transplanté, une fois la réponse initiée. Elle induit l'activation des LYB naïfs, leur migration vers la zone T-B du ganglion et leur prolifération, qui aboutit à la formation d'un follicule lymphoïde secondaire contenant un centre germinatif (CG).

Ce CG est constitué des cellules B en prolifération active et de LY T auxiliaires. Les cellules B activées peuvent suivre alors deux voies de différenciation, l'une au sein du CG, l'autre en dehors de CG (130).

En dehors de CG, certaines cellules B se différencient en plasmocytes à demi-vie brève, responsable de la première vague de production d'Ac, en général de classe Ig M.

A l'intérieur du CG, les cellules B qui prolifèrent subissent d'une part la commutation isotypique IgG, et d'autre part des mutations somatiques du site de reconnaissance antigénique. Au sein du CG, certains de ces LY B se différencient alors en plasmocytes sécrétant des Ac matures d'isotype IgG et de haute affinité. La durée de vie de ces plasmocytes peut être brève dans les organes lymphoïdes secondaire (ganglions et rate) (185), ou prolongée dans la moelle osseuse (132).

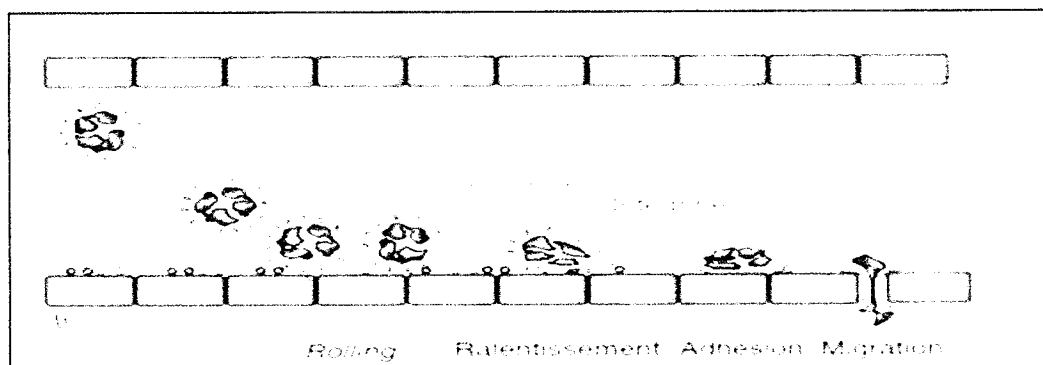
Au cours de la réponse primaire, certaines cellules B se différencient en cellules mémoires capables de réponse prolifératives et sécrétrice d'Ac très rapide en cas d'exposition secondaire à l'Ag.

#### II-2-4 Migration des cellules effectrices vers le greffon :

L'activation des LY T a également pour conséquence des modifications de phénotype membranaire de ces cellules avec perte de l'expression de certaines protéines responsable de la circulation des cellules naïves dans les organes lymphoïdes secondaire (CD62 L, CCR7) et acquisition d'autre récepteurs membranaires( tel que CXCR4 et de nombreux autre récepteurs de chimokines) leur permettant de rejoindre la circulation sanguine et pénétrer dans les tissus(147).

Le passage des LYT depuis la circulation sanguine vers le parenchyme de l'allogreffe fait intervenir une série d'interactions complexes impliquant d'abord des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales activées, les sélectines ( E-sélectine ) (161).

L'établissement de liaison entre les sélectines endothéliale et leurs ligands lymphocytaires (L-sélectine ou CD 62 L) entraîne le ralentissement du lymphocyte et le phénomène de *rolling* le long de l'endothélium. (**Fig. 18**)



**Figure 18 :** Représentation schématique des étapes de la transmigration lymphocytaire (EMC 2007).

Au cours d'une seconde phase, le lymphocyte ralenti est exposé aux signaux de l'environnement local (chimokines, cytokines et médiateurs pro inflammatoires, produits entre autre par l'endothélium activé) et l'expression lymphocytaire de plusieurs intégrines est augmentée, notamment celle de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  ou very late activation antigen (VLA) 4, dont le ligand à la surface des cellules endothéliales est la vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1.

Au cours d'une troisième phase, il y a activation de la molécule d'adhésion lymphocyte LFA 1, qui se lie à ICAM -1 et ICAM-2 exprimées sur l'endothélium. Le renforcement des interactions de ces trois signaux aboutit à l'arrêt du lymphocyte qui est littéralement attaché à la surface de l'endothélium.

Dans une quatrième phase finale, il ya migration transendothéliale du lymphocyte qui est dépendante de signaux induits par les ligands de CD31 et des junctional adhesion molécules (JAM)

#### **N.B :**

Les lésions d'ischémie du greffon secondaire au traumatisme chirurgical de la transplantation induisent la production de cytokines qui activent l'expression dans l'endothélium vasculaire des sélectines (induites par l'IL-1 notamment), de VCAM-1 et ICAM-1, Elles initient donc le recrutement des lymphocytes et autres cellules inflammatoires au sien du greffon.

### **II-3 Mécanismes effecteurs du rejet de greffe :**

#### **II-3-1 Rôle des effecteurs cellulaires :**

La différenciation des LY TCD8+ en effecteurs cytotoxiques nécessite l'aide de la cellule CD4+ auxiliaire Th1 activées par la même (52). Paradoxalement, les LY TCD4+ de la voie indirecte sont capable d'exercer leurs fonctions auxiliaires vis-à-vis de cellules CD8+ activées par la voie directe.

#### **II-3-1-a : La reconnaissance directe à la phase effectrice :**

Les cellules CD4 + et CD8+ activés par la voie de reconnaissance directe peuvent aisément exercer leurs fonctions effectrices au sein même du greffon où sont exprimées les alloAg vis-à-vis desquelles elles ont été sensibilisées. Les cellules cibles de ces LY T alloréactifs sont en premier lieu les cellules endothéliales du donneur. L'endothélium activé exprimant les molécules du HLA de classe I constituent la cible des LY T CD8+ effecteurs cytotoxiques.

Le rôle des LY CD4+ dans l'agression de l'endothélium vasculaire est moins clair(104).

Les lésions de l'endothélium lors de rejet aigu comprennent une endothélite et de l'inflammation, et il est tentant de spéculer que des phénomènes de reconnaissance directe de l'endothélium participent à certaines formes de rejet aigu associé à des signes évident de vascularopathie. (61). Les cellules parenchymateuses du greffon peuvent également être la

cible des LY T CD4+ et T CD8+ directement alloréactifs, après leur migration transendothéliale. Ainsi, les cellules tubulaires rénales peuvent constituer la cible principale de la réponse allo réactive effectrice avec introduction de lésions de tubulite caractéristique.

### **II-3-1-b : La reconnaissance indirecte à la phase effectrice :**

Le rôle pathogénique des LY T CD4 activés par la voie indirecte dans les phénomènes de rejet a clairement été établi(43), leur fréquence élevée serait associée au rejet aigu(86), alors que des fréquences plus faibles seraient plus impliquées dans des phénomènes chroniques avec induction de lésions de fibrose et de vasculopathie (162).

Le rôle pathogène de LY CD8+ activés par la voie indirecte suggéré par certains modèles expérimentaux d'allogreffe de peau (82) En revanche, dans un modèle de greffe d'organe vascularisé, ou l'endothélium constitue la première cible de la réponse effectrice alloréactives, les LY T CD8 capables d'alloréactivités indirecte ne semblent pas participer aux phénomènes de rejet du greffon (206).

Plusieurs mécanismes peuvent être proposés pour expliquer le rôle pathogène de cellule T spécifiques de complexe HLA du receveur / allopeptide a priori non exprimés dans l'allogreffe :

Des cellules hématopoïétique du receveur peuvent coloniser le réseau vasculaire du greffon et se différencier en cellules endothéliales (78) potentiellement capables d'endocytée et de présenter des alloAg dans le contexte du CMH du receveur(97). Ce type de présentation indirecte peut également se produire à la jonction entre le réseau vasculaire issu du donneur et celui du receveur (82).

Une autre possibilité est le recrutement au sein du greffon de CPA du receveur capables d'endocytée et de présenter des alloAg à des LY CD4+ et CD8+ également recrutée localement. Ces cellules T activées par la voie indirecte pourrait alors induire des lésions inflammatoires non spécifiques selon divers mécanismes (hypersensibilité retardée, cytotoxicité bystander, médiateurs pro inflammatoires tels que l'INF $\gamma$ ...).

### **+ cytotoxicité des LY CD8+ :**

Les fonctions cytotoxiques des cellules T CD8+ effectrices sont activées dans l'allogreffe par l'interaction du TCR avec les complexes HLA / peptide spécifique exprimés par la cellule cible, de façon peu dépendante de signaux de costimulation (172).

Les granules de cytotoxicité préformés fusionnent alors avec la membrane plasmique de la cellule T et leur contenu est libéré dans la synapse immunologique. Les granules cytotoxiques contiennent de la perforine et des granzymes ainsi que des protéines comme la serglycine, la calréticuline, la granulysine et Fas ligand (FasL).

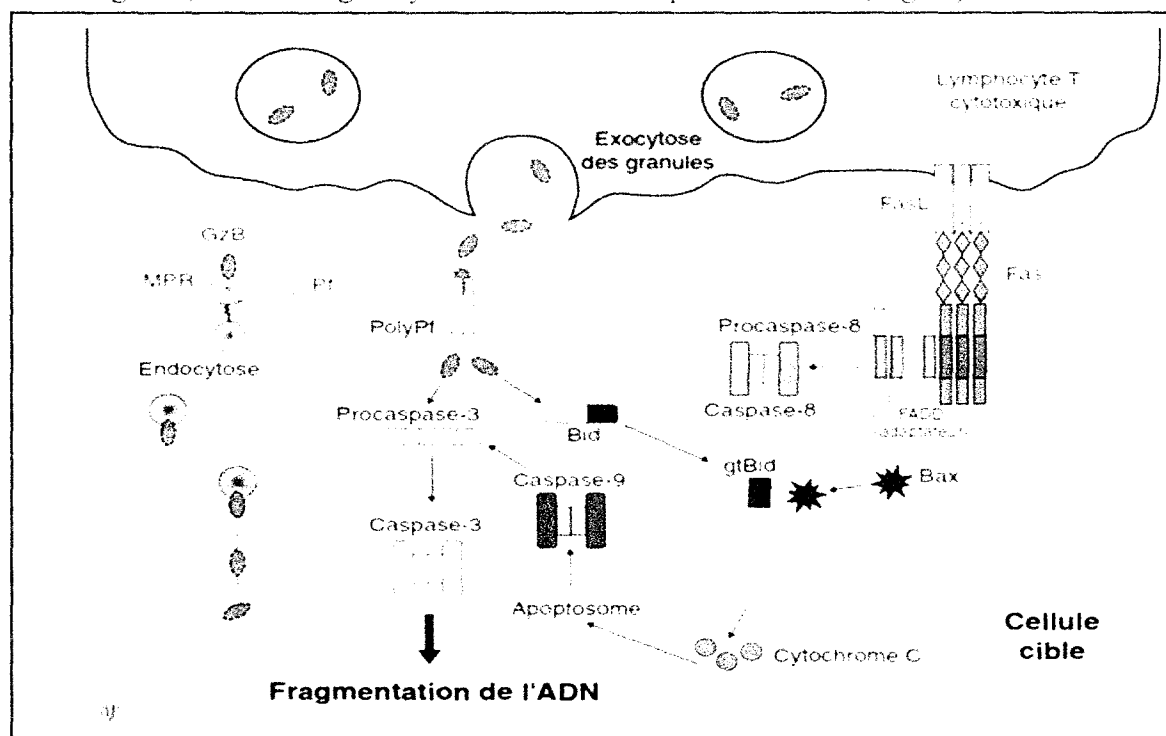
En présence de calcium, les molécules perforine se multimérisent et forment un complexe qui s'insère dans la membrane de la cellule cible, permettant le passage facilité du contenu des granules, notamment du granzyme B, dans le cytoplasme de la cellule cible. Le

granzyme B induit alors l'apoptose cellulaire par clivage direct ou indirect de la procaspase - 3. L'activation de la caspase 3 aboutit à la fragmentation de l'ADN cellulaire et à la mort cellulaire.

Les cellules CD8<sup>+</sup> cytotoxiques peuvent aussi induire la mort cellulaire par une voie dépendante de Fas : la molécule FasL peut être libérée dans la synapse immunologique à partir des granules cytotoxiques ou peut être exprimés à la surface de la cellule effectrice ; la liaison de FasL à la molécule Fas exprimés par la cellule cible induit l'apoptose par les mêmes mécanismes effecteurs caspase-dépendants que le granzyme B.

La conversion des fonctions cytotoxiques in vitro de Ly T allo-réactifs issu de patients déficients pour Fas suggère toutefois que l'activation cytolytique de ces Ly est essentiellement dépendante de l'exocytose des granules cytotoxiques, et donc de la perforine et du granzyme B(217).

De plus, l'analyse de l'expression de Fas et FasL au sein même du greffon n'indique pas de rôle significatif de la voie Fas/FasL au cours du rejet aigu(164). Au cours du rejet d'allogreffe, la voie du granzyme B semble donc prédominante. (**Fig.19**)



**Figure 19** : Cytotoxicité des lymphocytes T et voies d'apoptose (EMC 2007)

#### ± Hypersensibilité retardée :

Les LY CD4<sup>+</sup> de phénotype Th1 sont les principaux éléments responsables des réactions d'hypersensibilité retardée au cours du rejet de greffe. Après reconnaissance à l'intérieur de greffon des molécules du HLA de classe II allogénique, ces cellules T sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF $\gamma$  et le TNF $\alpha$ , qui activent les monocytes et les macrophages recrutés localement. Cette activation permet d'amplifier la sécrétion locale de

cytokines, de chémokines et le recrutement de cellules mononuclées, et aboutit à la production d'enzyme protéolytiques, d'oxyde nitrique et d'autres facteurs solubles qui entretiennent le processus inflammatoire. De nombreux médiateurs de l'inflammation produit localement ont un retentissement direct sur les fonctions de l'organe greffé.

Les LY T CD4<sup>+</sup> de phénotype Th2 peuvent également participer à la réaction d'hypersensibilité retardée, par la sécrétion de cytokines comme l'IL4, IL5 et IL13 capables de recruter et d'activer les polynucléaires éosinophiles au site de la réaction. Ceux ci peuvent alors libérer de nombreuses substances pro-inflammatoires(172).

#### ↓ phénomène de tolérance :

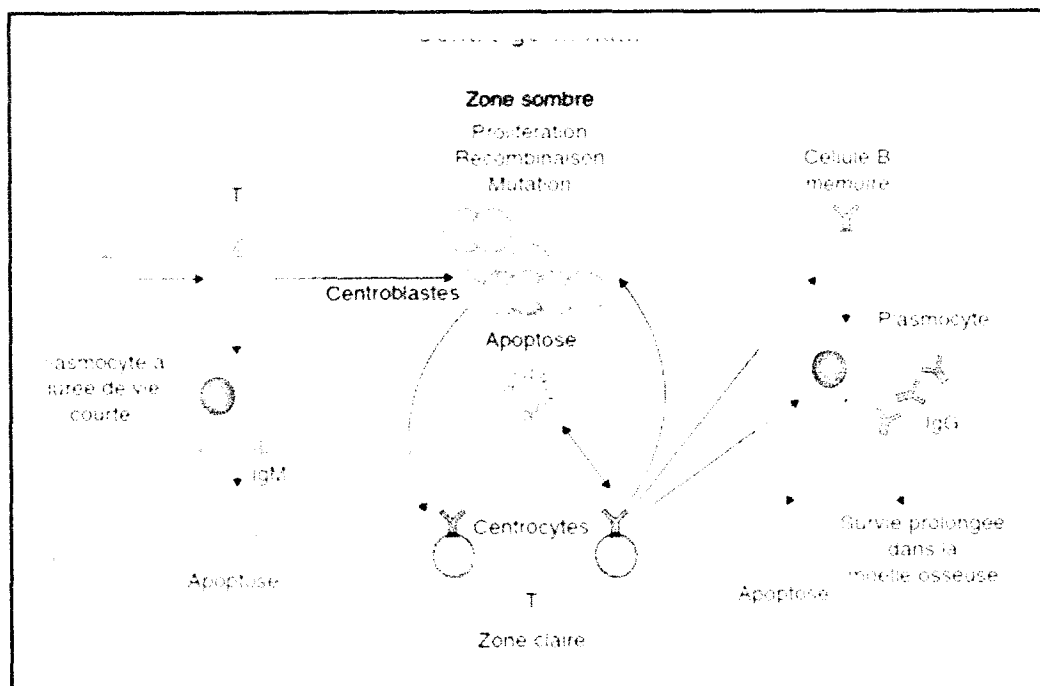
Les LY CD4<sup>+</sup> alloréactifs sensibilisés par la voie indirecte se différencient préférentiellement en cellules auxiliaires de type Th1. Les conditions d'activation des LY alloréactifs CD4<sup>+</sup> par la voie de reconnaissance indirecte (en terme de costimulation) peuvent toutefois influencer leur différenciation et les orienter vers un phénotype régulateur avec production de cytokines anti inflammatoires (IL10et TGFβ : transforming growth factor), le rôle de telle cellule régulatrices CD4<sup>+</sup> induites par la voie indirecte semble essentiel au maintien de la tolérance d'allogreffe (90).

#### II-3-2 Rôle des effecteurs humoral :

Le développement d'une réponse humorale avec production d'AC de type IgG nécessite une coopération entre LY B et LY T auxiliaires(23).

Cette coopération fait intervenir la production de cytokines de type Th1 et Th2 par les LY T, et des interactions cellulaires non spécifique d'Ag par l'intermédiaire de molécules de costimulation (du type CD28/ CD80-CD86, CD40 /CD40 L...etc.), et spécifiques d'Ag du type TCR/ complexe HLA- allopeptide. En effet, les lymphocytes B après leur activation initiale par leur BCR internalisent l'Ag reconnu, en l'occurrence des molécules du HLA du donneur, et les présentent aux cellules TCD4<sup>+</sup> auxiliaires sous forme de peptides complexée aux molécules du HLA de classe II du receveur. Les cellules impliquées dans la coopération T-B sont donc des LY CD4<sup>+</sup> capable de reconnaissance indirecte(62)

Le développement d'une réponse lymphocytaire B aboutit à la production de plasmocytes à durée de vie longue qui migrent vers la moelle osseuse où ils sécrètent continuellement des Ac et ce de façon indépendante des LY T auxiliaires(182). Le maintien d'une production constante d'alloanticorps spécifiques du greffon (donor specific antibody (DSA) peut être la conséquence à la fois de la durée de vie prolongée de ces plasmocytes mais aussi de la différenciation permanente de nouveaux lymphocytes B mémoires (200). **(Fig.20)**



**Figure 20 :** Représentation schématique de la réponse humorale et centre germinatif (EMC 2007).

Les Ac ainsi formés exercent les mêmes fonctions effectrices de rejet hyperaigu (Cytotoxicité dépendante de complément et l'ADCC) (Voir le titre : I-3)

#### II-4 Les Conséquences :

##### II-4-a : Les effecteurs cellulaires sont responsables d' :

\**Une infiltration cellulaire* qui peut être diffuse ou locale, la densité cellulaire étant irrégulière, avec des renforcements autour des structures vasculaires et même une intrusion dans les éléments tubulaires (c'est la lésion dite de « tubulite »), les capillaires péri-tubulaires et les parois vasculaires.

\**Une nécrose tubulaire* est fréquemment associée, plus ou moins étendue. Elle peut être la conséquence tardive des lésions ischémiques en rapport avec la conservation du greffon.

\**Une atteinte des glomérules* qui peuvent avoir un aspect ischémique avec des parois plissées, peu de lumières visibles, des chambres urinaires élargies. Parfois, les cellules épithéliales et endothéliales sont turgescentes et des cellules circulantes de type monocytaires sont visibles dans les lumières. Une thrombose intracapillaire est le témoin d'un rejet sévère. (10).

\* Enfin, en ce qui concerne **les lésions vasculaires**, les capillaires péri-tubulaires peuvent être congestifs et la rupture de certains d'entre eux responsable d'une suffusion hémorragique.

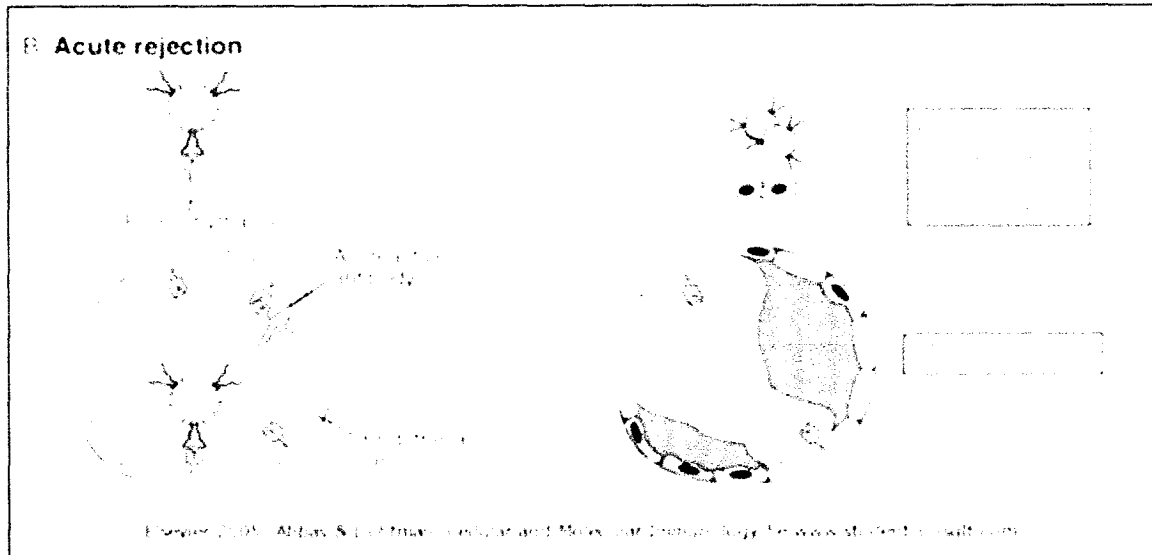
Dans les artérioles et les artères interlobulaires, les cellules endothéliales sont turgescentes et bombent dans la lumière vasculaire. A un stade plus avancé, les cellules endothéliales peuvent



proliférer (endarterite proliférative), et la lumière se thrombose avec désorganisation des cellules du média (10) (Figure 21)

#### **II-4-b : Les effecteurs humoral sont responsables d' :**

\**Une nécrose tubulaire aiguë*, une atteinte vasculaire parfois sévère peut être responsable d'un authentique tableau de microangiopathie thrombotique, des suffusions hémorragiques et une fixation péri-tubulaire de C4d. (10) (Fig 21)



**Figure 21 :** Représentation schématique du rein présentant un rejet aigu

#### **II-5 Le diagnostic :**

##### **II-5-a : Clinique :**

Le diagnostic du rejet aigu est celui d'une insuffisance rénale aiguë survenant chez un patient transplanté ayant ou non repris une diurèse et/ou une fonction rénale.

Le diagnostic positif repose d'une part sur des critères négatifs, c'est-à-dire l'élimination de toutes les autres causes d'insuffisance rénale aiguë (obstructives, infectieuses, toxiques, etc.), et d'autre part sur des critères positifs dont aucun n'est absolument spécifique. C'est à dire la difficulté de porter ce diagnostic, et ce d'autant qu'un traitement potentiellement dangereux en est la conséquence logique (10).

##### **II-5-b : Déséquilibres associés :**

On n'observe quasiment plus les signes classiques de la crise du greffon qui comportaient cliniquement un greffon gros et sensible, une fosse iliaque empâtée, une pression artérielle élevée, une diurèse diminuée, un état subfébrile, et dans les urines, une protéinurie, une natriurèse effondrée et une créatininurie élevée(10).

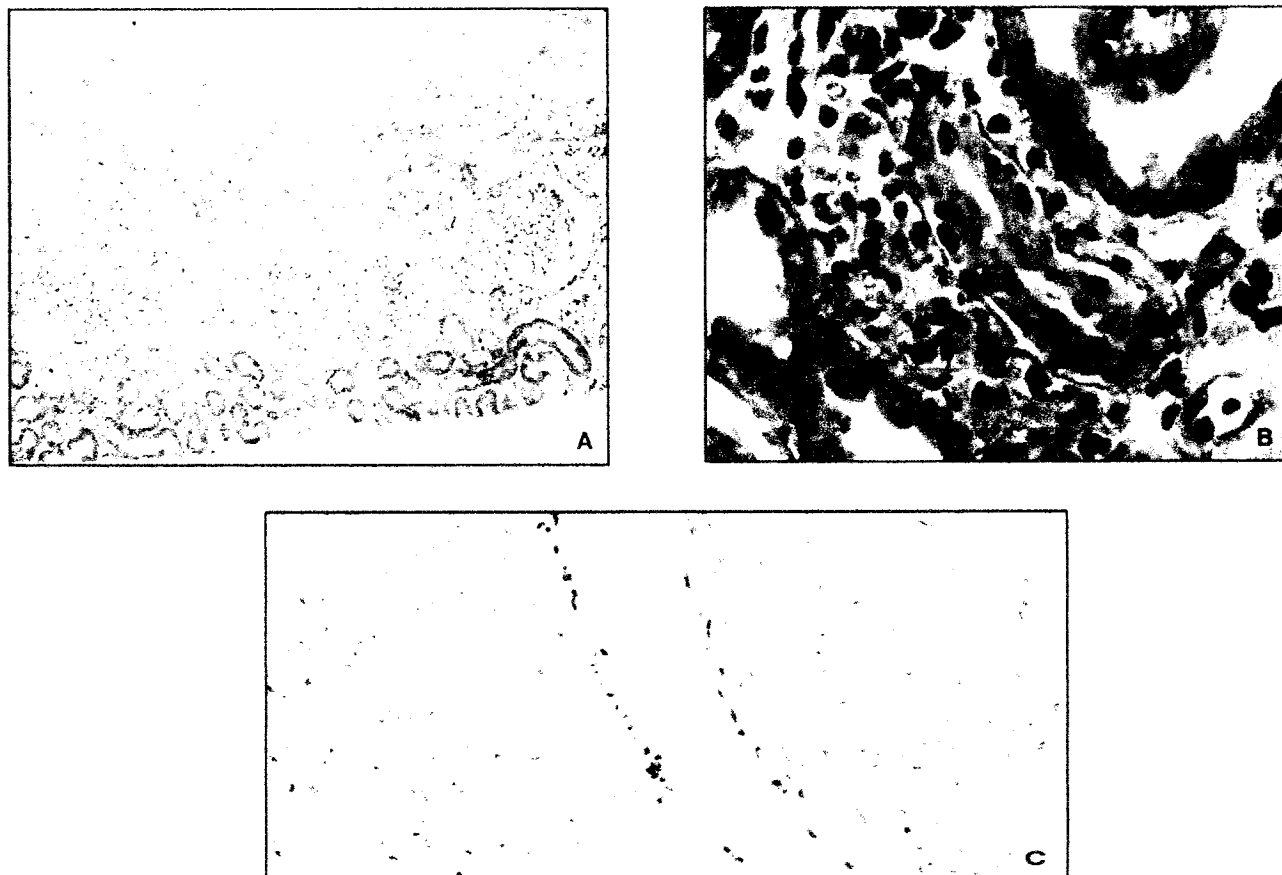
### II-5-c : Histologique :

Les lésions histologiques observées sont l'œdème interstitiel, l'infiltration cellulaire de l'interstitium, la nécrose tubulaire, les lésions glomérulaires et vasculaires. En microscopie optique, le tissu de soutien est infiltré par un œdème qui dissocie les éléments du parenchyme.

On note souvent la positivité du fragment du complément, le C4d, sur les capillaires péri-tubulaires et la présence dans le sang périphérique de DSA (10). **(Fig. 22)**

⚡ En plus de ces critères de diagnostic, on note également la présence de certains marqueurs associés à ce type de rejet dont: **(Fig. 23)**

- il semble que les cellules CD8 cytotoxique soient prédominantes par rapport aux cellules CD4 auxiliaire dont cellules activées expriment des Ag de classe II et des récepteurs pour l'IL 2 : l'utilisation de ces marqueurs a un intérêt physiopathogénique mais peu d'applications cliniques à l'heure actuelle(136).
- Une expression intense des Ag de classe II par les cellules tubulaires est un argument indirect en faveur d'un rejet aigu cellulaire(10)

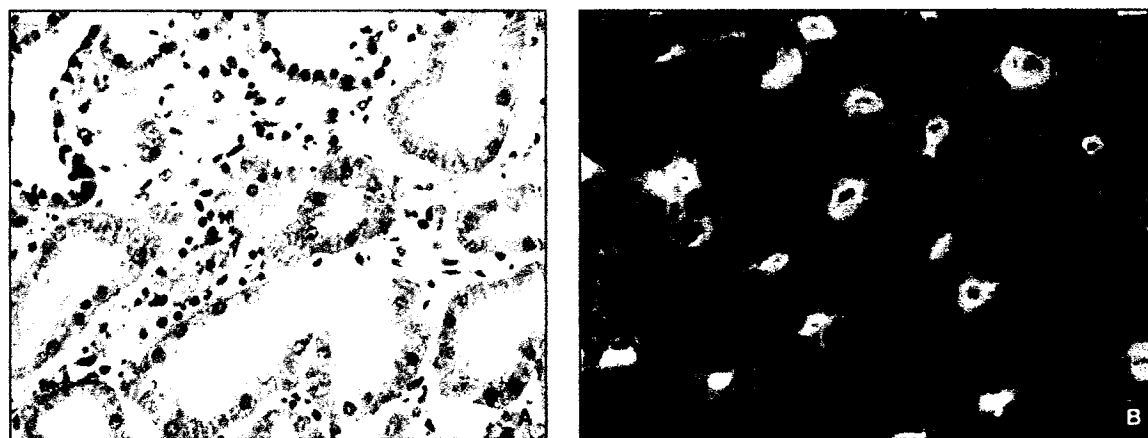


**Figure 22 :** Aspect histologique typique d'un rejet aigu cellulaire.

A. Infiltrat cellulaire mononuclée et fibro-œdème.

B. Tubulite.

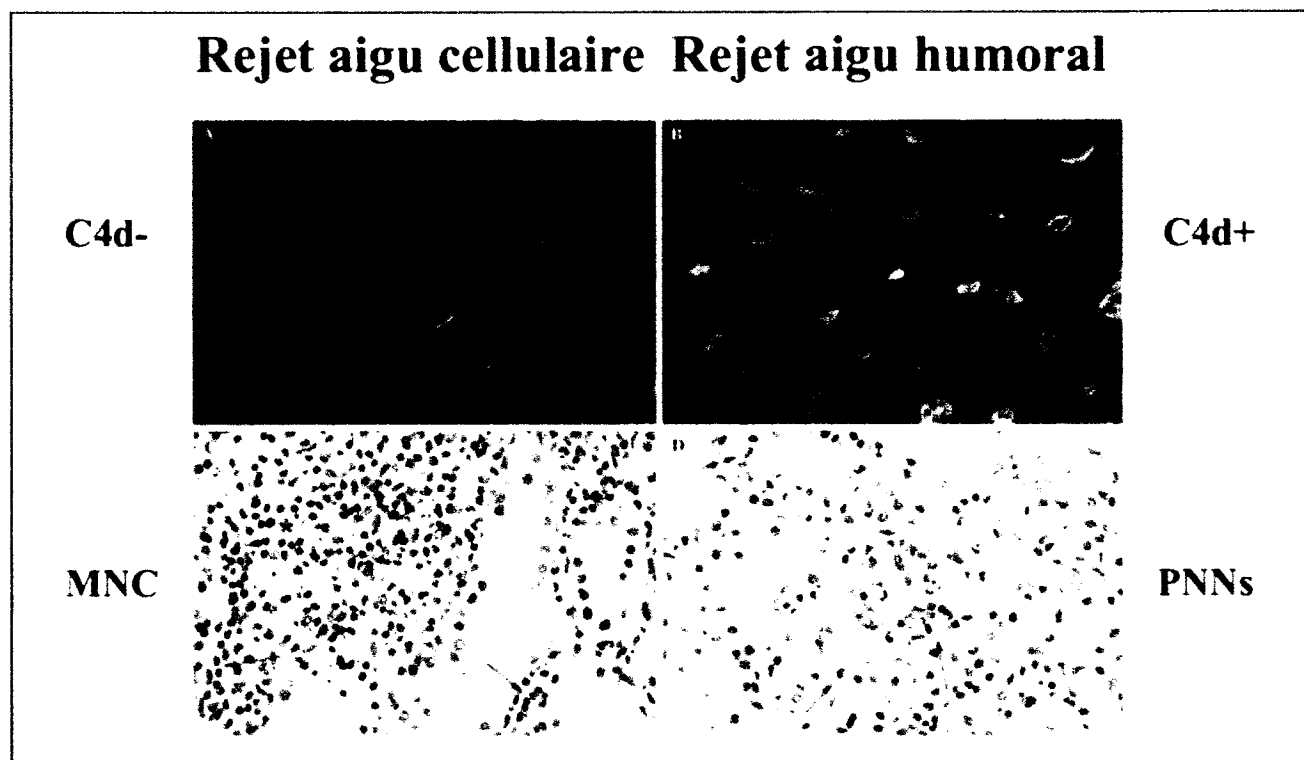
C. Artérite intimale. (EMC 2007)



**Figure 23 : (EMC 2007)**

A. Aspect histologique typique d'un rejet aigu humoral.

B. Fibro-œdème et dilatation des capillaires péri-tubulaires remplis de cellules inflammatoires.



**Figure 24** : Des coupes histologiques comparatives d'un rejet aigu cellulaire et humoral (EMC 2007).

**N.B**

Les critères diagnostiques histologiques de rejet aigu actuellement admis sont décrits dans la **classification de Banff(10)**. (Annexe 2) (Fig. 24)

**II-6 Prévention et traitement :**

La prévention de rejet aigu repose essentiellement sur la surveillance immunologique des malades greffés en vue d'instaurer une stratégie thérapeutique adéquate pour chaque malade dont les principaux piliers de cette stratégie sont :

- ✓ Les immunosuppresseurs
- ✓ Les corticoïdes
- ✓ La plasmaphérèse

(Voire chapitre IV : La prise en charge thérapeutique des malades greffés)

### **III- Le rejet chronique et la néphropathie chronique du transplant :**

Pendant très longtemps cependant, la terminologie de rejet chronique a été synonyme de perte progressive de la fonction du greffon sans que la cause de cette perte soit évidente.

Il faudra attendre le début des années 1990 pour que le rejet chronique commence à être élucidé. Une première phase consista à ne plus utiliser ce terme et à le remplacer par le terme de néphropathie chronique d'allogreffe (NCA) (186), terme qui soulignait le fait que la perte progressive de fonction du greffon n'était pas due uniquement à des lésions immunologiques de rejet chronique mais également à des lésions non immunologiques de néphrotoxicité des immunosuppresseurs ou de récurrence de la néphropathie initiale.

Quelle que soit la cause de cette NCA, il existe dans tous les cas des lésions non spécifiques de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire. À ces lésions non spécifiques, peuvent s'associer des lésions évocatrices d'une cause comme des lésions de rejet proprement dit, plutôt cellulaire ou plutôt humoral, des lésions de néphrotoxicité des immunosuppresseurs ... (187).

La terminologie s'est donc encore modifiée et le terme de néphropathie chronique d'allogreffe a disparu au profit d'une terminologie purement histologique, la fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire (FIAT) et le terme de rejet a été réservé aux seules lésions d'origine immunologique (10).

#### **III-1 Déroulement de la réponse immunitaire :**

Les mécanismes moléculaires de ce rejet chronique, qui limite la durée de vie des organes transplantés, sont mal connus. Il s'agit probablement d'une réponse immunitaire chronique, à bas bruit, initiée par une présentation indirecte des alloAg, et dirigée contre les structures vasculaires, et particulièrement endothéliales, du greffon. Les processus de réparation des dommages liés à cette agression font appel à la synthèse de facteurs de croissance, comme le TGF, qui induisent la fibrose et le rétrécissement progressif de la paroi des vaisseaux (204).

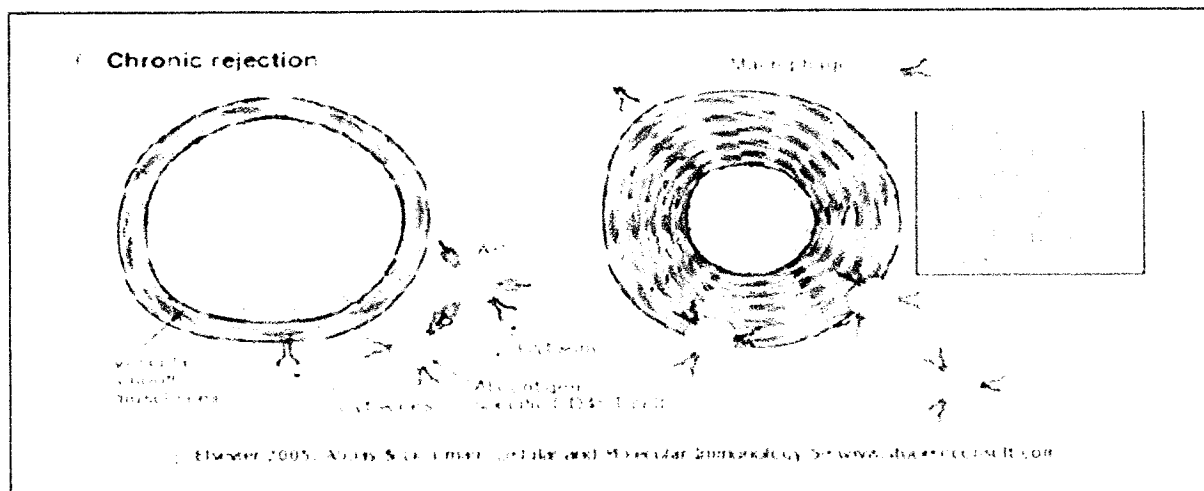
Une fréquence accrue de cellules T capables d'alloréactivités indirecte a pu toutefois être mise en évidence chez des patients atteints de rejet chronique d'allogreffe (209) et dans plusieurs modèles expérimentaux de rejet chronique (170), suggèrent un rôle majeur de la voie d'allo reconnaissance indirecte dans les phénomènes de rejet chronique.

#### **III-2 Rôle des Ac dans le rejet chronique :**

Des données récentes suggèrent que certains rejets chroniques sont dus à des alloAc. Toutefois, les causes et les manifestations du rejet chronique qui se caractérisent histologiquement par une glomérulopathie et une artériosclérose (NCA) sont multiples, et les circonstances au cours desquelles les alloAc ont un rôle prépondérant restent encore à déterminer. Les patients développant des Ac anti HLA post transplantation ont un risque plus élevé de glomérulopathie et de perte de greffon (159).

Les cas de glomérulopathie sont plus fréquemment associés à des dépôts de C4d dans les capillaires péri-tubulaires et à la présence d'Ac anti HLA spécifique du greffon(81).

Le rôle d'Ac non HLA a également été proposé, en particulier des Ac anti endothélium. Une étude a également observé la présence d'Ac antivimentine (un constituant du cartilage) chez une proportion importante de patients transplantés rénaux avec NCA (39). (Fig. 25)



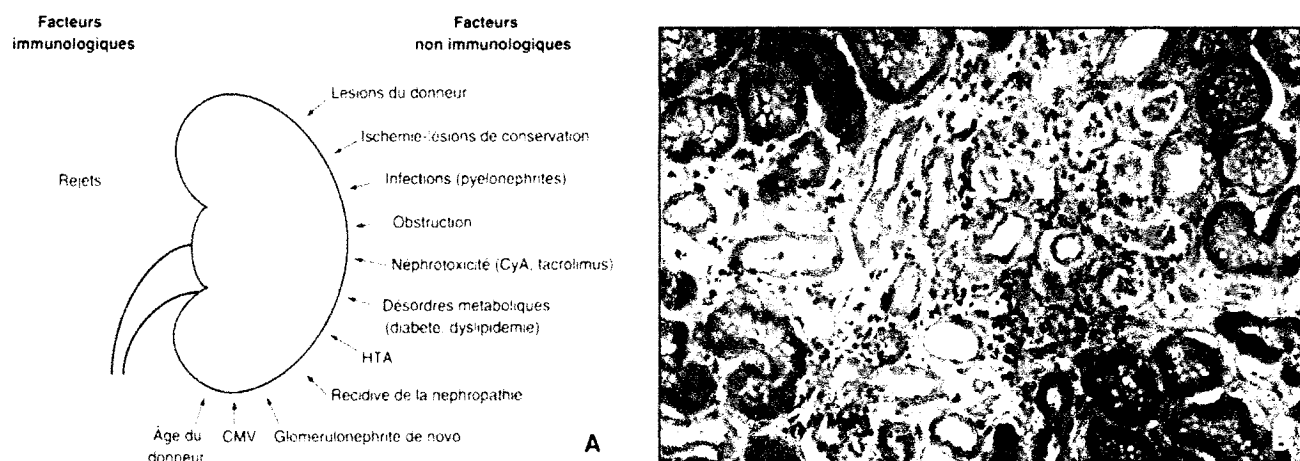
**Figure 25** : Représentation schématique d'un rein lors de rejet chronique.

### III-3 Conséquences :

Le rejet chronique se caractérise par le remplacement des structures normales du greffon par du tissu conjonctif. On avance principalement deux explications:

- Les macrophages activés libèrent des facteurs de croissance qui vont stimuler les cellules mésenchymateuses et ainsi déclencher un processus de fibrose.
- Il fait suite à une ischémie prolongée provoquée par des lésions vasculaires.

On peut également retrouver des thromboses vasculaires induites par la prolifération de cellules musculaires. Ce processus est également appelé artériosclérose accélérée ou **artériolosclérose du greffon (10) (Fig. 26)**



**Figure 26 :** Néphropathie chronique du transplant.

**A.** Facteurs impliqués dans la néphropathie chronique du transplant.

**B.** Aspect histologique typique de néphropathie chronique du transplant avec fibrose interstitielle et atrophie tubulaire. (EMC 2007)

### III-4 Diagnostic :

Sur le plan diagnostique tout d'abord, il est fondamental de définir si les lésions responsables de la perte du greffon sont initiées par des facteurs immunologiques ou non immunologiques, car dans un cas il convient de renforcer l'immunosuppression ou de la modifier et dans l'autre, bien souvent, au contraire de la diminuer.

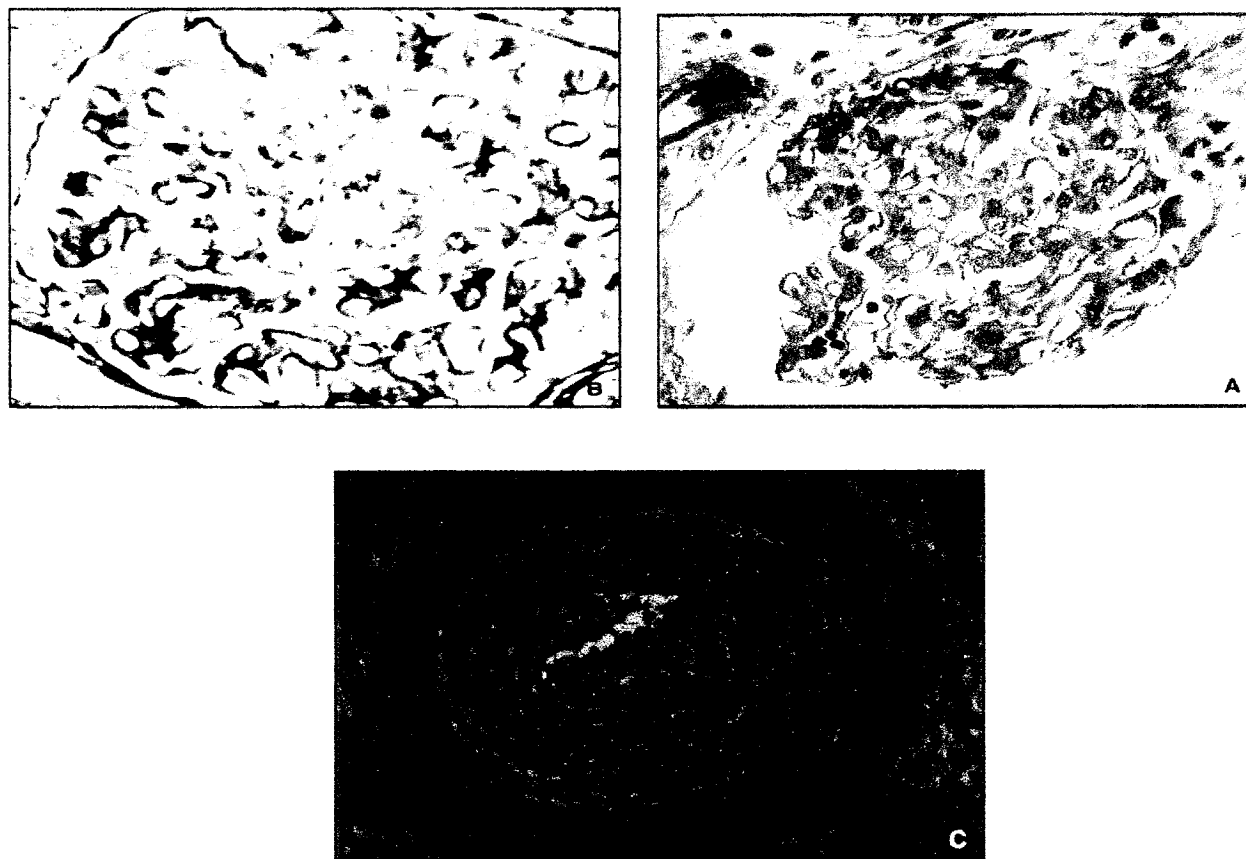
#### III-4-a : Clinique :

Sur le plan clinique le rejet chronique se traduit par une perte lente, mais progressive de la fonction du greffon, on peut noter une diurèse diminuée, l'apparition d'œdèmes en particulier dans les jambes et une douleur au niveau du greffon(10).

#### III-4-b : Histologique :

Les lésions histologiques évoquant un rejet chronique stricto sensu sont essentiellement la glomérulopathie d'allogreffé et la présence de lésions artérielles fibroprolifératives, auxquelles peut s'ajouter la présence de C4d le long des capillaires péri-tubulaires (49).

Ainsi, l'atteinte vasculaire est quasi constante marquée par une endartérite oblitérante qui s'associe très souvent à des lésions de fibrose, d'atrophie tubulaire et glomérulaire(203). (Fig. 27)



**Figure 27 :** Aspect histologique typique d'un rejet chronique.

A. Glomérulopathie d'allogreffe (trichrome de Masson).

B. Glomérulopathie d'allogreffe (coloration argentique) ; noter l'aspect en doubles contours.

C. Endartérite fibroproliférative (EMC 2007)

### **III-5- Prévention et traitement :**

Le traitement du rejet chronique reste donc mal défini et est un domaine d'investigation important. Il pourrait reposer, dans l'avenir, sur des approches très différentes de celles utilisées actuellement, en utilisant des molécules anti-fibrosantes ou bloquant la prolifération vasculaire.

Enfin, le meilleur contrôle de la réponse lymphocytaire B pourrait aussi limiter le développement du rejet chronique, souvent médiés par des anticorps (186).



# Chapitre III

### **Chapitre III : Prise en charge immunologique des malades en pré et en post greffe rénale :**

La crainte majeure devant la réussite d'une transplantation rénale est la survenue d'une réponse immunitaire dirigée contre le greffon. De ce fait, le patient est soumis à des prélèvements de sang de façon systématique afin de rechercher la présence d'un risque de rejet sur le transplant, à partir desquels se constitue la sérothèque qui serve de base à la réalisation des différents examens immunologiques.

#### **I Evaluation et préparation du receveur :**

Cette étape est fondamentale pour la réalisation d'une transplantation, et nécessite d' :

➤ Informers les patients :

Les receveurs doivent être informés sur les avantages que peuvent leur apporter la transplantation rénale (qualité de vie, liberté d'action, possibilité de grossesse...) et les risques encourus (mortalité, échec, infection sévère, effets secondaires des immunosuppresseurs...).(96)

➤ Inscrire les malades :

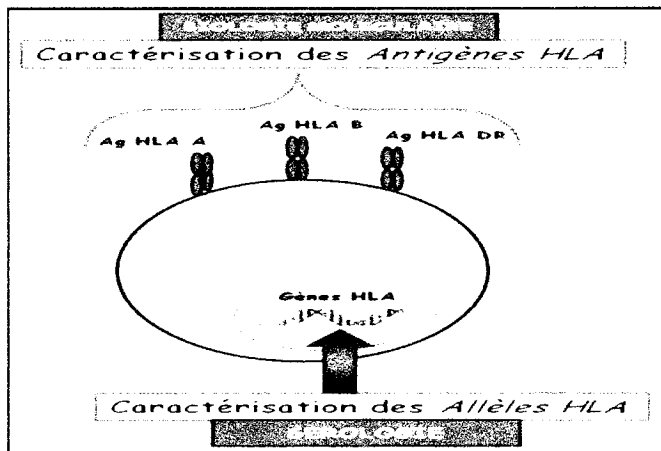
L'inscription sur le registre des malades candidats à la greffe nécessite le diagnostic précis de la maladie ainsi que l'évaluation de ces risques de récurrence (97). Ce registre servira à porter toutes les étapes réalisées et les résultats obtenus au cours de son suivi avant la réalisation de la greffe ainsi qu'après.

Les paramètres de suivi du couple sont fondés essentiellement sur l'établissement d'un bilan biologique (Groupage ABO, Sérologie virale) et d'un bilan immunologique qui consiste à étudier la compatibilité HLA entre le D/R et la recherche et l'identification des Acs anti HLA(98).

#### **II L'étude de la compatibilité HLA :**

##### **II-1 Le typage HLA :**

Pour typer les molécules HLA de classe I et II, on doit déterminer soit les Ag à la surface des cellules lymphocytaires par méthodes sérologiques ou par l'identification des gènes codant pour des molécules HLA par biologie moléculaire (BM). (99) **(Fig 28)**



**Figure 28** : schéma représentatif du typage HLA par BM et par méthode sérologique(99).

**I-1-1 le typage HLA par sérologie :**

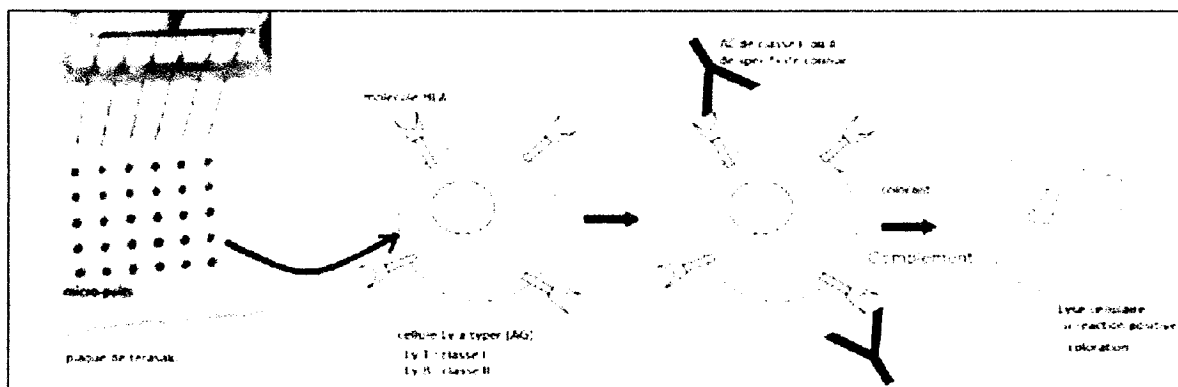
La microlymphocytotoxicité Complément dépendante (LCT) est considérée depuis 1964 comme la technique de référence (Terasaki et Mac Clelland )

**Principe :**

La LCT consiste à incuber les lymphocytes à typer en présence des Ac monoclonaux anti-HLA de classe I ou de classe II de spécificité connue dans des micropuits séparés, auxquels est ajouté du complément hétérologue de lapin, afin de lyser les cellules portant l'Ag correspondant au sérum utilisé.(100)

La lyse cellulaire est appréciée par différentes méthodes distinguant les cellules mortes des cellules vivantes par un colorant vital ou fluorescent.(101) (**Fig 29**)

Le typage est effectué sur des Ly totaux (T+B) pour les Ag de classe I, et sur des mononuclées débarrassées des Ly T (102) ou enrichies en Ly B pour le typage de HLA classe II, ces Ly sont séparés préalablement soit par centrifugation en gradient de densité ou par billes immunomagnétiques.(103)



**Figure 29** : représentation schématique du typage HLA par LCT (104)

**Avantages :**

- ✓ Technique simple et rapide.(105)
- ✓ Utilisé surtout pour le phénotype HLA de classe I.(106)
- ✓ permet une résolution de niveau : générique.(107)

**Inconvénients :**

- ✓ Discrimination limitée : reconnaissance de déterminants antigéniques communs à plusieurs molécules HLA très proches.
- ✓ Difficultés d'assignation surtout pour la classe II (DP). 108)
- ✓ Réactions croisées : deux molécules HLA codées par des allèles très différents peuvent être reconnues par un même Ac. (99)
- ✓ Manque d'Ac monospécifiques.
- ✓ La non expression de certaines Ag HLA sur les Ly.(105)

**II-1-2 le Typage HLA par biologie moléculaire**

Les techniques de biologie moléculaire permettent d'atteindre un niveau de résolution générique similaire aux méthodes « sérologiques » mais aussi d'obtenir un niveau de résolution de typage allélique « haute résolution ».(109) Plusieurs techniques existent, toutes ont en commun une étape d'amplification enzymatique : PCR (Polymérase Chain Réaction), qui permet d'amplifier les gènes qui codent pour les molécules HLA que l'on veut génotyper.(101)

**Principe :**

La PCR est une réaction de polymérisation consistant en une amplification spécifique d'une partie de la matrice d'ADN bornée par deux amorces complémentaires des extrémités 3' de la séquence nucléotidique par la DNA-polymérase, elle permet d'obtenir d'importantes quantités d'une séquence d'ADN spécifique.(110) (**Fig 30**)

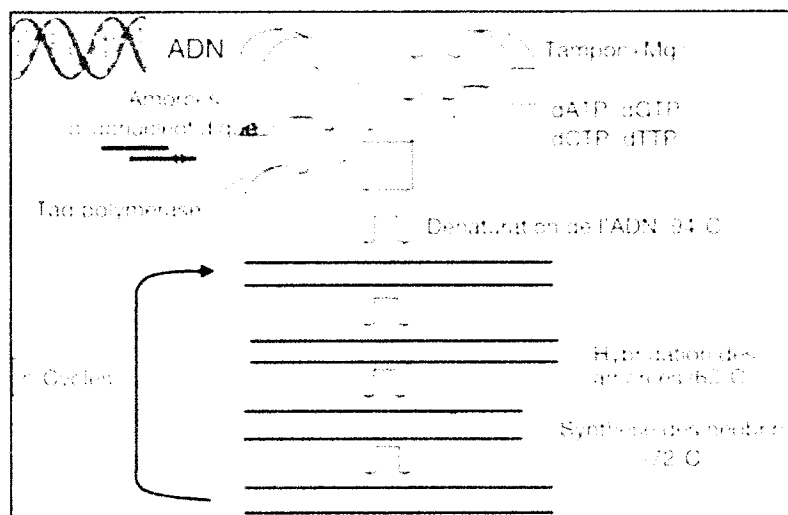
Avant de passer à l'amplification de l'ADN, on a recours à différentes méthodes d'extraction, de dosage et de contrôle de qualité d'ADN :

L'extraction est effectuée par plusieurs techniques :

- *L'extraction au phénol chloroforme* qui est basée sur la solubilité différentielle des acides nucléiques (AN) dans deux phases non miscibles.
- *Le salting out* qui utilise des solutions salines à forte concentration.
- *Le Quiagen* : Extraction par utilisation de colonne de silice (technique Quiagen : QIAmp DNA Blood Mini Kit).

La concentration et la pureté de l'ADN sont évaluées par spectrophotométrie (les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'UV à 260 nm).

Le contrôle de qualité de l'ADN s'effectue par une analyse électrophorétique sur gel d'agarose soumis à un champ électrique, les acides nucléiques chargés négativement et leur distance de migration dépend de leur poids moléculaire, de la concentration d'agarose et de l'intensité du courant appliqué.(110)



**Figure 30** : schéma représentatif des étapes d'amplification de l'ADN par PCR

**Avantage :**

- ✓ Amélioration de la discrimination par rapport à LCT.
- ✓ Détermination du numéro de série allélique.
- ✓ Le typage de niveau générique des gènes HLA –A, B et DRB1 est suffisant pour les transplantations rénales, de plus la BM permet le typage de HLA Cw, DPB1, DQA1, et le typage des MICA...(99)

**Inconvénients :**

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

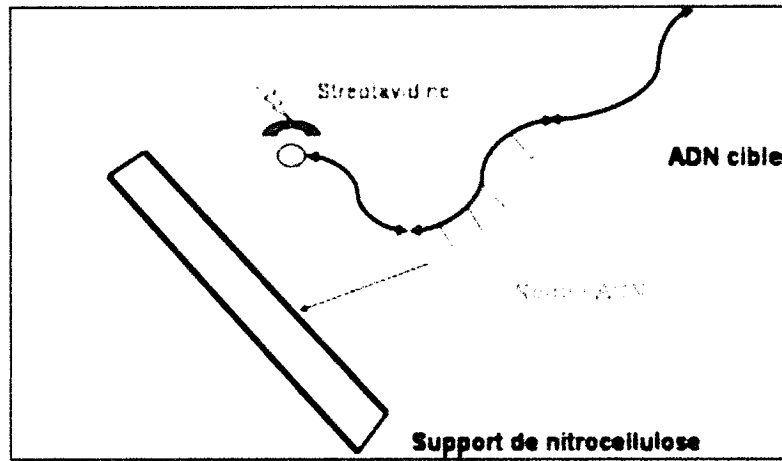
Plusieurs variétés de techniques basées sur la PCR ont été développées au cours du temps afin d'obtenir des résultats plus précises de typage :

**II-1-2-a Typage HLA par PCR - SSO « séquence specific oligonucléotide » :**

La PCR SSO est employée pour le typage HLA classe II, elle repose sur l'hybridation entre une sonde constituée d'un oligonucléotide synthétique et spécifique d'un allèle HLA–DP /DR/DQ et de l'un des segments d'ADN du sujet à typer et amplifier à l'aide d'amorce flanquant la partie polymorphe par PCR. (108)

L'ADN amplifié est déposé sur un support solide, dénaturé à pH alcalin pour pouvoir être accessible aux sondes et ensuite hybridé avec des sondes oligonucléotidiques marquées capables de détecter des différences de séquences entre allèles ou groupes d'allèles. En effet, pour être discriminantes, ces sondes doivent posséder des séquences variables situées en milieu de

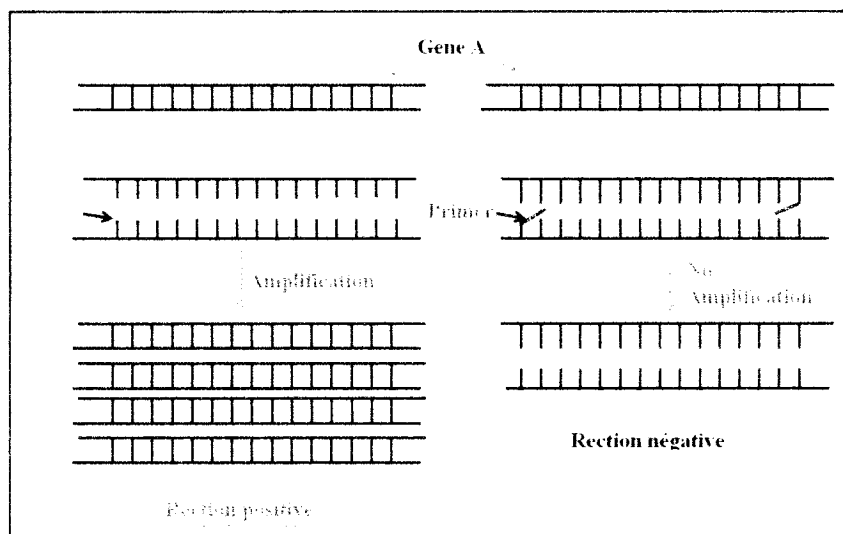
séquence. L'hybridation est enfin révélée par des systèmes de détection isotopiques au début, et actuellement par colorimétrie et émission de fluorescence.(110) (Fig 31)



**Figure 31** : représentation schématique de la technique PCR SSO

**II-1-2-b Typage HLA par PCR - SSP « Sequence Specific Primer » :**

La PCR-SSP est basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles en fonction du degré de résolution de l'amorce. Dans ce cas l'amplification par PCR ne se fait que sur l'allèle ou groupe d'allèle recherché. Il suffira donc simplement de déterminer si l'amplification s'est réalisée ou non.(111) (Fig32)



**Figure 32** : schéma représentatif de la technique PCR SSP(110)

**II-1-2-c PCR SSO Reverse « Technologie Luminex » :**

C'est une variante de PCR SSO consistant en une hybridation reverse de l'ADN génomique amplifié avec des amorces marquées par la biotine avec des sondes fixées sur un support solide:

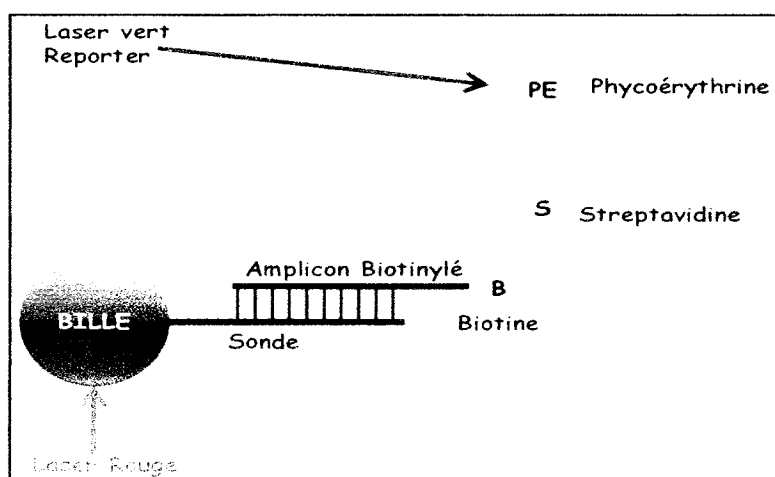
microsphères en polystyrène .Les hybrides sont révélés par fluorométrie (la R - phycoerythrine) (110)

### Principe :

Le produit amplifié à l'aide d'amorces spécifiques biotinylées est dénaturé et mis en contact avec un mélange de billes contenant les sondes fixées. Après lavage, seuls persistent les fragments hybridés sur leur sonde spécifique et enfin le marquage des fragments fixés sur les billes est analysé de la fluorescence émise par la phycoérythrine excitée.(110) (**Fig 33**)

Un couple de laser analyse les fluorescences émises par les différents fluorophores :

- Le laser rouge excite les fluorochromes qui sont à l'intérieur des billes et permet leur classification selon leur code couleur.
- Le laser vert excite le fluorochrome situé à l'extérieur des billes pour distinguer la réaction positive et négative.(112)



**Figure 33** : représentation schématique de la technique PCR SSOR(113)

### Avantages :

- ✓ Rapide.
- ✓ Réduction des étapes de lavages et de dénaturation de l'ADN.
- ✓ Bonne praticabilité.
- ✓ Interprétation objective et non subjective.(114)
- ✓ Détection d'allèles spécifiques.
- ✓ Grande Spécificité et sensibilité
- ✓ Très bonne résolution générique et allélique pour DRB1 (kit HD).(115)

**Inconvénients :**

- ✓ Coûteuse

**II-1-2-d Le Séquençage « PCR SBT : Sequence Based Typing »:**

Actuellement, le typage HLA par séquençage PCR – SBT est la méthode idéale pour l'étude de polymorphisme.

Elle consiste à déterminer la succession des bases nucléotidiques d'ADN ou d'ARNm qui codent pour les molécules HLA.(116)

**Principe :**

L'approche de Sanger est une méthode de synthèse enzymatique qui consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer.

L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase en présence d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et une faible concentration de quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) chacun associé à un marqueur fluorescent différent. Une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ces didésoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation.

Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les positions dans la séquence.

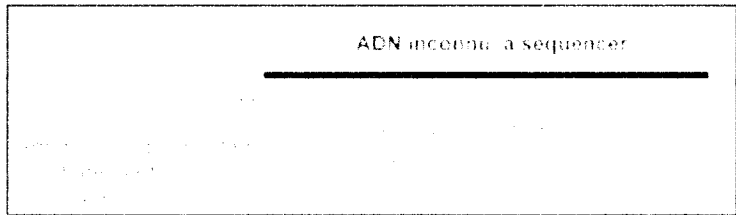
Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur un gel de polyacrylamide ce qui permet ainsi de lire la suite de chacune des bases dans la séquence.

Une dernière étape de traitement bioinformatique permet alors la reconstruction d'un génome entier à partir de tous les fragments séquencés.(117)

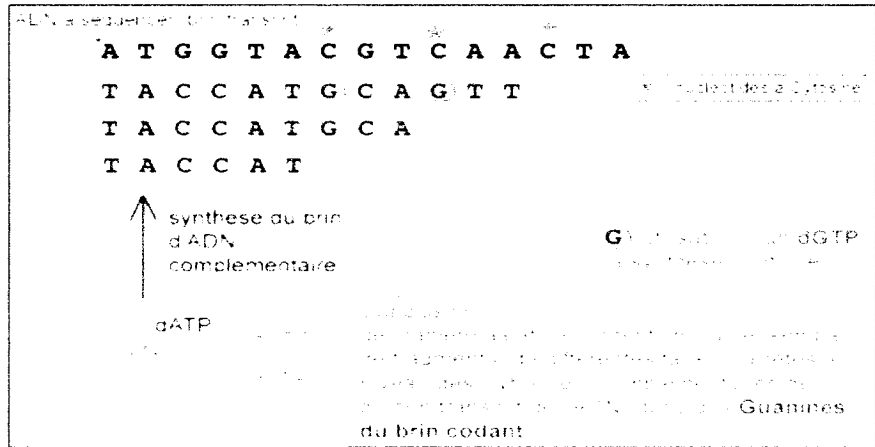
L'interprétation du séquençage se fait par comparaison avec une banque de données contenant toutes les séquences HLA mise à jour régulièrement.



**Premier Etape :**



**Deuxième étape :**



**Troisième étape :**

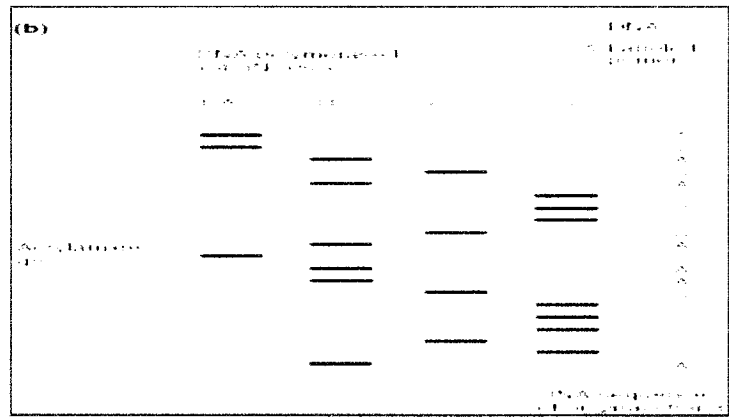
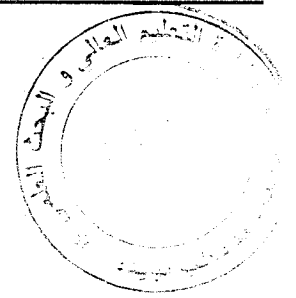


Figure 34 : schéma représentatif des 3 étapes de séquençage

**Avantages :**

- ✓ lève des ambiguïtés, détection de nouveaux allèles.
- ✓ Analyse automatique.
- ✓ Permet de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité.
- ✓ Rendement augmenté par automatisation et utilisation de séquenceurs multi capillaires.(115)



**Inconvénients :**

- ✓ Couteuse
- ✓ Rendement faible pour PCR SBT mono allélique.(115)

**II-2 L'intérêt de typage HLA :**

Les résultats de typage permettent de définir la compatibilité HLA entre le donneur et le receveur par la détermination du nombre d'incompatibilités, nombre de miss match (MM) ou d'identité (ID) HLA

Par exp:            R: A\*01 A\*02 B\*08 B\*44 DR\*03 DR\*04  
                          D: A\*01 A\*29 B\*08 B\*44 DR\*03 DR\*04            } 5 ID + 1 MM (118)

Donc on peut classer les couples D/R en :

- identique
- semi identique
- non identique

La survie du greffon dépend du nombre d'incompatibilités HLA entre donneur/receveur.

Exemple de survie des greffons selon l'incompatibilité HLA au niveau de l' HUG « hôpitaux universitaires de Genève » (les résultats après 5ans de greffe):

- 1MM 72%
- 2MM 69%
- 3MM 50% (119)

Donc une bonne compatibilité HLA diminue la fréquence des crises de rejet et contribue à une survie prolongée du greffon.(106)

**II-3 Recommandation:**

Les typages HLA génériques de classe I (HLA A, HLA B) et de classe II (HLA DR, HLA DQ) du donneur et du receveur sont réalisés deux fois à partir de prélèvements effectués à des dates différentes pour déterminer la compatibilité (D/R).(120)

Un typage allélique du donneur peut s'avérer nécessaire si le receveur est immunisé.

### **III le suivi des malades:**

Le laboratoire d'histocompatibilité mis en jeu une stratégie de suivi des malades tout au long de la période d'attente de la greffe et même après, dans un but de rechercher la présence de tous éléments pouvant conduire à la survenue d'une réponse immunitaire entraînant un échec de la greffe.(121)

Cette stratégie est ajustée au cours du temps, dans un premier lieu, elle est préventive de rejet hyperaigu par la recherche d'une allo-immunisation en amont de la greffe, avec une adaptation d'un traitement immunosuppresseur préventif.

Dans un second lieu, elle consiste à une surveillance des malades greffés basée sur la recherche des Ac, ainsi que d'autres tests supplémentaires nécessaires pour la mise en évidence d'une réponse allogénique précoce (le rejet aigu) ou tardif (le rejet chronique) pour l'ajustement du protocole thérapeutique en cas d'une suspicion de rejet.(122)

Le suivi des malades en pré et en post greffe est basée essentiellement sur la constitution d'une sérothèque.

#### La constitution d'une sérothèque :

La sérothèque représente une collecte des sérums prélevés durant toute la durée de suivi, qui servira à la recherche des anticorps anti HLA et à la réalisation du cross match (CXM).

Elle est constituée de :

- Sérum du premier jour.
- Sérums prélevés chaque 3 mois.
- Sérum du jour (48h avant la greffe).
- Sérums prélevés systématiquement après la greffe.
- Sérums prélevés après tout événement immunisant survenant avant ou après la greffe (transfusion, grossesse, vaccination, greffe), selon un protocole défini.

#### *→ la conservation des sérums:*

Les sérums des patients sont obtenus à partir d'un prélèvement de 10 ml de sang sur tube sec. Après centrifugation le sérum est transféré dans des tubes à hémolyse et dans des tubes rhésus.(105)

La conservation des sérums est faite aussi sur des tubes Eppendorf de 1,5 ml.

Les sérums peuvent être conservés à une température ambiante pendant 4 jours maximum, et au réfrigérateur pendant 7 jours maximum.(123)

La conservation à longue durée se fait à une température de  $-30^{\circ}\text{C}$  ou à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans des tubes à hémolyse pour la recherche des Ac Lymphocytotoxiques et dans des tubes Rhésus pour le CXM.(03)

### **III-1 la surveillance d'une alloimmunisation :**

Les Ac anti HLA sont souvent la cause de la perte précoce du greffon. ce qui semble indiquer que des techniques de CXM et de recherche des Acs plus sensibles peuvent être utilisées pour anticiper et prévenir ces échecs, dont la nécessité de réaliser un dépistage de ces Acs. En cas de positivité de la recherche on doit identifier s'ils sont spécifiques du donneur appelés DSA (donor specific antibody) ou non spécifiques.(124)

#### **III-1-1 Technique de recherche et d'identification des Ac anti-HLA :**

Ils peuvent être détectés par deux types de tests :

- Cellulaires : « complement dependent cytotoxicity ».
- En phase solide : « ELISA et Luminex ». (125)

##### **III-1-1-a Lymphocytotoxicité complément dépendante (LCT)**

Elle est considérée comme la technique fondatrice à laquelle a été reproché un manque de spécificité et de sensibilité, actuellement elle est moins utilisée.(126)

#### **Principe :**

Cette méthode fait appel à un panel de cellules mononuclées parfaitement phénotypées en HLA qui sont mise en présence du sérum du receveur. et en cas de présence d'allo Ac, l'activation du complément par le complexe immunitaire formé va conduire à la lyse de la cellule, révélée en microscopie par l'incorporation d'un colorant vital.(127)

#### **Avantage :**

- ✓ Détermination de PRA « **panel reactive antibodies** » : c'est le pourcentage de positivité d'un ou des serum(s) testé(s) sur la totalité du panel de lymphocytes.(99)

#### **Inconvénients :**

- ✓ Ne détecte pas que des Ac anti HLA (elle peut mettre en évidence des anticorps anti-HLA aussi bien IgG qu'IgM ainsi que les Ac non HLA, les auto Ac).
- ✓ Les résultats dépendent de la qualité du complément et de l'évaluation de la lyse qui est subjectif.(128)
- ✓ Peu standardisée (panel).
- ✓ Interprétation délicate.
- ✓ Difficilement automatisable.
- ✓ Pas très sensible (sérum multi spécifique).(99)

### III-1-1-b ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay):

ELISA est une méthode immuno-enzymatique de type sandwich. Elle permet la recherche et l'identification des Acs anti-HLA en utilisant des Ags HLA de classe I ou de classe II purifiés et fixés sur un support plastique (microplaque). (128)

#### Principe:

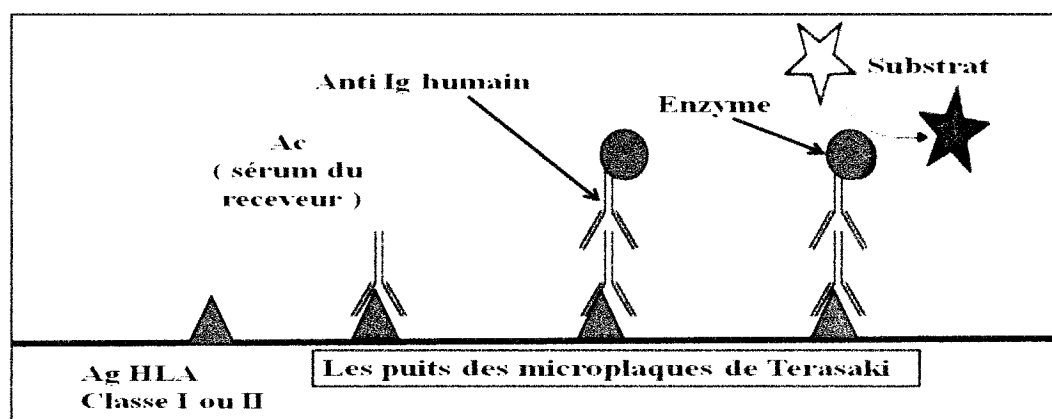
##### → Détection des anticorps anti-HLA :

Les puits des microplaques de Terasaki sont coâtées avec un pool d'Ag HLA purifiés de classe I et II. La présence d'Acs spécifiques anti-HLA du sérum à tester entraîne la formation de complexes Ag-Ac révélés après incubation par un conjugué (Ac) anti-IgG humaines couplé a une enzyme permettant une lecture par une réaction colorimétrique après ajout du substrat. (128) (Fig 35)

Une appréciation de la coloration obtenue est effectuée par lecture à 630 nm à l'aide d'un lecteur spécifique pour la lecture des plaques de Terasaki. (112)

##### → Identification des anticorps anti-HLA :

L'identification des spécificités des Ac anti-HLA s'effectue sur des microplaques où chaque puits est coâtée par un ou deux Ag de classe I ou II. (110)



**Figure 35 :** schéma représentatif de la technique ELISA (sandwich) (119)

#### Avantages:

- ✓ Plus sensible que LCT. (112)
- ✓ Rapide et Reproductible. (129)
- ✓ Ne détecte que les Ac anti HLA.
- ✓ Ne détecte que les IgG (sauf adaptation).
- ✓ Automatisable et Relativement standardisée.
- ✓ Interprétation facile.

- ✓ Moins couteuse.
- ✓ Utilise 3 type de kits pour : - le screening (détection des AC anti HLA, positive ou négative en utilisant un pool d'Ag).

- l'identification (on utilise 2 ou 3 Ag dans un puits).

- l'Haute Définition (on utilise un seul Ag de spécificité définie par puits). (99)

**Inconvénients :**

- ✓ Moins sensible que Luminex.(112)
- ✓ elle peut détecter les IgM.

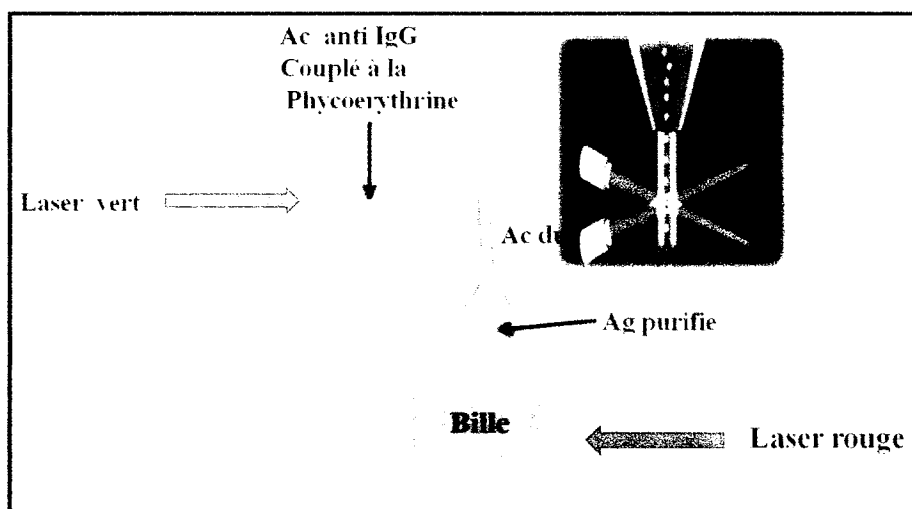
**III-1-1-c Technologie Luminex**

En raison de l'amélioration récente des méthodes de détection des Ac anti HLA dans le sérum des patients, les laboratoires disposent d'outils plus sensibles tels que Luminex, pour prédire la spécificité de ces Ac donc évaluer le risque du patient face à un donneur potentiel.(35)

**Principe :**

Cette technique de détection et d'identification des Ac anti HLA utilise des microsphères recouvertes d'Ag HLA isolés et purifiés comme support de détection.(126) Les Ac anti HLA présents dans le sérum à tester réagissent spécifiquement avec les molécules HLA présentes à la surface des billes, puis révélés par un Ac secondaire IgG humaines marqué à la phycoérythrine et discriminés par l'intensité de leur fluorescence (128) La lecture est effectuée par l'appareil *luminex*. (Fig 36)

Elle permet de tester simultanément en microplaque, 90 sérums contre un mélange de 100 billes colorées portant chacune une spécificité HLA différente.(110)



**Figure 36** : représentation schématique de la technique de recherche des Ac anti HLA par LUMINEX (114)

### Avantage :

- ✓ Plus sensible et plus spécifique qu'ELISA.(112)
- ✓ identification et/ou le dosage de plusieurs Ac anti HLA en dessous du seuil de détection des autres techniques.(125)
- ✓ nécessite un faible volume: 10µl d'échantillon.
- ✓ ne détecte que les Ac anti HLA.
- ✓ ne détecte que les IgG Anti HLA.
- ✓ ne détecte pas les auto-anticorps.
- ✓ détecte les Ac anti HLA qui ne fixent pas le complément et qui sont délétères pour le greffon.(114)
  
- ✓ Suivi semi quantitatif:

-MFI ( Mean Fluorescence intensity) L'intensité relative de fluorescence : c'est une Valeur des fluorescences observées pour chaque bille qui est corrélée à sa concentration et à son affinité.

-% SA: nombre de billes positives.(112)

Utilise 3 types de kits pour : le Screening, l'Identification et surtout l'haute définition (single Ag).(99)

### Inconvénients

- ✓ Interprétation parfois délicate.
- ✓ Plus coûteuse que les autres techniques.

### III-1-2 Technique de cross match

C'est une épreuve de compatibilité croisée destinée à dépister des Acs anti-HLA cytotoxiques, capables de fixer le complément, d'isotype IgG et spécifique des Ag HLA de classe I du donneur, ces Ac peuvent entraîner un rejet hyper-aigu.(110)

Le cross match est obligatoire avant toute transplantation rénale et il est effectué par : LCT ou par cytométrie en flux(105), et récemment même par Luminex .

#### III-1-2-a Cross match par lymphocytotoxicité :

La technique de CXM par LCT est la plus ancienne, elle est réalisée sur des plaques de terasaki.(124)

#### Principe :

Ce test consiste à incuber les lymphocytes du donneur potentiel avec le sérum du receveur, puis à mettre en évidence l'éventuelle fixation des Ac par cytotoxicité de type IgG après ajout du complément de lapin.(124)

La positivité est révélée par une destruction des Ly et une coloration grâce à un colorant vital ou fluorescent. Par cette technique la positivité est reconnue comme une contre-indication formelle à la transplantation.(131-132) (**Fig 37**)

Le CXM est obligatoirement réalisé avec :

- Les lymphocytes totaux ou les lymphocytes T pour les anticorps anti- HLA de classe I.
- Les cellules B surtout en cas de 2<sup>ème</sup> greffe.
- les lymphocytes autologues T+B. T et B du receveur pour détecter les auto – anticorps.(110)

Depuis l'introduction du CXM, les pertes de greffon pour rejet hyper-aigu ont quasiment disparu.(114)

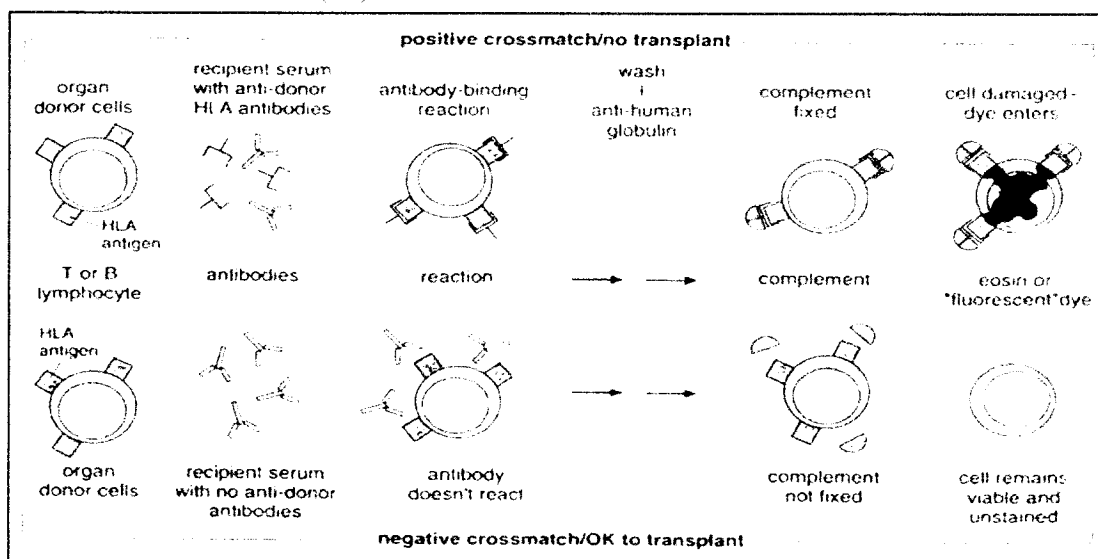
Mais cette technique manque de sensibilité et parfois de spécificité :

- Un cross-match positif n'est pas toujours dû à des anticorps délétères.
- un cross-match négatif ne signifie pas l'absence d'anticorps délétères, même si leur concentration est moindre.

Des modifications techniques ont donc été apportées au fil du temps pour améliorer la sensibilité :

- ✓ l'augmentation du nombre de lavages (pour diminuer les facteurs bloquant l'activité du complément).
- ✓ l'augmentation du temps d'incubation (pour tenir compte des anticorps de faible affinité)
- ✓ L'adjonction de globuline humaine anti-chaînes légères kappa (AGH) qui permet la détection de faibles taux d'anticorps cytotoxiques ou non.(126)
- ✓ l'adjonction d'un agent réducteur diethyl thiothréitol (DTT) pour distinguer les IgG et les IgM.(132)

Les sérums du receveur sont conservés en sérothèque tout au long du suivi du patient afin d'effectuer un CXM final.(99)



**Figure 37 :** représentation schématique du CROSS MATCH par LCT(119)



### III-1-2-b Cross match par cytométrie en flux (FCXM) :

Au début des années 1980, les techniques de cytométrie de flux ont été appliquées à la réalisation du cross-match avec une amélioration de la sensibilité.(133 134)

Mais les résultats de ces CXM restent controverses car très sensibles et pas assez spécifiques.(126)

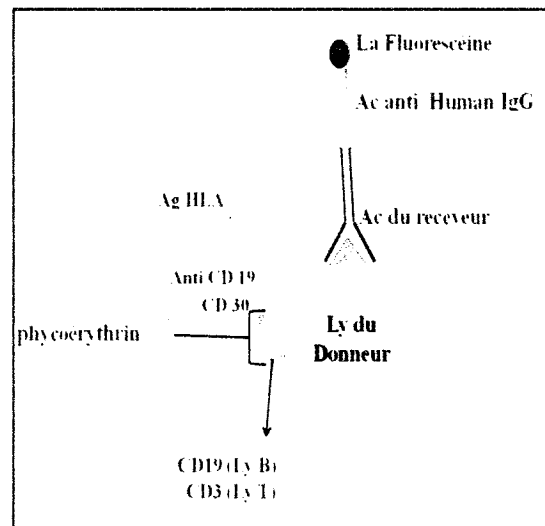
#### Principe :

Il se réalise par incubation des lymphocytes du donneur avec les sérums du receveur, après des étapes de lavage.

Les Acs fixés à la surface des Ly sont révélés grâce à un fluorescent dirigé contre le fragment Fc des IgG humaines.

Un double marquage à l'aide d'un Ac marqué à la phycoérythrine anti-CD3 (sélectionnant les ly T) ou anti- CD19 (sélectionnant les ly B) permet de préciser sur quelle population Lymphocytaire sont fixés les Acs détectés.(124)<sup>124</sup>

La fluorescence est analysée par cytofluorimétrie.(110)



**Figure 38 :** schéma représentatif du FCXM

#### avantages :

- ✓ la sensibilité est augmentée de 10 à 100 fois par rapport aux techniques de référence.(133)

#### Inconvénients :

- ✓ Pas assez spécifique (la mise en évidence des anticorps réellement délétères, l'était beaucoup moins).(126)
- ✓ L'amélioration de la sensibilité était incontestable.

CXMF « faussement positif » à cause d'auto-anticorps présents à la surface des lymphocytes, de récepteurs Fc à la surface des lymphocytes, fixant des anticorps quelle qu'en soit la spécificité, ou encore de la fixation d'anticorps non-anti-HLA à leur ligands sur les lymphocytes.(133)

### III-1-2-c cross match par Luminex : (LumXM)

Afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction de cross match, la technologie Luminex est développée à partir de la technique de cytométrie en flux, dont on utilise des billes à la place des cellules.

**Principe :**

Les billes sont coatées par des molécules HLA du donneur, qui sont précipités auparavant à partir des membranes cellulaires, elles sont utilisées pour la recherche des Ac anti HLA cytotoxiques complément dépendant dans le sérum du receveur.(135)

La méthode est très sensible, elle permet de détecter un cross match négatif par LCT. Les dernières études de « European Society for Organ Transplantation 2012 » ont confirmé que les patients avec LumXM positif ont un risque de rejet plus élevé.(136)

**Note :** L'interprétation de cross match par les différentes méthodes de LCT, cytométrie en flux et luminex en cas de donneur vivant : (137)

Cross Match par LCT des Ly B	Cross Match Par Cytometrie en Flux	Recherche Des Ac Par Luminex	Décision à La Greffe
+	+	+	non
-	+	+	non
-	-	+ MFI <10000	oui
-	+	-	oui
-	-	-	oui

Non : contre indication a la greffe. Oui : greffe possible.  
 En cas de CXM par Ly T POSITIF la greffe est contre indiquée.

**III-2 : Intérêt de recherche et d'identification des Ac anti HLA :**

La recherche et l'identification des Ac anti HLA soit par méthodes cellulaires ou en phase solide permet de:

- ✓ Classer Les patients en non immunisés, immunisés ou hyper immunisés selon la valeur du PRA, cette immunisation est acquise par les événements immunisants:
  - **Patients non immunisés (PRA = 0%) :**

Ce sont des patients caractérisés par l'absence d'apparition d'Ac anti HLA tout au long du suivi Immunologique pré-greffe. (125)

En cas d'absence de production d'Ac anti HLA après événement immunisant définit un état de « non réponse » immunologique.(97)

- **Patients immunisés ( 1% > PRA < 80% ) :**

Lorsqu'on détecte dans le sérum du patient au moins une spécificité anti-HLA

▪ **Patients hyperimmunisés (PRA > 80%) :**

Ce sont des patients dits à « haut risque immunologique », dont la recherche des Ac a révélé la présence d'Ac préformés dirigés principalement contre les molécules HLA.(97)

L'hyper immunisation est un obstacle majeur de la survie du greffon.(130)

✓ Classer les Ag HLA en Ag « permis » ou « interdits » :

▪ **Antigènes HLA interdits** : ce sont les antigènes contre lesquels existent des Acs détectés dirigés contre eux. Un Ag qui a été défini comme interdit quelle que soit la technique utilisée, ne peut plus être classé ultérieurement en Ag permis.

▪ **Antigènes HLA permis** : un Ag est considéré comme permis si toutes les réactivités pour cet antigène sur tous les sérums testés sont négatives par toutes les techniques réalisées, dont la technique de « Single Antigen » (Luminex).(138)

✓ diminuer les CXM « inutiles ».(99)

✓ Prédire la spécificité de ces Ac et pour évaluer le risque du patient face à un donneur potentiel.

✓ Prévenir le rejet hyper aigu avant la greffe et la surveillance d'apparition des Acs en post greffe afin d'établir un diagnostic précoce.

**III-2-1 prévention en amont de la greffe :**

Il est bien établi que les Acs anti-HLA préformés, sont à l'origine du rejet hyper aigu.(139) Sa prévention repose sur la recherche et l'identification régulière des Acs anti- HLA de classe I et II, et par la pratique systématique d'un CXM pré greffe.(112)

Pour en garantir une meilleure acceptation du greffon et sa longue survie, des démarches de prévention sont instituées en désignant un protocole adéquat de suivi.

→ **protocole de recherche d'une alloimmunisation :**

Les modalités de suivi des patients en attente de greffe changent d'un laboratoire à un autre selon la disponibilité des techniques. Il existe différents types de recommandations établies par les agences responsables de la greffe rénale.

Le protocole suivant est établie par l'agence de la Biomedecine de France, qui sert de référence pour beaucoup de laboratoire d'immunologie :

➤ **La recherche des anticorps anti HLA :**

-La Recherche d'anticorps anti-HLA de classe I et de classe II est recommandée tout les trois mois, et l'intervalle entre 2 prélèvements ne doit pas dépasser 6 mois.

-La recherche se fait par une technique sensible (ELISA, Luminex) et une fois par LCT sur lymphocytes T ou totaux, avec et sans (DTT) sur un panel.

- la recherche d'anticorps d'isotype IgM en LCT sur lymphocytes T ou totaux est recommandée une fois par an.

- En cas de positivité de la recherche, l'identification des spécificités Acs devra être réalisée par une technique sensible.

- en cas d'événement immunisant :

On doit contrôler la modification du profil Acs à deux reprises après l'événement (protocole transfusionnel entre J15 et J21, et à J30).

En absence d'Ac anti HLA après plusieurs événements immunisants essentiellement sous forme de transfusions sanguines, le receveur est dit « *non répondeur* ». Or, en présence d'Ac anti HLA, le receveur est dit « *répondeur* ».

Si le sérum du patient contient des Ac anti HLA, celui-ci est conservé en vue du cross match final

- pour les patients immunisés :

-Un prélèvement tous les 3 mois est recommandé.

Le dépistage d'anticorps anti-HLA en technique sensible peut ne plus être effectué lorsque le patient est connu immunisé en classe I et en classe II.

-Les spécificités anti-HLA de classe I et de classe II doivent être identifiées par technique sensible, si besoin par une technique « Haute Définition ».

-Une recherche d'anticorps en LCT sur lymphocytes T ou totaux est recommandée une fois par an (comprenant une recherche d'isotype IgM) et sur le sérum du pic d'immunisation (pour la détermination du PRA).

-Le passage du statut de non immunisé au statut d'immunisé doit être confirmé sur un deuxième prélèvement si possible à 3 mois du précédent.

- Cross match :

-un cross match initial est effectué sur le premier sérum prélevé.

Il est recommandé d'effectuer un premier cross match à distance de la greffe, pour détecter une éventuelle réactivité contre le donneur non mise en évidence par les tests de recherche d'anticorps anti-HLA.

- un CXM sur le sérum du jour (48 heures avant la greffe, maximum 8 jours) est indispensable quel que soit le statut immunologique du patient.

Un CXM sur sérum du jour est obligatoire si :

- Le sérum le plus récent date de plus de trois mois pour un patient immunisé ou de plus de six mois pour un patient non immunisé,
- un événement immunisant a eu lieu entre la date de prélèvement du sérum le plus récent et la proposition de greffe.

-Les sérums testés lors du CXM devraient inclure un sérum de chaque pic d'immunisation, les sérums prélevés après événement immunisant et un sérum récent.

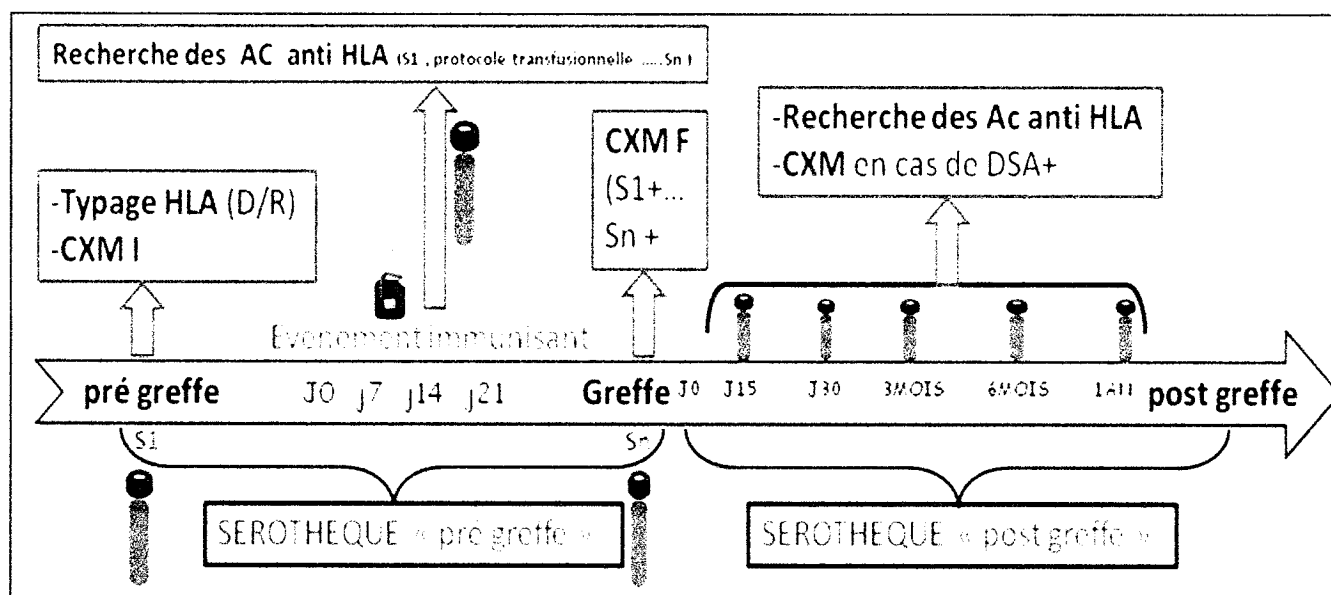
-Le CXM doit être effectué sur lymphocytes T et B, par technique de LCT mais un FCXM est recommandé.

-Le CXM doit être réalisé avec et sans DTT sur lymphocytes T ou totaux par technique LCT.

-La réalisation d'un CXM sur lymphocytes B est recommandée.

- Un auto cross-match peut être réalisée pour faciliter l'interprétation des résultats.

- Si le CXM est positif (quelle que soit la technique), il est impératif de réaliser une étude des sérums du receveur par une technique sensible d'identification même si le dépistage d'Ac en technique sensible est négatif.
  - Tout CXM positif (IgG) par technique LCT sur sérum de moins de trois mois avec lymphocytes totaux ou T est une contre-indication à la transplantation en l'absence d'explication liée à la présence d'auto-anticorps.
  - Un CXM positif IgM sur les lymphocytes T, sur le sérum le plus récent peut être dû à un début d'immunisation anti-HLA et doit être discuté avec l'équipe de transplantation afin de préciser les événements cliniques récents.
  - Le CXM positif sur lymphocytes B n'est pas une contre-indication absolue mais doit faire l'objet d'une discussion entre le biologiste et le clinicien.
  - Il est recommandé de conserver plusieurs aliquotes de cellules congelées du donneur pour la réalisation du CXM post-greffe. (120)
- Selon le plan de l'agence de BIOMEDECINE 2012-2016, il est recommandé de mettre en place le dispositif de dons croisés d'organes prévu par la loi de bioéthique de 2011. En cas d'incompatibilité immunologique entre un receveur et son donneur vivant : le receveur bénéficie du don d'une autre personne également en situation d'incompatibilité avec son receveur ce dernier bénéficiant du don du premier donneur. (140)



**Figure 39 :** représentation schématique du protocole de suivi des patients en pré et post greffe rénale

**Remarque :**

Un traitement préventif est installé quelques jours avant la réalisation de la greffe afin d'éviter au maximum la survenue d'un rejet, surtout pour les personnes connues comme hyperimmunisées dont le risque de rejet est trop élevé. (voir chapitre VI)

### III-2-2 La surveillance des malades greffés :

La prévention du rejet (aigu et chronique) est le but principal de suivi en post greffe rénale, elle est basée sur la surveillance d'apparition des signes d'une réponse allogénique, essentiellement l'apparition des Acs, afin d'établir un diagnostic précoce et précis de rejet, et donc assurer une prise en charge thérapeutique rapide : adapter le traitement immunosuppresseur et/ou instaurer un traitement spécifique.(106)

#### III-2-2-a Le protocole de suivi d'apparition des Ac :

Il repose essentiellement sur la constitution d'une sérothèque en post greffe. (Fig 39)

La recherche systématique d'Acs anti HLA se fait par des techniques sensibles (ELISA ou LUMINEX) en post greffe à :

- ✓ J7.
- ✓ J15.
- ✓ J30.
- ✓ Après 3 mois.
- ✓ Après 6 mois.
- ✓ Après un an.
- ✓ Puis chaque 6 mois.

Une recherche spécifique est réalisée :

#### ↓ En cas d'un événement immunisant :

- **Vaccination** : un prélèvement sera effectué à la recherche des Acs après chaque vaccination.
- **Grossesse** : un suivi sera effectué tous les mois à partir du troisième mois de la grossesse.
- **Transfusion** : la recherche d'anticorps anti-HLA doit être réalisée selon le protocole transfusionnel (voir protocole de suivi avant la greffe).
- **Transplantectomie** (retour en dialyse) : la recherche d'anticorps anti-HLA à répartir au cours des 6 mois suivants sont recommandées.(141)

#### ↓ Situations particulières :

- **Une indication clinique** : augmentation de la créatinine sérique faisant suspecter un épisode de rejet.(125)
- **En cas d'une diminution de l'immunosuppression.**

### III-2-2-b Conduite à tenir devant les résultats de la recherche des Acs :

#### → En cas d'absence d'Ac anti HLA :

Dans ce cas, on parle des malades non immunisés, leurs suivi poursuit normalement selon le protocole suscité, avec le maintien de traitement préventif (voir chapitre VI).

#### → En cas de présence d'Ac anti HLA :

Dans ce cas, les malades sont dit immunisés dont les Ac peuvent être spécifiques ou non du donneur, on doit donc compléter les examens pour une détermination des spécificités par une technique sensible.(142)

#### \*Exemple :

Les échantillons revenus positifs (MFI>1000) avec la technique LUMINEX de dépistage, sont testés en technique LUMINEX « single antigen flow beads » (une spécificité antigénique sur chaque bille) permettant de déterminer les spécificités des anticorps.

Les billes positives sont ensuite analysées selon les incompatibilités HLA entre le donneur et le receveur pour identifier les anticorps dirigés spécifiquement contre des antigènes du donneur.(125)

Après identification on distingue deux cas :

- **DSA Négatif** : absence d'Acs spécifiques du donneur, donc on continue toujours le contrôle d'apparition des Acs anti HLA selon le protocole précédant.

Sur le plan thérapeutique, on continue toujours avec le traitement préventif (voir traitement).

- **DSA Positif** : la présence d'Acs spécifiques du donneur, qui est un signe d'alerte en faveur d'un rejet :

#### → *Par CXM post greffe :*

Les patients avec DSA + et CXM + ont un risque de rejet plus élevé par rapport au patients qui ont un DSA+ et CXM - .(143)

→ *Par ELISA :* le risque de rejet est plus élevé chez les patients avec DSA positif score : **6-8** par rapport a ceux qui ont un score de **4**.(143)

→ *Par LUMINEX :* Une valeur de **DSA >5200 MFI**, signifie un risque de 100% de rejet aigu avec 0% de faux positif, alors qu'une valeur de **DSA <5200 MFI**, signifie un risque de 50% de rejet aigu avec 50% de faux positif.(144)

#### Remarque :

1- Les patients ayant une titration élevée d'Ac anti-HLA dans le mois suivant la greffe, présentent plus de rejets aigus sévères, alors que ceux avec une titration plus basse ont tendance

à faire des rejets chroniques, suggérant que la titration et le monitoring des alloanticorps pourraient être utiles pour présumer du risque de rejet.(145, 146)

2-Dans certains cas, les Ac sont détectables alors que le greffon est encore fonctionnel ; dans d'autres cas, les Ac ne deviennent détectables qu'après l'arrêt de l'immunosuppression ou après transplantectomie.(147 124)

➤ **Diagnostic de certitudes de rejet devant un DSA positif :**

▪ **Clinique et biologique :**

Le diagnostic clinique est évoqué devant une insuffisance rénale aiguë, confirmé sur le plan biologique par le dosage des marqueurs de la fonction rénale dont on note :

- Créatininémie >2 mg/dl.
- Clairance < 60 ml /min
- Urée : le rapport entre urée urinaire et urée sanguine est inférieur à 10.(148, 149)

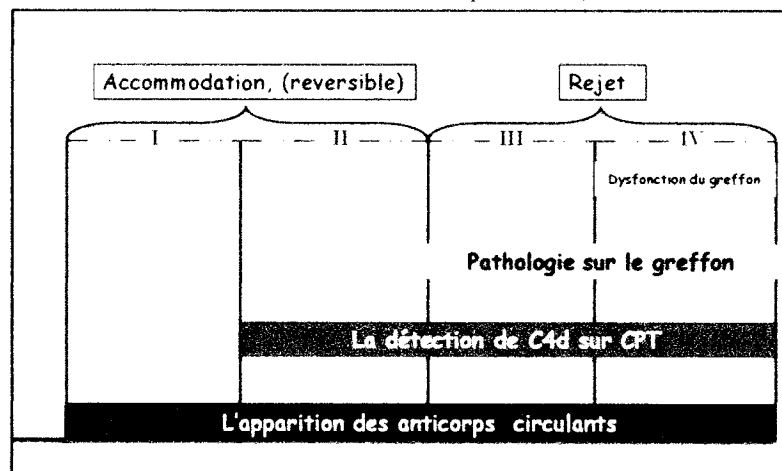
▪ **Histologique :**

Jusqu'à l'heure actuelle et selon la classification de *Banff*, la biopsie est l'examen clé qui permet de poser le diagnostic devant une suspicion de rejet dont :

-L'empreinte tissulaire d'une fixation d'Ac est corrélée dans 43 à 93% des cas à l'existence de DSA circulants (anti HLA I> anti HLA II> anti HLA I et II), qui est un signe spécifique de rejet humoral.(150 124)

-La fixation de **C4d** est corrélée à la présence de DSA circulant dans 88% des cas, ce qui pourrait témoigner d'une agression allo immune active.(151)

-En plus de dépôt de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires (CPT), on note également la présence d'un infiltrat cellulaire.(152) (Voir chapitre II 5)



**Figure 40 :** Représentation schématique des stades de rejet à médiation humorale(153)



**Note :**

En cas de suspicion de rejet à médiation humorale (C4d +) et en l'absence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur détectables, une recherche complémentaire d'allo-anticorps non HLA (ex : anti- MIC A et B) peut être effectuée. (154)

➤ **Marqueurs prédictifs de rejet :**

Ces dernières années, les scientifiques s'attachent à identifier des marqueurs biologiques qui pourraient les aider à diagnostiquer un rejet, voire prévoir le devenir à long terme du greffon.

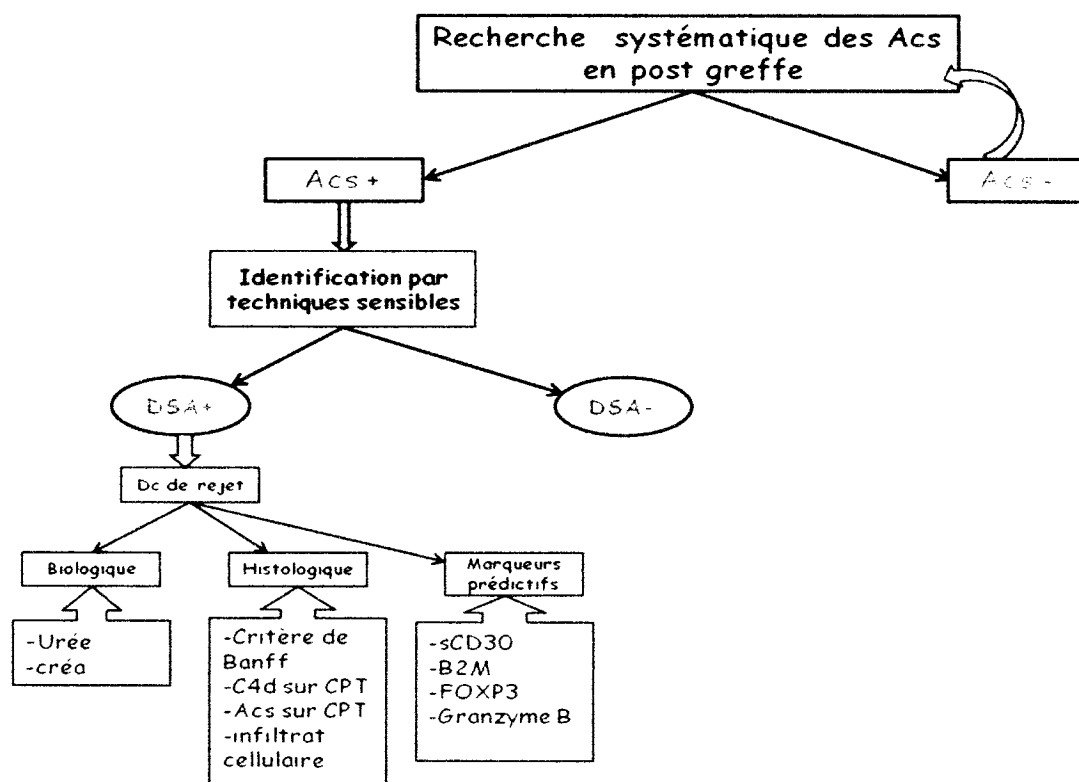
De tels marqueurs sont nécessaires, non seulement pour connaître un état de tolérance chez les patients prenant un traitement immunosuppresseur, mais également pour estimer le degré de réponse d'un patient à un traitement, prédire la dégradation d'un transplant avant les premiers signes fonctionnels, déjà trop tardif(124). Parmi ces marqueurs :

-Le dosage de CD30 dans le sérum par ELISA, (c'est un marqueur des LT activés).(155)

La mesure de sCD30 est effectuée en pré et en post greffe et un niveau plus élevé, seul ou en association avec de forts taux d'Acs anti HLA de classe II est associé à une augmentation du risque de rejet.(156)

-La détection de Beta-2-microglobuline ( $\beta$ 2M) (157) : le taux de B2M est augmenté en cas de rejet aigu ou chronique, mais un taux inférieur à 3.7  $\mu$ g/ml ne signifie pas un risque de rejet.(158)

-la mesure du taux d'ARNm au niveau des urines pour le Granzyme B et FOXP3 est un bon marqueur prédictif du rejet cellulaire aigu et de son devenir (159 160), elle se fait par l'amplification de l'ARN m par PCR. (161)



**Figure 41** : schéma de suivi immunologique en post greffe

**NB :**

En plus de suivi immunologique, un protocole thérapeutique doit être mis en place obligatoirement pour chaque malade greffé, dont la nature, la dose, la durée de ce traitement est en fonction de l'état physiopathologique de chaque malade.

# Chapitre IV

## **Chapitre IV : Prise en charge thérapeutique**

Tout organe étranger implanté dans l'organisme est normalement rejeté sous l'influence des réponses immunitaires. Il est donc indispensable de supprimer ou atténuer la réaction du receveur à l'égard du greffon pour permettre sa survie en utilisant un traitement immunosuppresseur (IS).(97)

L'immunosuppression a pour but une meilleure acceptation de la greffe par le receveur, en utilisant des doses ni trop profondes provoquant la diminution de l'état immunitaire de transplanté, ni trop légères laissant se développer des phénomènes de rejet (162) tout en agissant à différentes étapes de: (voir tableau)

- ✓ migration et/ou l'activation des cellules dendritiques
- ✓ activation et la prolifération des lymphocytes par inhibition d'un ou plusieurs des quatre signaux d'activation.
- ✓ infiltration du greffon. (163)

Les schémas d'immunosuppression sont extrêmement divers selon les facteurs qui contribuent à majorer le risque immunologique des receveurs ainsi que les habitudes des équipes de transplantation.

Ces facteurs sont notamment le nombre d'incompatibilités HLA; le jeune âge du receveur; l'âge avancé du donneur; la présence d'anticorps anti-HLA préformés (PRA >0 %); et la présence d'anticorps spécifiques du donneur (DSA MFI >1000) (164)

Un traitement immunosuppresseur préventif et curatif indispensable chez tout patient transplanté. (97)

En fonction des résultats de la recherche des Acs le traitement en post greffe est préventif et /ou curatif :

### **I- Le traitement préventif de rejet :**

Le traitement immunosuppresseur de référence dans la prévention du rejet de greffe est constitué d'une trithérapie associant classiquement un inhibiteur de la calcineurine (ICN), un antimétabolite et des corticostéroïdes (CS) .(165) (Voir tableau **annex N°3**)

La conception du traitement immunosuppresseur préventif s'appuie sur l'association d'un traitement dit « d'induction » et d'un traitement dit « de maintenance » :

#### **I-a Traitement d'induction :**

Le traitement d'induction est censé diminuer l'incidence du rejet aigu dans les 3 mois qui suivent la transplantation.

En fonction du risque immunologique, ce traitement est soit absent, soit administré à dose élevée et est parfois combiné à l'administration d'un traitement biologique.

la phase d'induction au tout début de la transplantation (la première semaine de greffe) est basée sur des traitements biologiques, il s'agit d'anticorps polyclonaux anti-LyT (GAL) chez les patients à haut risque immunologique ou des anticorps monoclonaux anti-récepteur de l'IL-2 chez les patients à faible risque, puis une trithérapie chronique associant un ICN (ciclosporine, tacrolimus), un Antimétabolite inhibiteur de la synthèse des purines (Mycophénolate Mofétyl (MMF), azathioprine(AZT)) et les CS à dose rapidement dégressive.

Avec cette association thérapeutique, l'incidence du rejet aigu est devenue < 10 %, et la survie du greffon > 95 % à un an.(166)

Une trithérapie peut parfois être séquentielle, avec une introduction différée de la ciclosporine (entre le 5<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour post greffe) ou de l'AZT (entre le 30 et le 40<sup>ème</sup> jour post greffe), en vue de limiter les effets indésirables

NB :

- ✓ chez des patients à risques tels les hyperimmunisés, on peut utiliser les (IVIg) comme traitement adjuvant d'une quadrithérapie (4 cures d'IVIg administrées tous les 21 jours, la première cure étant débutée avant le déclampage du greffon) comportant un inhibiteur de la calcineurine, le mycophénolate mofétyl, les corticoïdes et une induction par anticorps anti-CD25 ou anticorps anti-lymphocyte polyclonal.(132)
- ✓ Chez les patients présentant un risque immunologique faible à modéré, le sirolimus (inhibiteur de m TOR « *target of rapamycin* ») peut remplacer l'antimétabolite dans la trithérapie.(167)

### **1-b Traitement d'entretien (de maintenance) :**

Le traitement de maintenance est nécessaire tout au long de la vie du greffon afin de limiter ou prévenir le développement du rejet chronique.(168)

Durant cette phase, la trithérapie est souvent maintenue mais à dose plus faible.

La période de maintenance commence à partir du 3<sup>ème</sup> mois de la greffe et elle est divisée en :

✓ ***Période de maintenance pré-adaptative de 3 à 6mois*** : Associe des doses pleines d'ICN (tacrolimus ou ciclosporine), et d'anti-prolifératifs (MMF ou AZT), à une dose quotidienne plus faible de CS.

Pendant cette période, les risques de survenue d'un rejet aigu cellulaire sont maximum (95 % des rejets aigus surviennent pendant les 6 premiers mois, à cette raison la surveillance d'apparition des Acs et des signes de rejet est renforcée). C'est aussi pendant cette période que le déficit de l'immunité cellulaire est le plus profond et que le risque de survenue d'infection à germes opportunistes est le plus important, ce qui nécessite un traitement préventif systématique. Avec les traitements IS actuels, l'incidence de survenue de rejet est diminuée au cours de la première année.

✓ **Période de maintenance post-adaptative après le 6eme mois** : Permettant généralement une minimisation de l'immunosuppression à long terme avec une réduction des doses d'ICN ou les substituer par les inhibiteurs de m-TOR et souvent un arrêt des CS de façon à réduire les effets néphrologiques de ces molécules.(164)

**NB** : La ciclosporine doit alors être progressivement supprimée sur une période de 4 à 8 semaines durant la phase d'entretien, pour limiter la toxicité cumulée avec le sirolimus (les patients à faible risque immunologique)

Chez les patients pour lesquels l'arrêt de la ciclosporine est un échec ou ne peut être envisagé, l'association de ciclosporine et de sirolimus ne doit pas être poursuivie au-delà de 3 mois après la transplantation.(167)

#### ➤ Nouvelles approches thérapeutiques :

Dans le but d'optimiser le traitement immunosuppresseur, des différentes options ont été proposé :

- La minimisation des doses d'ICN a distance de la transplantation, sont accompagnées soit du maintien inchangé du reste du traitement IS, soit de la majoration de l'un des deux autres IS (CS ou MMF), soit du remplacement de l'un des deux autres IS par un nouvel IS non néphrotoxique, soit enfin, de l'ajout d'un nouvel IS non néphrotoxique.
- Les stratégies de conversion des ICN pour un IS non néphrotoxique, conversion plus ou moins précoce après la transplantation et s'adressant a des patients considérés comme stables ou au contraire, présentant une détérioration de la fonction de leur greffon mise sur le compte de la néphrotoxicité des ICN.
- les stratégies de non introduction d'emblée des IC après la transplantation en utilisant a leur place des IS non néphrotoxique : lors du une quadrithérapie séquentielle on utilise les Cs, les anti métaboliques et les Ac poly clonaux (1-14jr) et les IC à partir de 14eme jours.(97)
- Les stratégies d'induction de tolérance visant à ne plus utiliser d'IS une fois passe la phase initiale de la transplantation (168) et à bloquer au moment de la transplantation les signaux de la costimulation par des anticorps monoclonaux (anti-CD40L) ou des protéines de fusion (CTLA4-Ig).(164)
- Actuellement, il est suggéré d'envisager l'arrêt des CS durant la première semaine après la transplantation lorsque le risque immunologique est faible; dans le cas où un inhibiteur de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) est employé, le groupe KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) recommande de ne l'administrer qu'une fois la fonction du greffon établie et les lésions chirurgicales cicatrisées.(169)

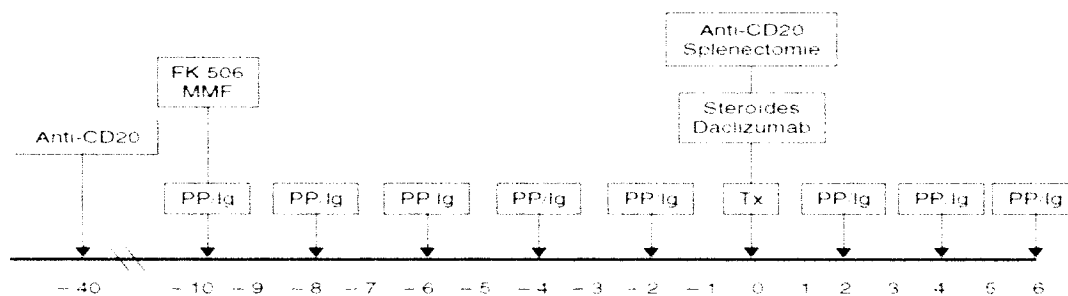
**Exp : protocole de John Hopkins des patients à haut risque immunologique en attente de greffe de rein a partir d'un donneur vivant:**

- Protocole échanges plasmatiques suivi de l'immunoglobuline polyvalente (IVIg) jusqu'à négativation du CxM poursuivi après la greffe:

- En moyenne 3 échange plasmatique EP (1-6) avant greffe
- En moyenne 3.8 EP (0-19) après greffe
- Immunosuppression: Daclizumab 5 doses, Tacrolimus, MMF, CS
- Résultats: Disparition des DSA.(170)

Le Succès de la désensibilisation est défini par :

- ✓ une diminution  $> 50\%$  des PRA.(171)
- ✓ Un cross match par LCT sur ly T négatif.
- ✓ Un cross match lyT FCXM  $< 250$  MFI.(172)



**Figure 42** : exemple de protocole de désensibilisation chez un patient à haut risque immunologique au John Hopkins Hospital (BAL TIMOR)

## II- Le Traitement curatif du rejet :

Malgré la mise en place d'un traitement préventif, une crise de rejet peut survenir. Dans ce cas le schéma thérapeutique mis en œuvre est en fonction de la gravité et de l'évolution du rejet. Le risque maximal se situe pendant la première année.

À l'heure actuelle, l'identification des différents types de rejet aigu a permis de modifier le schéma thérapeutique un peu trop simpliste.

✦ en cas de rejet aigu cellulaire avec une négativité du marqueur C4d sur les CPT et en l'absence d'AcS circulants dirigés contre le donneur, le traitement consiste toujours à administrer des stéroïdes à fortes doses par voie intraveineuse, relayés par de fortes doses orales pendant une période de quelques jours à quelques semaines.

En cas d'échec ou d'efficacité insuffisante, le rejet aigu est considéré comme « cortico-résistant » et les GAL sont utilisés. Ce traitement est relativement bien codifié.(168)

✦ en cas de rejet aigu humoral avec une positivité du marqueur C4d sur les CPT (173) et la présence de DSA, le traitement est moins bien codifié.

Le traitement associe à des titres divers, des CS à fortes doses mais également des EP destinés à épurer ces AcS délétères, des IVIg aux mécanismes d'actions multiples et des anticorps anti-CD20.(174)

✦ En cas de rejet chronique on utilise de forte dose de Tacrolimus et MMF.(106)

Mais la réalité est encore plus complexe dans la mesure où les caractéristiques cliniques des rejets ne sont pas toujours aussi caricaturales et que des formes cellulaires et humorales peuvent être associées. (175)

Les schémas thérapeutiques de rejet aigu sont variables selon les équipes. Il comprend dans la plupart d'entre elles un renforcement de la corticothérapie, associé à une augmentation de la corticothérapie pendant au moins un mois et en association aux globulines anti-lymphocytaires, soit polyclonales, soit monoclonales (durant 8 à 10 jr )

Ce schémas permet dans 90% des cas d'obtenir en quelques jours une amélioration de la fonction rénale.(176)

### **La désensibilisation**

Plusieurs protocoles ont été utilisés pour le traitement de rejet avec DSA+, les approches les plus courantes pour traiter le rejet aigu humoral sont :

- ✓ Les plasmaphèreses répétées.(177)
- ✓ les immunoglobulines intraveineuses (IVIg) a dose élevée. (178)

Ce dernier est utilisé chez certains patients dont l'état général semble difficilement compatible avec un traitement par anticorps antilymphocytes. Lorsque il s'agit de rejets cortico-résistants.(179-180)

- ✓ Le rituximab a également été couramment utilisé (181). il est prescrit en association avec les échanges plasmatiques et les immunoglobulines intra-veineuses

### **NB :**

Les inhibiteurs du protéasome (bortézomib) et les inhibiteurs de la fraction terminale du complément (l'écilizumab ) sont des nouvelles thérapies qui visent à diminuer le taux de DSA.(182)



	Classification	Molécules	Mode d'action	Effets indésirables	
Traitement préventif	Inhibiteurs de 1 <sup>er</sup> signal d'activation lymphocytaire = inhibiteurs de calcineurines	Ciclosporine Neoral	Bloque la synthèse des cytokines (IL2, IL3, IL4, INFα, TNF α, GM-CSF)	-Néphrotoxicité -HTA -diabète -Dyslipidémie <sup>182</sup>	
		Tacrolimus FK650, prograf	En inhibant l'activation des facteurs de transcription (NFAT) <sup>183</sup> <b>Fig : 43</b>		
	Inhibiteurs de 2 <sup>eme</sup> signal de costimulation	Corticostéroïdes		Réduction de l'inflammation par inhibition de la sécrétion de cytokines en inhibant la fixation nucléaire des facteurs de transcription AP-1 et NF-kB <sup>185</sup>	-l'atrophie musculaire -ostéoporose -diabète -dyslipidémie, -HTA, ..... <sup>186</sup>
		Inhibiteurs de 3 <sup>eme</sup> signal d'action de cytokines	Anticorps anti-récepteur de l'interleukine-2 (basiliximab, daclizumab)	inhibant la fixation de l'IL2 sur son récepteur (sous unité α de RIL2) exprimé sur les lymphocytes T activés, inhibe la prolifération des Ly T <sup>187</sup> <b>Fig 44</b>	-réactions anaphylactiques -Mieux tolérés <sup>188</sup>
	Inhibiteurs de mTOR sirolimus, l'évérolimus		En diminuant la prolifération des Ly induite par les cytokines telles que l'IL2, l'IL3, l'IL4 ou l'IL6 <sup>189</sup>	-néphrotoxicité moindre que ICN -tubulotoxique Anémie... <sup>190</sup>	
	Inhibiteurs de 4 <sup>eme</sup> Signal de synthèse d'acides nucléiques ou antiprolifératifs	Le Mycophénolate Mofetyl (MMF) Celcept	C'est un Inhibiteur réversible, spécifique et non compétitif de l'IMPDH, il bloque la voie de synthèse de novo des bases puriques (guanine) en inhibant la prolifération des Ly <sup>191</sup> <b>Fig 45</b>	-anémie -leucopénie -lymphome -tumeurs malignes cutanées... <sup>192</sup>	
anticorps poly-clonaux anti-lymphocytes	La thymoglobuline GAL	Ils sont dirigés contre les lymphocytes humains en particulier les lymphocytes T <sup>162</sup>	-Réactions allergiques et anaphylactique -thrombopénie maladie sérique <sup>188</sup>		
Traitement d'entretien	Inhibiteurs de 1 <sup>er</sup> signal d'activation lymphocytaire	Ciclosporine	//		
		Tacrolimus	//		
	Inhibiteurs de 2 <sup>eme</sup> signal de costimulation	Corticostéroïdes	//		
		anticorps monoclonaux MRI	AC anti-ligand de CD40 bloquent l'interaction CD40-CD40L <sup>163</sup>	Non Rapportés	
	protéines de fusion (belatacept, l'abatacept)	bloquent la liaison entre les molécules B7 (CD80, CD86) et CD28 <sup>193</sup> <b>Fig 46</b>	Non Rapportés		
Inhibiteurs de 3 <sup>eme</sup> signal d'action de cytokines	Inhibiteurs de mTOR	//			
Inhibiteurs de 4 <sup>eme</sup> Signal de synthèse d'acides nucléiques	MMF	//			

		L'azathioprine	Un inhibiteur des bases puriques. analogue des bases purines, il altère la synthèse de l'ADN des lymphocytes <sup>194</sup>	-leucopénie -anémie, -thrombopénie -hépatite -MDeuse <sup>195</sup>	
TRAITEMENT CURATIF	Inhibiteurs de 2eme signal de costimulation	Corticostéroïdes	//		
	les anticorps monoclonaux	Muromonab (OKT3)	Elimination des Ly T par liaison au CD3 et par stimulation de la phagocytose ou de la lyse par le complément <sup>196</sup>	-lymphopénie modérée - syndrome de détresse respiratoire aiguë <sup>163</sup>	
	ICN	tacrolimus.	//		
	Inhibiteurs de 3eme signal	MMF	//		
	La désensibilisation	Plasmaphèreses		purification sanguine extra corporelle. repose sur des échanges plasmatiques destinés à épurer les anticorps anti HLA délétères <sup>160</sup>	-Hypotension -frisson -fièvre...
		Immunoabsorption		consiste à adsorber les anticorps anti-HLA sur une colonne de protéine A staphylococcique <sup>133</sup>	-Reaction allergiques -nausées -vomissement
		les IVIg		agir soit par l'intermédiaire du fragment F(ab')2 des IgG, soit par le fragment Fc qui fixe le complément (molécule C1q) <sup>132</sup>	
		Rituximab =anti CD20		il entraîne une déplétion massive des lymphocytes B, ce qui conduit à une élimination rapide des cellules B du sang et des tissus <sup>197</sup>	-frisson -céphalés -malaise -hypotension <sup>198</sup>
		Inhibiteur Du Protéasome ( bortézomib)		entraîne l'apoptose des plasmocytes normaux, ce qui diminue la synthèse d'allo-anticorps <sup>199</sup>	Non Rapporté
		Inhibition De La Fraction Terminale Du Complément ( éculizumab)		En se liant au C5 avec une haute affinité et inhibe ainsi l'activation de la voie terminale du complément <sup>182</sup>	Non R apporté

**Tableau** : Classification des traitements de rejet.

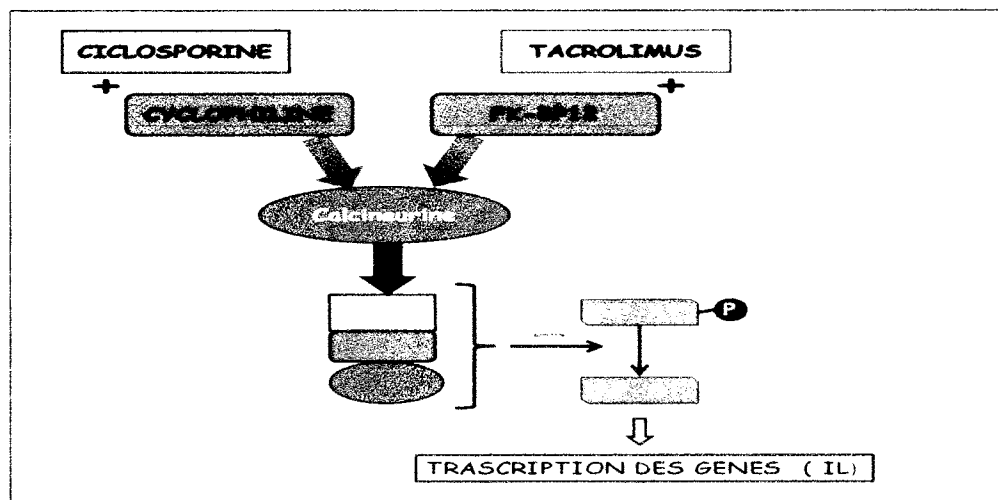


Figure 43 : schéma représentatif de mode d'action des inhibiteurs de calcineurine

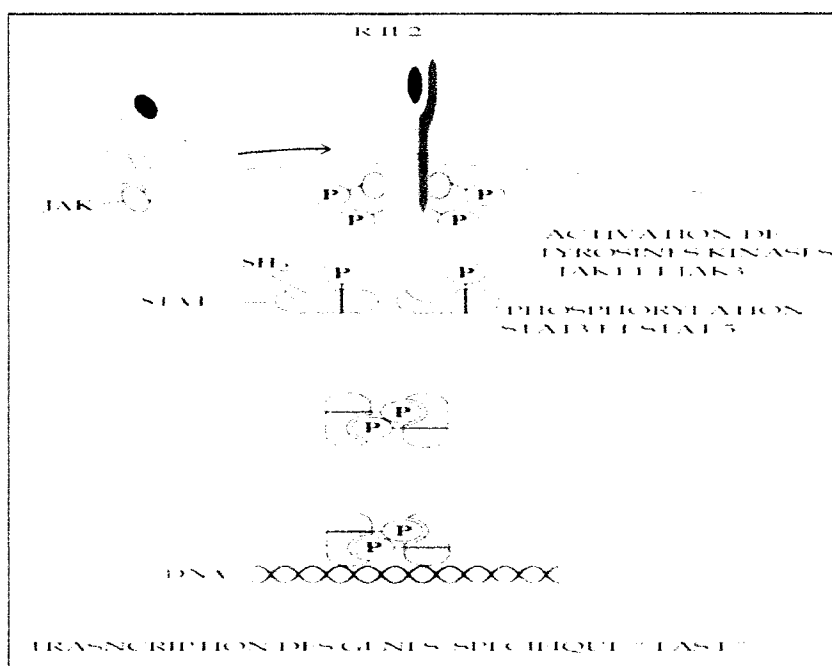
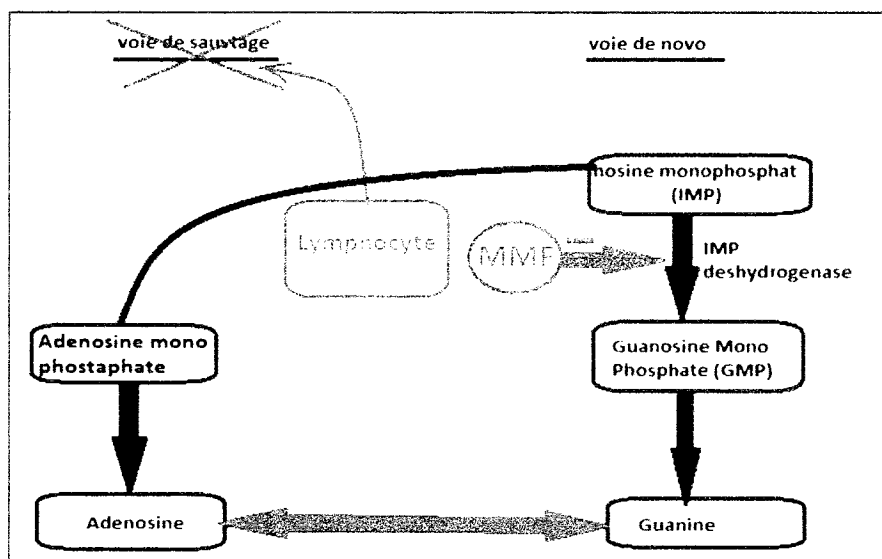
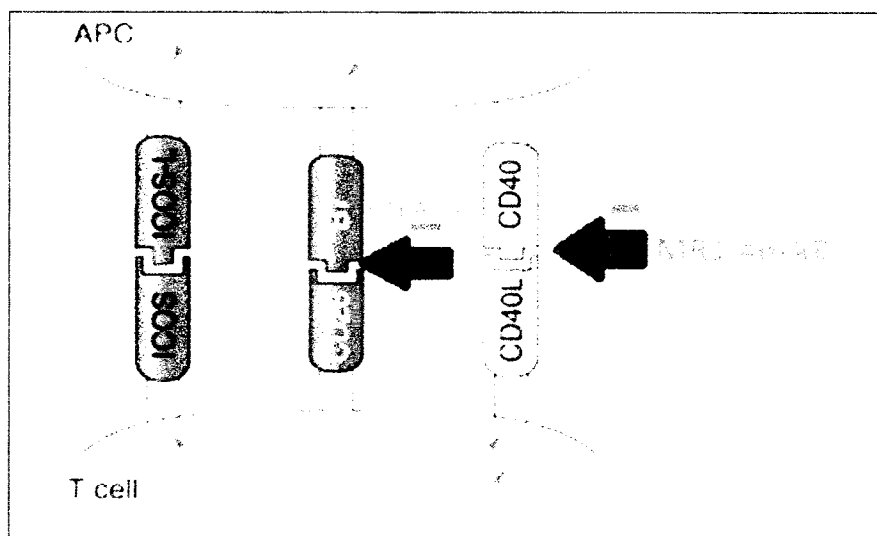


Figure 44 : schéma représentatif de mode d'action des Acs anti récepteur de l'IL2



**Figure 45** : représentation schématique du mécanisme d'action de l'MMF



**Figure 46** : représentation schématique du mécanisme d'action des protéines de fusion et des AC monoclonaux

# Partie Pratique

# Matériel et méthodes

## Partie pratique :

### Matériel et méthode :

#### I-Matériel :

##### I-1 Matériel biologique :

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

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée sur **359** patients insuffisants rénaux stade terminale hémodialysés transplantés ou en attente d'une transplantation, recrutés pendant 6 ans allant de **janvier 2006 à Décembre 2012**.

##### I-2 Matériel non biologique :

Il représente l'ensemble de matériels que nous avons utilisé au laboratoire : (**Annexe 3**)

- **Verreries** : tubes ACD, tubes secs, tubes coniques, cellules Malassez, plaque de Terasaki lames et lamelles...

- **Appareillages pour typage HLA**: Thermoblok, Vortex, micro-centrifugeuse, centrifugeuse, Extracteur d'ADN automatisé BIOROBOT, Cuve de migration, générateur thermocycleur, Transilluminateur 200, geldoc, voltmètre, logiciel de lecture de microplaque, microscope à fluorescence inversé.

- **Appareillage pour ELISA** : Lecture ELISA à micro plaque.

- **Réactifs** (kits utilisés : One LAMBDA, LAT<sup>™</sup> Mixed, kit Quiagen DNA Blood, Micro-SSP DNA typing Tray....)

- Ainsi que **les dossiers des malades** : composés d'une fiche de renseignements sur laquelle sont mentionnées des informations relatives à chaque couple D/R, Une fiche de sérothèque, une pour le typage HLA du couple D /R, et une fiche de résultats de la recherche et d'identification des Ac. (**Annexe 4**)

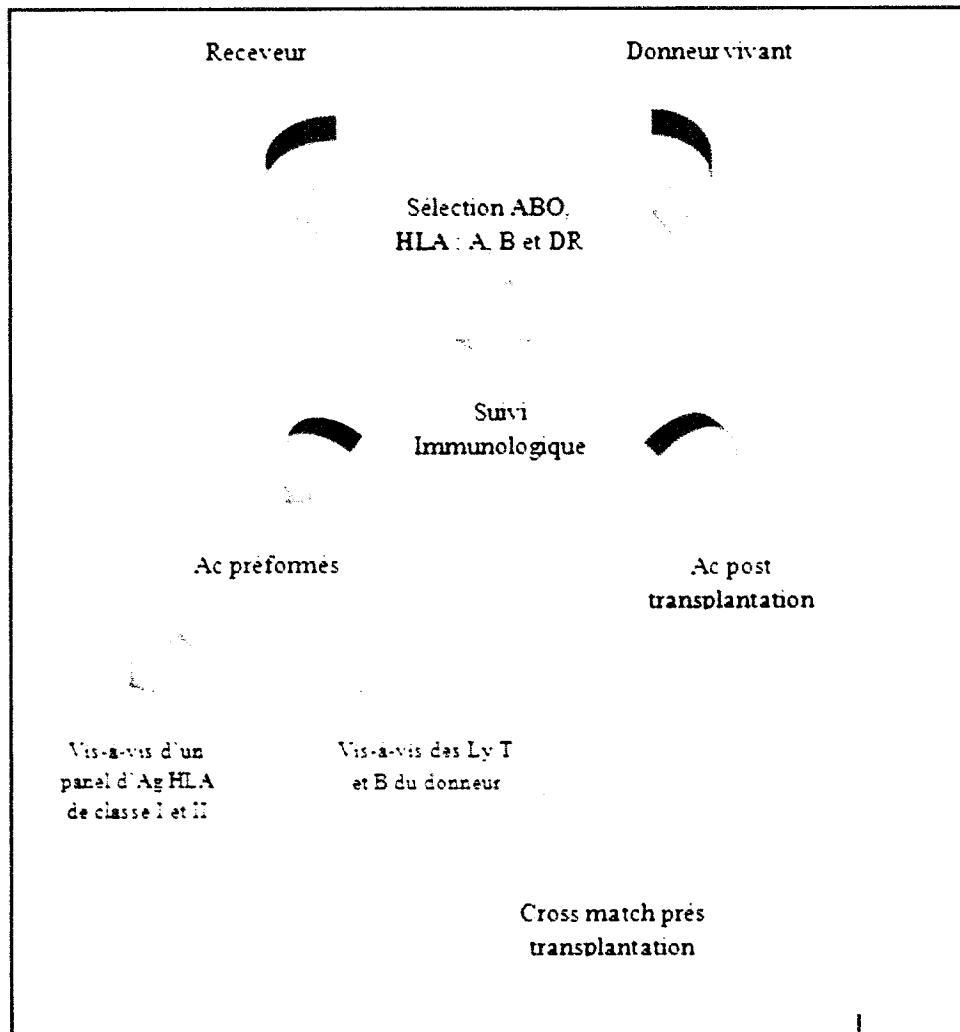
Ces informations sont également portées sur un support informatisé afin de créer une source de données facilement consultable.

Les informations représentées dans un fichier sous forme d'Excel sont : nom, prénom, sexe, âge, date de 1<sup>er</sup> prélèvement, date de l'insuffisance rénale, date de 1<sup>er</sup> dialyse,... etc. et toute autre information semble être nécessaire pour le suivi de ces malades (**Annexe 4**)

Les études statistiques ont été effectuées grâce à **un logiciel** « Excel », et les études comparatives ont été réalisées par le logiciel « Compare ».

## II- Méthode :

Les malades recrutés dans notre échantillon ont bénéficié d'une épreuve de groupage ABO où la compatibilité a été exigée entre chaque couple D/R, ils sont envoyés au niveau de l'unité d'immunologie de Hassiba Ben Bouali pour compléter les autres tests immunologiques nécessaires pour une greffe ultérieure:



**Figure 47 :** Diagramme des tests d'histocompatibilités effectués au niveau de l'unité de Hassiba Ben Bouali.

### II-1 Prélèvement :

On prélève du sang veineux où on a besoin de :

- 2 tubes pour le receveur l'un avec anticoagulant : ACD (V=8,5ml) → pour le typage HLA et le CXM. L'autre tube sec (V=5ml) → pour la recherche des Ac anti HLA.
- 1 seul tube pour le donneur sur ACD (V=8,5ml) → pour le typage HLA, et le CXM.





A-Prélèvement sur tube ACD.

B-Prélèvement sur tube sec.

**Figure 48:** Les prélèvements réalisés pour les différents tests immunologiques.**II-2 Etude de polymorphisme HLA :**

L'étude du polymorphisme HLA s'effectue principalement par deux types de techniques :

- Les techniques sérologiques qui permettent de définir les Ag HLA.
- Les techniques de biologie moléculaire qui permettent d'étudier les gènes.

**II-2-1 Techniques sérologique :**

La détermination des Ag HLA de classe I (A, B) et de classe II (DR) se fait par réaction de microlymphocytotoxicité (LCT).

**II-2-1-1 : Principe de la réaction de microlymphocytotoxicité (LCT) :**

Il s'agit d'une technique en deux temps dérivée de celle de Terasaki et qui consiste à incuber les LY du sujet à typer, préalablement isolés, avec des sérums tests en présence de complément de lapin utilisé en excès. Si les Ly sont porteurs de l'Ag correspondant au sérum utilisé, il se produit une altération de la membrane cellulaire entraînant une lyse qui peut être révélée par un colorant vital ou fluorescent (bleu Trypan, éosine, Fluoroquench)

**II-2-1-1-A : Ac utilisés :**

Les Ac utilisés sont des Ac anti HLA de classe I et II qui sont de deux sortes :

- Des alloantisérums : ils proviennent de femmes multipares +++, de polytransfusés, ou d'immunisés volontaires. Les antisérums anti-classe I nécessitent une élimination des Ac anti classe II par adsorption sur plaquettes (DR-et AB+) → kit AB 72, DR72.
- Des Ac monoclonaux → kit LM144.

**II-2-1-1-B : Cibles utilisées :**

- Les Ly totaux du sang périphérique → Typage HLA classe I (ABC).
- Ly B périphériques → Typage HLA classe II (DR, DQ).

**II-2-1-2 Technique de séparation des Ly :**

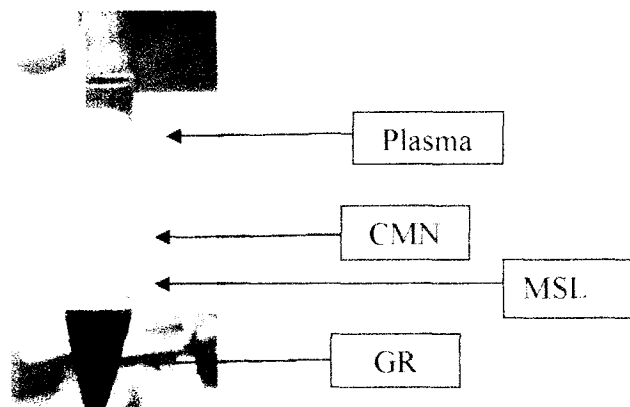
Les tests immunologiques effectués dans ce contexte nécessitent des populations de lymphocytes purifiées, plusieurs techniques sont utilisées pour séparer les LY et les sous population lymphocytaire :

**II-2-1-2-A : Séparation des Ly totaux (T+B) :****→ Principe :**

La séparation en gradient de Ficoll Isopaque de densité (1,077) est basée sur la différence de densité existante entre les LY et les autres cellules plus denses tels que les érythrocytes et les polynucléaires. L'anneau de Ly est obtenu après centrifugation à grande vitesse pendant une courte durée de temps.

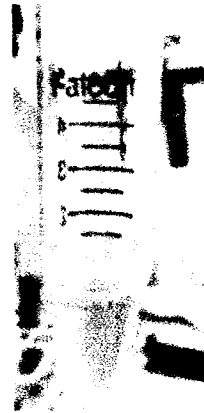
**→ Mode opératoire : (Annexe 6)**

- Diluer le sang total (un volume de 8,5 à 10 ml) au ½ en ajoutant de l'eau physiologique ou un tampon PBS à pH = 7,2.
- Déposer doucement à la surface du MSL (1/3 MSL pour 2/3 sang dilué), dans un tube à fond conique, en plastique.
- Centrifuger le tube 20 min à 1800t / mn à 25°C.



**Figure 49:** Le résultat de séparation par technique de Ficoll.

- Récupérer la couche de l'anneau lymphocytaire à l'interface entre le plasma et le mélange MSL.
- 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/mn pendant 10mn.
- Resuspendre le culot de Ly on ajoutant ≈500µl de solution nutritif de Hanks c'est la solution mère de travail. (fig.50)



**Figure 50:** La solution mère de travail.

- Enumérer au 1/2 au Lasarus sur cellules de Malassez. Le nombre de cellules en millions /ml, est obtenu en appliquant la formules suivante :

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

\*N= nombre de cellules par champ



A- Dépôt de mélange Lasarus/ solution mère sur cellules Malassez.

B- Lecture sur microscope optique G,40.

**Figure 51:** Enumération sur cellule de Malassez.

-Vérifier la variabilité des Ly et ajuster la suspension à 2000-2500 cellules / $\mu$ l soit par une dilution (on ajoutant de solution de Hanks) soit par une concentration selon le nombre des lymphocytes, c'est la solution fille de travail.

**La suspension des Ly totaux est ainsi prête à l'emploi pour le typage HLA classe I (A, B,) et le cross match.**

#### **II-2-1-2-B Séparation des Ly B :**

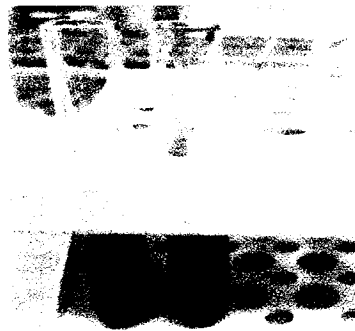
Pour le typage HLA DR, l'enrichissement en LY B est obligatoire et peut se faire par la séparation à l'aide de bille immunomagnétiques :

**→Principe :**

Les billes immunomagnétiques sont des particules paramagnétiques couplées à des Ac monoclonaux anti CD 19 (Fluorobeads B) permettant l'isolement rapide et spécifique des Ly B CD19+ à partir de sang total prélevé sur anti coagulant selon le protocole suivant :

**→Mode opératoire : (Annexe 7)**

- Diluer le sang prélevé à partir du sang total (V= 8,5ml) avec anti coagulant au ½ dans de l'eau physiologique et mélanger délicatement.



**Figure 52:** Le prélèvement de sang total sur ACD diluée avec de l'eau physiologique.

- Resuspendre très soigneusement les Fluorobeads avant l'emploi, et agiter environ 10 secondes.
- Ajouter 100µl d'Ac monoclonaux anti CD 19 liés à des billes immunomagnétiques avec 2ml de sang préalablement dilué et boucher immédiatement le tube.
- Agiter doucement le tube 3 min à 20-25°C pour permettre aux billes de fixer les cellules B, par retournement à la main.
- Déboucher et placer le tube sur un aimant pendant 2min.
- Eliminer le surnageant à l'aide d'une pipette, puis retirer le tube de l'aimant.
- Laver les LY B dans (2ml) de solution de lavage.
- Resuspendre doucement et replacer le tube sur l'aimant pour 1 min.
- Eliminer le surnageant et répéter l'étape de lavage 2fois.
- Resuspendre le culot lymphocytaire dans 100µl de solution nutritive de Hanks c'est la solution mère.
- Procéder à l'estimation en déposant par ordre 1µl, 2µl, et 3 µl de la solution mère dans les puits de la plaque de Terasaki en rajoutant 5µl de colorant (Fluoroquenck) dans chaque puits. Et faire une estimation du nombre de Ly au microscope à fluorescence inversé (G,40) afin de choisir le volume adéquat de la solution mère à utiliser.

**Remarque :**

- Les Ly T peuvent être purifiés par la même technique, en utilisant des Fluorobeads-T de diamètre inférieur à  $1\mu$  couplés à des Ac monoclonaux anti CD2.
- Les Ly B peuvent être purifiées par la même technique décrite ci-dessus, à partir de la suspension de LY totaux.

**II-2-1-3 Typage HLA par technique de LCT : (Annexe 8)****II-2-1-3 –A : Préparation des plaques de Terasaki :**

Les plaques utilisées sont à l'état lyophilisées en les rajoutant :

- 1 $\mu$ l de l'eau physiologique.
- 1 goutte d'huile de paraffine.

Ils sont donc prêt à l'emploi.

**II-2-1-3-B : Pour le typage HLA**

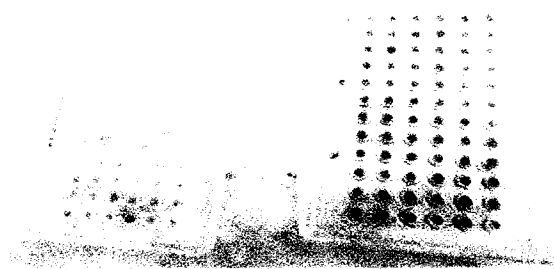
- Distribuer 1 $\mu$ l de la solution fille (suspension lymphocytaire) dans les plaques de Terasaki prêt à l'emploi par une seringue Hamilton → typage HLA (A, B).

-Mettre le volume adéquat de la suspension lymphocytaire B dans des plaques de Terasaki pré à l'emploi → typage HLA (DR, DQ).

-Ajouter 3  $\mu$ l de complément de lapin.

-Incuber pendant 1heure à +22°C. (fig.55)

-Ajouter 3  $\mu$ l de solution de Fluoroquench.



**Figure 53** : Les plaques de Terasaki après incubation.

**II-2-1-3-C : Lecture :**


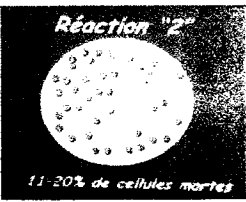
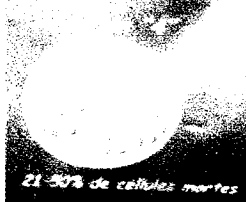
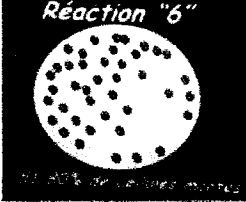

→ Après coloration à l'acridine orange /Bromure d'éthidium : (Fluoroquench)

Cette coloration peut remplacer le bleu Trypan ou l'éosine dans le cas d'un typage HLA classe I, elle est la seule à pouvoir être utilisée pour le typage HLA classe II effectué après séparation sur billes magnétiques. La lecture des plaques se fait comme suit :

➤ La réaction positive montre des cellules mortes fluorescentes colorées en rouge. Le Bromure d'Ethidium ne traverse pas la membrane des cellules intactes, il se lie au DNA des cellules mortes et émet une fluorescence rouge à 608nm.

➤ La réaction négative montre des cellules vivantes fluorescentes colorées en vert. L'acridine orange traverse la membrane des cellules intactes, se lie au DNA des cellules vivantes et émet une fluorescence verte à 535 nm après une excitation à 440 nm.

➤ 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 mortes (%)	Résultats	Observation au microscope à fluorescence
1	0-10	Négatif	 <p>Réaction "1" 0-10% de cellules mortes</p>
2	11-20	Douteux négatif	 <p>Réaction "2" 11-20% de cellules mortes</p>
4	21-50	Positif faible	 <p>Réaction "4" 21-50% de cellules mortes</p>
6	51-80	Positif	 <p>Réaction "6" 51-80% de cellules mortes</p>
8	81-100	Très positif	 <p>Réaction "8" 81-100% de cellules mortes</p>
0		Interprétable	

**Tableau:** Score selon l'échelle standard ASHI.

**II-2-1-3-D : Interprétation des résultats (Voir exemple en annexe 9) :**

L'interprétation du phénotype HLA se fait grâce aux plans de batteries indiquant la localisation et la spécificité des sérums.

**II-2-2 Techniques de biologie moléculaire :**

L'étude du polymorphisme HLA peut se faire après amplification génique in vitro par l'ADN polymérase (PCR).

**II-2-2-1 La PCR :**

La "Polymérase Chain Réaction" PCR ou amplification génique par la "DNA polymérase", consiste en une amplification spécifique, se faisant sur un mode exponentiel, d'une partie de la matrice d'ADN bornée par deux amorces complémentaires des extrémités 3' de la séquence nucléotidique.

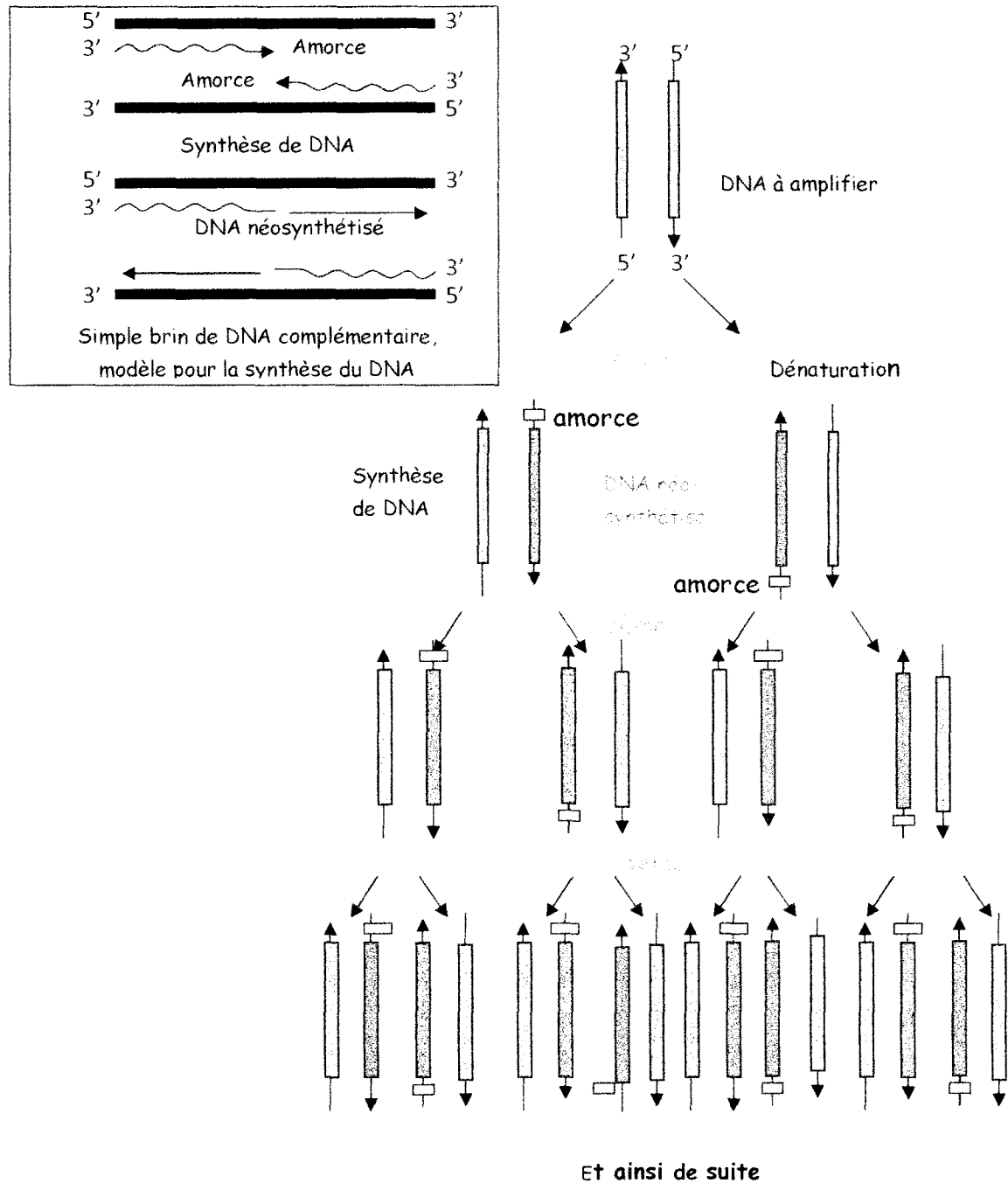
Les réactifs nécessaires pour réaliser la PCR sont :

- La matrice d'ADN
- Deux amorces oligonucléotidiques (Primers)
- Les quatre désoxynucléotides tri-phosphate (dNTP)
- La DNA – polymérase thermorésistante
- Un tampon salin adéquat contenant une concentration appropriée de  $MgCl_2$ .

Chaque réaction d'amplification comporte trois étapes se succédant précisément et nécessitant chacune une température différente : (Fig. 54)

- Etape de dénaturation : elle correspond au passage du DNA double brin au DNA simple brin par chauffage  $+94^{\circ}C$  pendant 30 secondes à 1min.
- Etape d'hybridation : elle s'effectue à une température variant de  $+45^{\circ}C$  à  $+70^{\circ}C$  pendant 30 secondes en fonction de la  $T_m$  des amorces oligonucléotidiques.
- Etape d'élongation : elle correspond à l'extension des amorces par incubation avec la DNA- polymérase, et les quatre désoxyribonucléotides- triphosphates, à  $+72^{\circ}C$  (température optimale de l'activité de l'enzyme) si bien qu'un nouveau brin de DNA peut être synthétisé.

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 54:** Amplification de l'ADN par DNA polymérase.

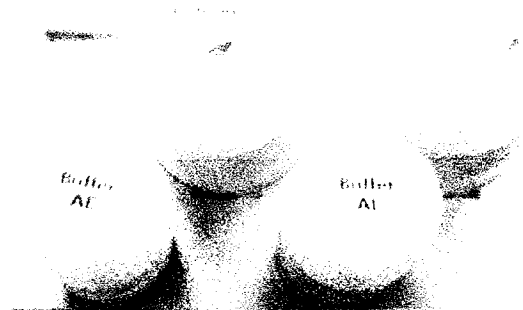


**II-2-2-2 : Extraction de l'ADN à partir du sang périphérique : (Annexe 10)**

Il existe plusieurs techniques d'extraction de l'ADN à partir du sang périphérique. La technique utilisée dans notre laboratoire est la technique de QUIAGEN :

**→ Les réactifs de Kit :**

- Buffer AL : prêt à l'emploi.
- AW1 : 44 ml on lui rajoute 25ml d'éthanol.
- AW2 : 43ml on lui rajoute 30 ml d'éthanol.
- Buffer AE : prêt à l'emploi.



**Figure 55:** réactifs du Kit de Quiagen.

**→ Mode opératoire : Technique QUIAGEN (KIT QI Aamp ® DNA Blood Mini Kit)**

-Centrifuger à 2000 T/ mn pendant 10mn à température ambiante un volume de 8,5 ml de sang total prélever sur un tube ACD. (Figure)

-Enlever, à l'aide d'une pipette pasteur, le Buffy-coat au maximum ( $V \approx 200\mu\text{l}$ ) jusqu'à obtenir un culot bien blanc.

- Mettre le volume de  $200\mu\text{l}$  de Buffy-coeat dans un Eppendorf et lui rajouter  $200\mu\text{l}$  de la solution AL et  $20\mu\text{l}$  de protéase sous forme liquide.

-Remettre en suspension, au Vortex pendant quelques secondes.

-Placer l'Eppendorf dans le thermoblok (pour la dénaturation de l'ADN) pendant 10mn.

-Ajouter  $200\mu\text{l}$  de l'éthanol, et agiter on plaçant l'Eppendorf dans le Vortex pendant quelques secondes.

-Transférer le contenu de l'Eppendorf dans une colonne de QUIAGEN.

-Centrifuger à 13000 tours pendant 1min.

-Jeter la poubelle de la colonne avec son contenu et la remplacer par une autre.

-Ajouter  $500\mu\text{l}$  de la solution AW1 (solution de lavage) et centrifuger la colonne à 13000 tours pendant 1mn.

-Jeter la poubelle de colonne et la remplacer par une autre.

-Ajouter  $500\mu\text{l}$  de la solution AW2 et centrifuger à 14000 tours pendant 3min.

-Transférer la colonne à filtre dans un Eppendorf et Ajouter  $200\mu\text{l}$  du tampon AE.

- laisser l'Eppendorf pendant 5min à une température ambiante.

-Centrifuger à 13000 tours pendant 1min.

Colonne  
QUIAGEN

- L'ADN est alors prêt pour le typage HLA, après mesure de la densité optique de l'ADN extrait.

-Diviser la quantité de l'ADN sur 2 Eppendorf comme suit :

- 50µl → pour le typage HLA de classe II.
- Le reste → pour le typage HLA de classe I.



**Figure 56:** L'ADN après extraction.

### **II-2-2-3 Typage HLA classe I Générique par PCR-SSP :**

#### **→ Le principe :**

C'est une méthode de typage par PCR basée sur la spécificité d'amorces plutôt que sur l'hybridation avec des oligosondes. Cette spécificité repose sur le fait que le dernier nucléotide en 3' de l'amorce doit obligatoirement s'hybrider sur le brin d'ADN complémentaire pour que l'amplification soit positive dans les conditions réactionnelles choisies.

Le typage est déterminé par conséquent par la présence ou l'absence du produit de PCR visualisé sur gel d'agarose.

Chaque typage comporte plusieurs réactions PCR réalisées dans des tubes contenant des Primers lyophilisés spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles ainsi qu'un contrôle interne qui valide la réaction PCR.

#### **→ Mode opératoire : (Protocole ONE LAMBDA)**

##### **a- Préparation de la plaque de Micro-SSP :**

-Sortir les plaques de typage et le D-Mix (tampon contenant du  $MgCl_2$  et les 4 dNTP) et les laisser prendre la température ambiante. La Taq polymérase n'est retirée du froid qu'au moment de l'utilisation.

-Prendre 5,6µl de Taq polymérase et le verser dans le D-Mix.

-Prendre 9  $\mu$ l de ce mélange (Taq/D-Mix) avec 1  $\mu$ l de tampon PCR et le mettre dans le puits H1 c'est le contrôle négatif.

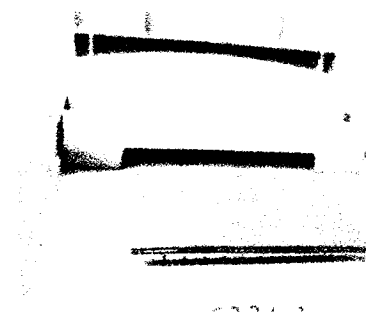
-Ajouter 111  $\mu$ l du DNA dans le mélange D-Mix/Taq et agiter au vortex.

-Répartir le mélange DNA/D-Mix/Taq à raison de 10  $\mu$ l dans tous les puits des plaques sauf dans les puits contrôle négatif.

#### b- Réalisation de la PCR :

-Bien fermer la plaque à l'aide de l'adhésif et la placer dans le thermocycleur type GeneAmp PCR system 9700.

-Poser dessus le tampon de pression et fermer le thermocycleur et lancer le programme de PCR (environ 1h16 min pour ONE LAMBDA).



**Figure 57:** Introduction de la plaque de Terasaki dans le thermocycleur.

#### c- Electrophorèse sur gel d'agarose :

- Préparation de gel :

-Prendre 1,25 g d'agarose en poudre et lui rajouté 50 ml de tampon tri borate EDTA.

-Placer le mélange dans la micro-onde pendant 3 à 4 min.

-Faire sortir le mélange de la micro-onde et lui rajouté quelques gouttes de bromure d'éthidium.

-Ecouler le mélange sur la plaque de migration et laisser refroidir quelques secondes.

-Placer les empreintes sur la plaque de migration pendant quelques minutes.

-Enlever les empreintes de la plaque et l'émerger par un tampon PCR qui permettra le passage de courant électrique entre l'anode et la cathode.

La plaque est alors prête à l'emploi.

- La migration sur gel :

-Le produit d'amplification est transféré dans les 96 puits de la plaque de migration par une pipette multi canaux.

-Couvrir la boîte à électrophorèse et brancher sur le générateur. La migration se fait à 140 volts pendant 4 min.

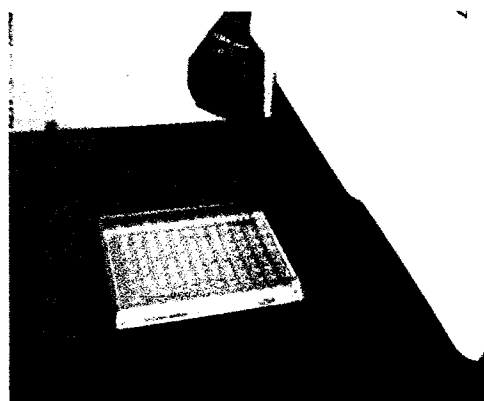


**Figure 58** : migration sur gel d'agarose.

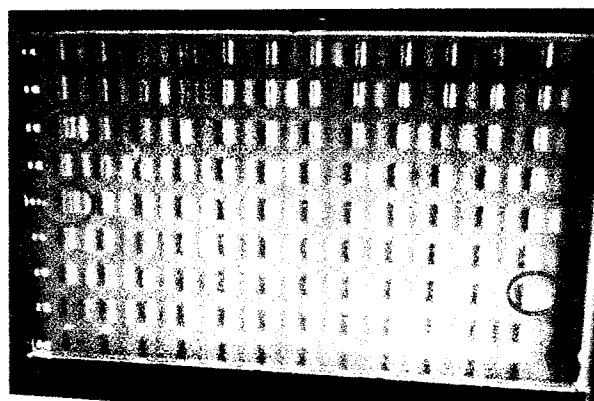
→ Lecture et interprétation :

La visualisation des bandes d'électrophorèse est réalisée par lecture sous UV Geldoc (fig. A) et l'interprétation des résultats (fig. 59.B) nécessite l'utilisation du logiciel et des planches fournies HLA Fusion dont :

- Le contrôle interne doit être présent dans tous les puits sauf le témoin négatif.
- Si un gène HLA a été amplifié, une bande de migration supérieure au témoin est visible.



**A** : Lecture de la plaque d'électrophorèse  
Par le Geldoc.



**B** : Interprétation.

**Figure 59** : Lecture et interprétation d'un résultat de typage par PCR SSP.

- Le contrôle interne peut être faible ou inexistant dans les puits positifs.
- Si le contrôle interne et /ou la bande positive sont vus dans le témoin négatif, la manipulation doit être refaite.

### **II-3 : Techniques de recherche des anticorps anti-HLA :**

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 suivie pré et post greffe.
- Au cours des événements immunisants (transfusion, grossesse, greffe).

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

#### **II-3-1 Recherche des anticorps anti HLA classe I et II d'isotype IgG par technique immunoenzymatique ELISA (ELISA LAT-M<sup>®</sup>): (voire annexe 11)**

##### **I-3-1-a : Principe :**

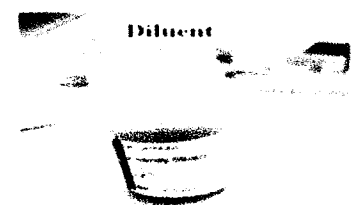
Le kit ELISA-LAT (Lambda Antigen Try) est réalisé pour la détection des anticorps de type IgG anti-HLA de classe I et II spécifique chez les receveurs. Il contient tous les réactifs nécessaires à la réalisation du test.

Les puits de plaques de Terasaki sont coatées avec des antigènes HLA purifiés sur colonnes d'affinité. La fixation spécifique des anticorps du sérum à tester avec le pool d'antigène est détectée, après incubation, avec un conjugué anti-IgG humaine couplé à la phosphate alcaline. La liaison du conjugué est révélée par un substrat spécifique de l'enzyme. Une mesure quantitative de la couleur bleue développée est effectuée par spectrophotométrie à 630 nm.

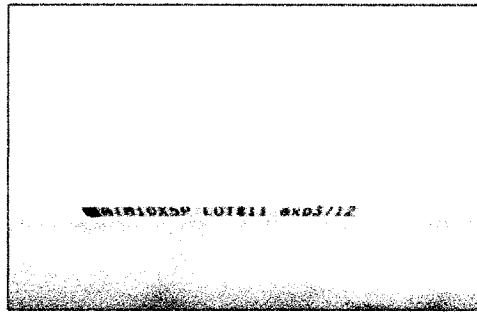
##### **II-3-1-b : Mode opératoire :**

Tous les réactifs sont fournis, certains doivent être reconstitués :

- Plaque de Terasaki
- Sérum contrôle 10x
- Eau distillée stérile
- Ig G antihumaine conjuguée à la phosphatase alcaline 100x
- Diluent pour anticorps 1x
- Tampon pour lavage 10x
- Substrat colorimétrique, composant A et B
- Solution d'arrêt 1x

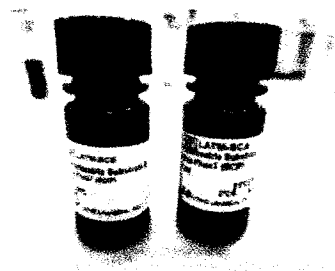


-Retirer les plaques de Terasaki (LAT) recouvertes d'antigènes HLA classe I ou II purifiés et lyophilisés.



-Distribuer :

- 10µl de diluant des anticorps dans les puits : 1: A-B, 2: C-D-E.
- 10µl de sérums de contrôles dilués au 1/10 dans le diluant des anticorps (8µl du serum contrôle+ 72µl de diluent) dans les puits (1: C-D-E-F-G-H).
- Et 10µl de chaque échantillon dilué au 1/2 dans le diluant des anticorps dans les différents puits. (on peut mettre 10 sérums dans une plaque).
- Couvrir la plaque et incuber 1 heure à température ambiante (+20°\_25°C).
- Vider les puits par retournement. Ne pas laisser sécher les puits.
- Distribuer 20µl de solution de lavage 10x diluée au 1/10 dans de l'eau dés-ionisée par puits ou remplir la plaque de solution.
- Mélanger doucement et vider les puits par retournement.
- Répéter une fois l'étape de lavage.
- Ajouter 10µl d'immun-sérum de souris anti-IgG humaine conjugué à la phosphatase alcaline dilué 1/100 avec le diluant des anticorps,(dans la rangée 1 et dans C,D,E du 2eme, et sur les sérums).
- Replacer le couvercle. Après une incubation de 40mn à 20-25°C vider les puits par retournement et faire deux lavages.
- Ajouter 10µl de substrat enzymatique BCIP après préparation par mélange d'un volume des solutions A et B (550µl de A + 550µl du B).



- Replacer le couvercle et incuber 15mn à 37°C et à l'obscurité.
- Distribuer 5µl de solution d'arrêt par puits.
- Lire les résultats immédiatement, à l'œil ou avec un lecteur ELISA adapté aux plaques de Terasaki à 630 nm.

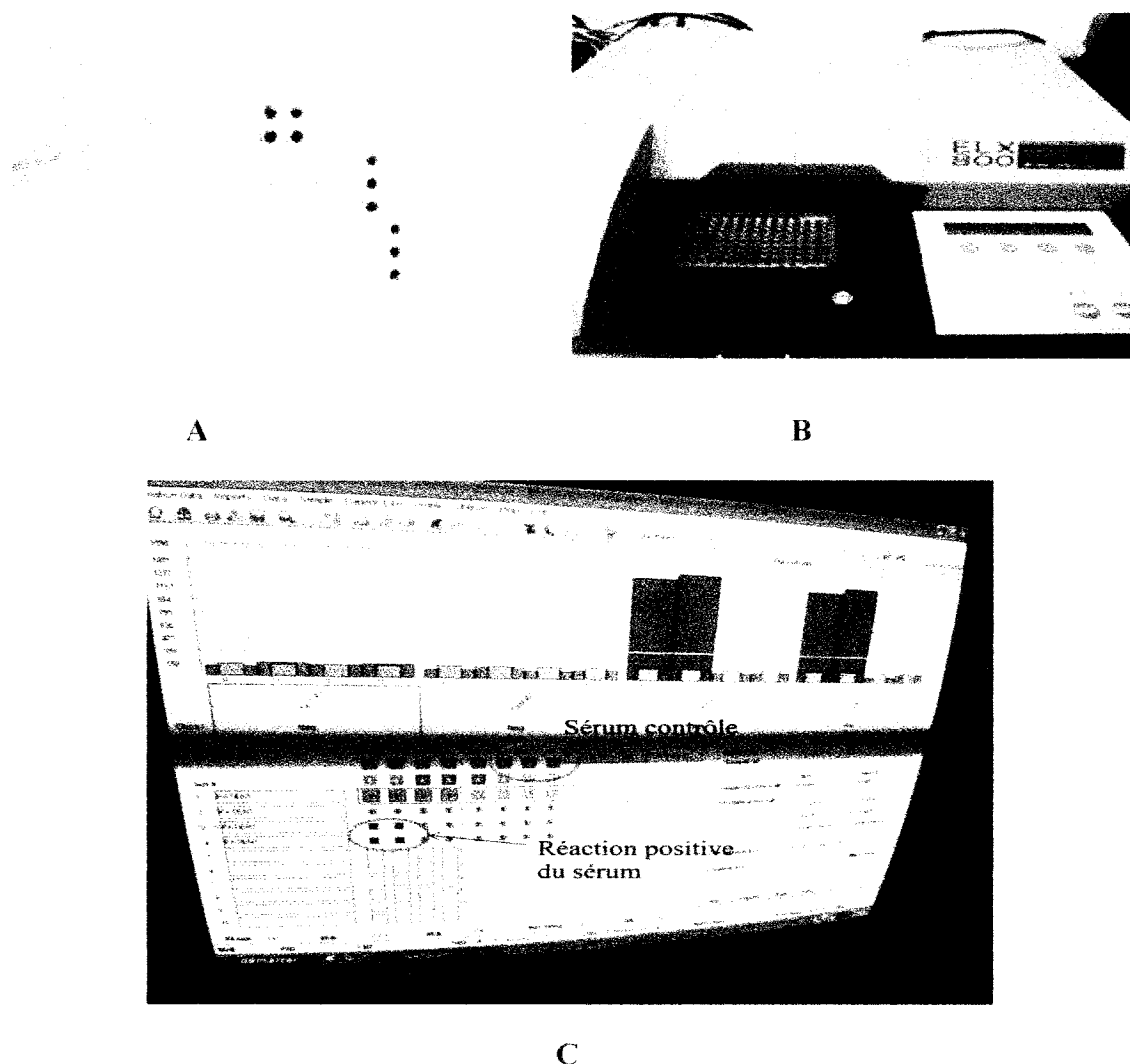
**II-3-1-c : Lecture des résultats et interprétation:**

Cette méthode permet la détection des Ac anti HLA.

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

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

- 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 C)
- Un résultat est négatif si les puits n'adoptent pas de couleur bleue, et dans le logiciel n'apparaissent pas en rouge.



**Figure 60:** Interprétation des résultats d'Elisa par le logiciel.

**II-3-1-d : Identification des Ac anti HLA et interprétation :**

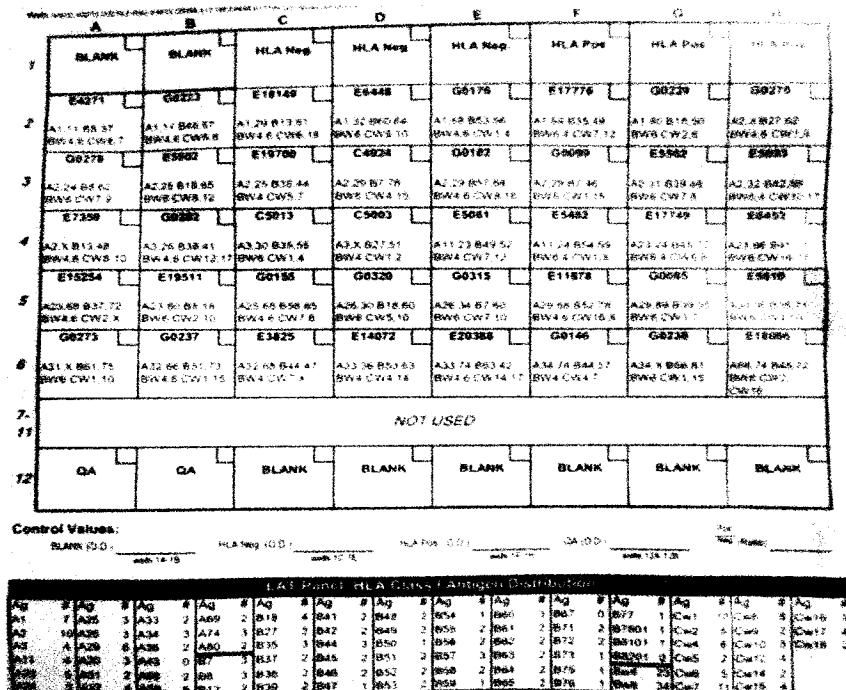
En cas de positivité de la détection des allo Ac anti HLA, une étape d'identification de leur spécificité est effectuée afin de voire si ces Ac peuvent être délétères pour le greffon quand ils sont spécifiques des antigènes HLA du donneur.

La méthode est réalisée de la même façon précédemment décrite au dessus, sauf que la dilution du sérum est de 1/3 sur des plaques de Terasaki.

On effectue cette recherche sur deux plaques, une pour HLA classe I, dont laquelle on peut mettre un seul sérum, et l'autre pour la classe II, dont on peut faire sur cette plaque 2 sérums.

Les figures 61 et 62 montrent les Ag contenus dans chaque puits.

Un exemple d'un résultat d'identification des Ac est donné en annexe.



**Figure 61** : Ag dans les puits pour l'interprétation des résultats d'identification des Ac anti classe I.



	A	B	C	D	E	F	G	H
1	NO ANTIGEN CONTROL TEST #1	NO ANTIGEN CONTROL TEST #1	HLA Neg	HLA Neg	HLA Neg	HLA Pos	HLA Pos	
2	E17776	E28339	E14862	F14872	G0972	F22237	E5818	G4924
3	DR1.4 DR53.X DQ5.X	DR1.16 DQA.X	DR1.7 DR53.X DQ2.5	DR1.13 DR52.X DQ2.6	DR1.13 DR52.X DQ2.4	DR1.13 DR53.X DQ2.6	DR2.11 DR11.X DQ2.5	DR1.17 DR51.X DQ2.4
4	C4815	G8257	G0150	G0138	E2934	C5012	G0192	E19511
5	DR4.7 DR53.X DQ2.6	DR4.9 DR53.X DQ2.6	DR4.12 DR52.53 DQ7.8	DR4.14 DR52.53 DQ5.8	DR4.16 DR51.53 DQ4.5	DR7.8 DR51.X DQ2.4	DR2.11 DR11.X DQ2.5	DR1.17 DR51.X DQ2.4
6	E11678	G8185	E3825	E5582	G8899	E5888	C3913	E15254
7	DR7.16 DR52.53 DQ2.4	DR8.9 DR53.X DQ2.7	DR8.11 DR52.X DQ7.X	DR8.12 DR52.X DQ4.9	DR8.10 DR53.X DQ5.9	DR9.12 DR52.53 DQ2.5	DR11.13 DR12.X DQ6.7	DR11.15 DR51.52 DQ6.7
8	C4825	G8198	C4813	C5008	G8878	C5083	G8183	C3887
9	DR12.16 DR51.52 DQ6.7	DR12.16 DR52.X DQ4.5	DR13.15 DR51.52 DQ5.6	DR13.17 DR52.X DQ2.6	DR13.16 DR52.X DQ4.7	DR14.16 DR51.52 DQ5.X	DR14.16 DR51.52 DQ7.X	DR14.17 DR52.X DQ2.5
10	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK
11	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK
12	QA	QA	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	NO ANTIGEN CONTROL TEST #2	NO ANTIGEN CONTROL TEST #2

Control Values: BLANK (DQ1) with 14.1E HLA Neg (DQ1) with 10.7E HLA Pos (DQ1) with 17.7E QA (DQ1) with 12.1E

Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#	Ag	#
DR1	5	DR7	6	DR10	3	DR13	8	DR15	5	DR17	4	DR51	8	DQ2	12
DR103	2	DR8	4	DR11	4	DR14	4	DR16	4	DR18	3	DR52	29	DQ4	6
DR4	5	DR9	4	DR12	5							DR53	14	DQ5	17
														DQ6	7
														DQ7	9
														DQ8	5
														DQ9	2

Figure 62 : Ag dans les puits pour l'interprétation des résultats d'identification des Ac anti Classe II

II-3-2 : Cross match par Lymphocytotoxicité : (voire annexe 12)

II-3-2-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 cytotoxiques anti-donneur pouvant conduire au rejet hyperaigu du greffon. Elle se fait principalement par microlymphocytotoxicité complément dépendante.

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

- Le CMI est effectué sur le premier sérum du receveur.
- Le CMF est demandé juste avant la greffe, il est réalisé à partir du sérum du jour et également sur d'autre sérum historique du malade

➤ Cibles utilisés:

Ce sont les lymphocytes totaux du donneur préparés extemporanément.

➤ Témoins :

- Positifs : il s'agit du sérum antilymphocytaire (SAL) et sérum d'un patient dialysé hyperimmunisé.

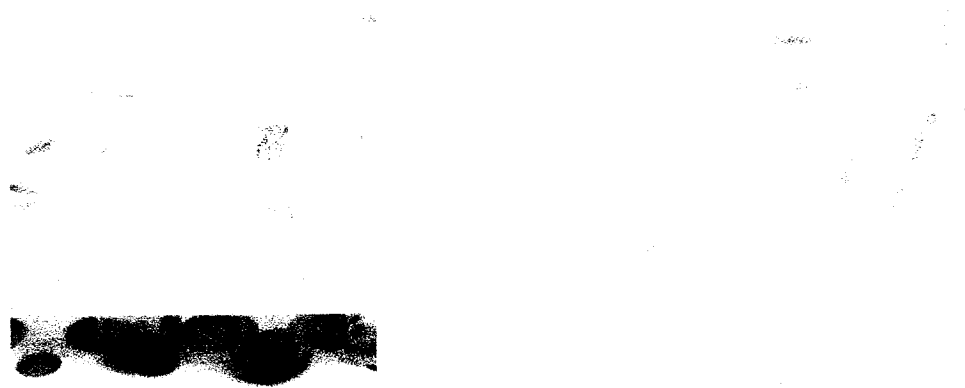
- Négatif : c'est du sérum AB décomplémenté, provenant d'un donneur de sang, non immunisé et sans anticorps lymphocytaires.

**Remarque :**

Un auto-cross match mettant en présence le sérum du receveur et ces cellules est souvent réalisé. La présence d'auto anticorps est confirmée par la positivité de la réaction de Lymphocytotoxicité avec les cellules autologues de l'individu.

**II-3-2-b : Mode opératoire :**

- Prélèvement du sang total du receveur et donneur sur ACD (anticoagulant).
- Dilution à  $\frac{1}{2}$  avec de l'eau physiologique.
- Séparation des lymphocytes totaux, des LT et LB à partir du sang du donneur par deux méthodes de séparation (sur Ficoll et par billes immunomagnétiques).



Les Ly B et Ly T séparés.

Les Ly totaux.

**Figure 63** : Les lymphocytes après leur séparation.

- Sur la plaque de Terasaki :

C'est une plaque qui est composée de 12 lignes numérotés de 1 → 12 et de 8 colonnes de

A → F

Figure 64



**Figure 64 :** Plaque de Terasaki avant son remplissage.

-Mettre de l'huile de paraffine dans tous les puits pour en éviter l'évaporation.

-Distribuer dans les puits A, B, C et dans les puits D, E, F respectivement 1µl, 2µl, 3µl du sérum.

On peut mettre plusieurs sérums sur la même plaque et aussi l'autocross match.

-Remplir les puits par les cellules séparées T et B et totaux (voire fig.65) avec un témoin positif et un autre négatif.

	A	B	C	D	E	F
1	T-B 1µl	T-B 2µl	T-B 3µl	T-B 1µl	T-B 2µl	T-B 3µl
2	T 1µl	T 2µl	T 3µl	B 1µl	B 2µl	B 3µl
3						
4						
5						
6						
7	T-B 1µl	T 1µl	B 3µl	T-B 2µl	T 2µl	B 1µl
8						
9	T-B 1µl	T-B 2µl	T-B 3µl	T-B 1µl	T-B 2µl	T-B 3µl
10	T 1µl	T 2µl	T 3µl	B 1µl	B 2µl	B 3µl
11	T-B 1µl	T-B 2µl	T-B 3µl	T-B 1µl	T-B 2µl	T-B 3µl
12	T 1µl	T 2µl	T 3µl	B 1µl	B 2µl	B 3µl

**Figure 65 :** Représentation schématique d'une plaque de Terasaki pour l'épreuve de CXM.

-Incubation pendant 30mn.

-Ajout du complément dans tous les puits.

- Incubation pendant 1H.
- Ajout du colorant « Fluoroquench » (5ml) par une seringue Hamilton dans chaque puits.
- Lecture à l'aide d'un microscope à fluorescence.

**N.B :**

On réalise deux plaques de Terasaki pour un malade afin de confirmer les résultats.

**H-3-2-c : Interprétation des résultats :**

La lecture des résultats se fait par un microscope à fluorescence inversé.

- 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 mortalité, dite de base, les sérums suivants doivent être lus en comparaison avec le sérum témoin négatif).
- Tout 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.

**Remarque :** afin d'éviter toute fausse positivité, distribuer toujours le témoin positif en dernier et avec une seringue différente.

# Résultats

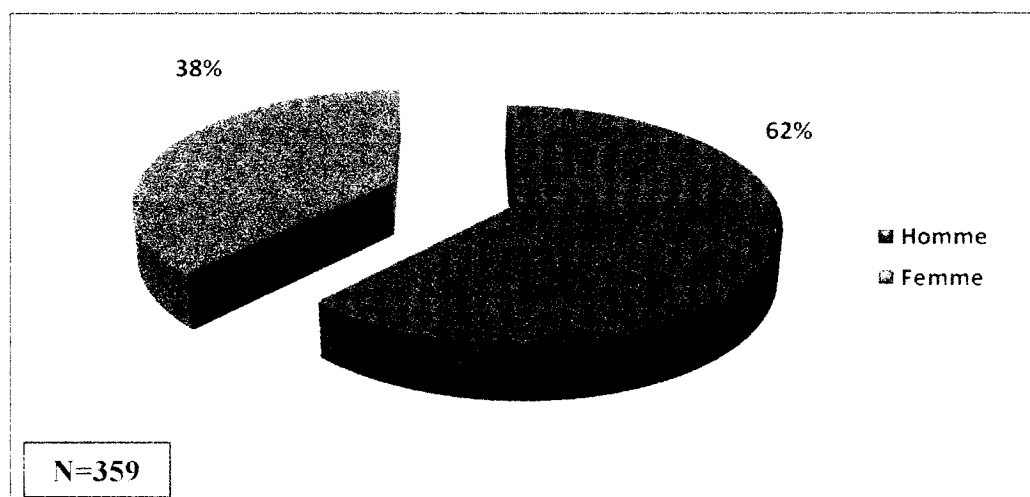
## RESULTATS :

Nous avons réalisé une étude rétrospective, à fin d'analyser les **359** dossiers des malades recrutés durant toute la période incluent dans notre échantillon.

### I- Résultats de suivi des malades avant la greffe :

#### 1) Répartition des malades selon le sexe:

Le sexe	Homme	Femme
Nombre des malades	222	137
Le pourcentage%	62%	38%

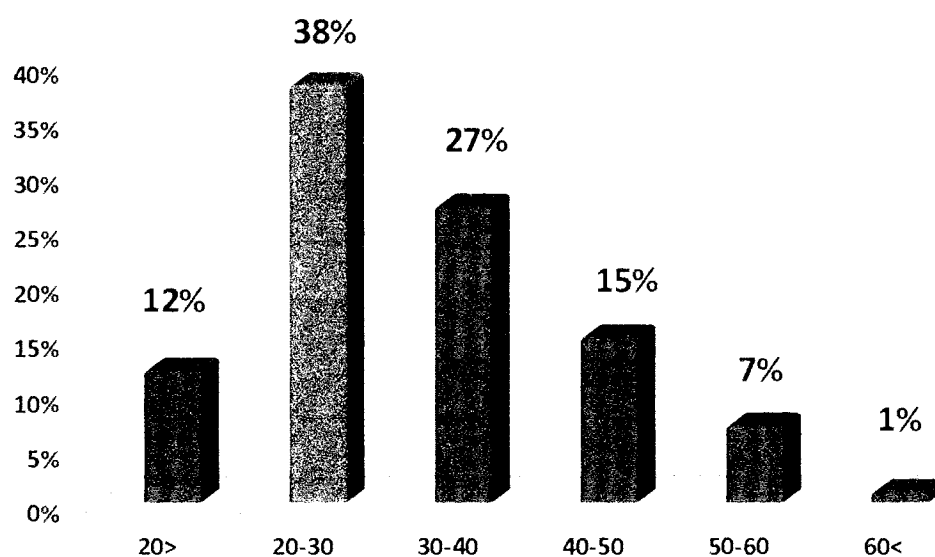


**Grappe 1:** Répartition des malades selon le sexe.

Dans notre échantillon, on remarque une prédominance masculine, dont **62%** des receveurs sont des hommes, alors que **38%** sont des femmes, avec un sexe ratio=**1,6**.

## 2) Répartition des malades selon l'âge et les tranches d'âge :

Age	<20	20-30	30-40	40-50	50-60	>60
nombre des malades	44	135	95	55	25	5
Le pourcentage	12%	38%	27%	15%	7%	1%

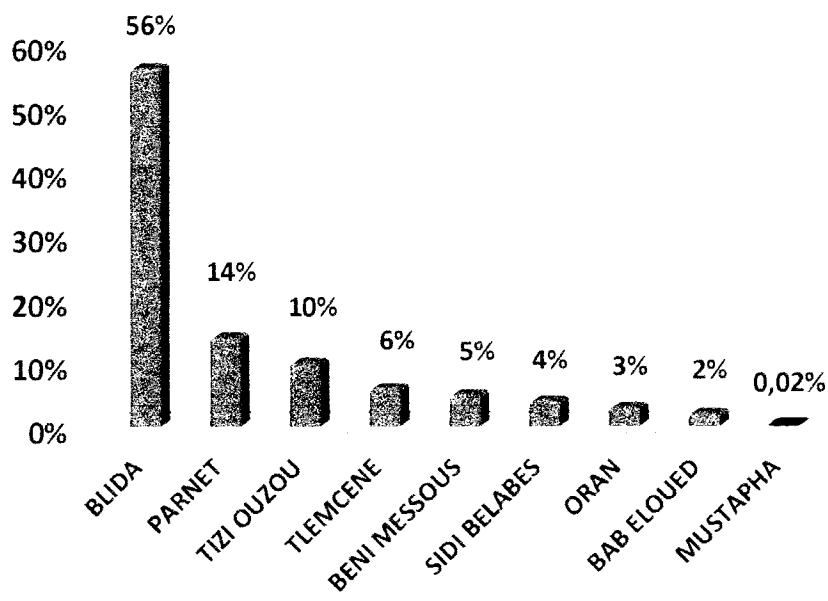


**Graph 2:** Répartition des malades selon l'âge et les tranches d'âge.

La répartition des malades selon l'âge et les tranches d'âge a montré une prédominance des malades de la tranche d'âge comprise entre **20 et 40 ans** avec un pourcentage de **65%**, ce qui nous amène à dire que la majorité de nos malades avait un âge jeune, dont on a noté que la moyenne d'âge est de **31 ans** avec des extrêmes allant de **20 mois à 68 ans**.

## 3) Répartition des malades selon le CHU demandeur :

CHU	Blida	Parnet	T.ouzou	Tlemcene	Béni messous	Sidi bel abbesse	Oran	Bab el oued	Mustapha
Nombre des patients	203	49	35	20	17	13	11	9	2
Le pourcentage	56%	14%	10%	6%	5%	4%	3%	2%	0,02%



**Graph 3:** Répartition des malades selon le service demandeur.

On remarque que plus de la moitié des malades recrutés dans notre échantillon, font parti du CHU de Blida avec un pourcentage de **56%**, puis un peu plus loin arriveras les autres CHU dans l'ordre est comme suit :

CHU Parnet → **14%**

CHU Tizi ouzou → **10%**

CHU Tlemcene → **6%**

CHU Béni Messous → **5%**

CHU Sidi Belabesse → **4%**

CHU ORAN → **3%**

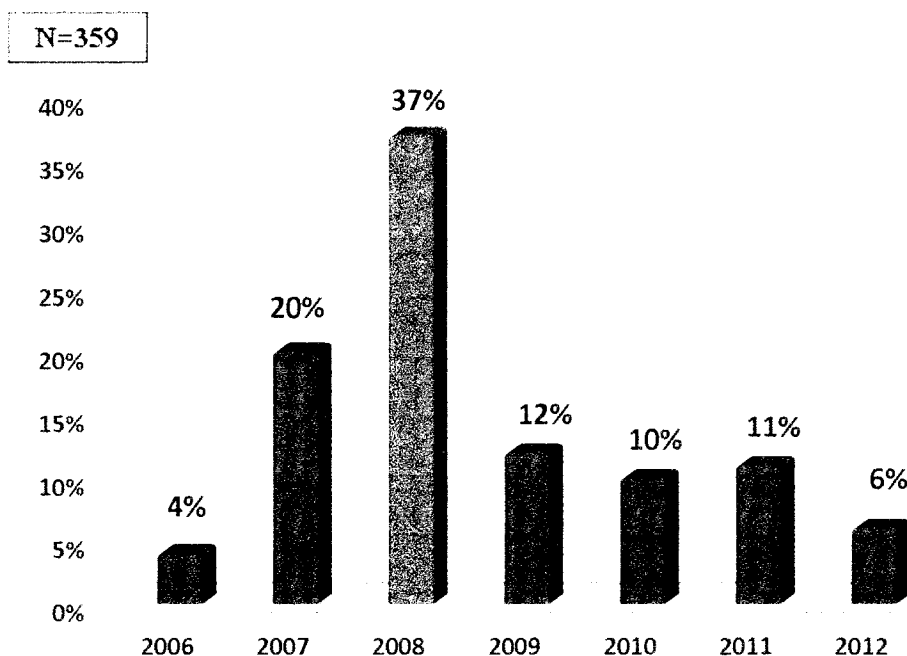
CHU Bab El oued → **2%**

CHU Mustapha c'est le plus bas avec un pourcentage inférieur à **1%**

#### 4) Répartition des malades selon le recrutement par an :

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Le pourcentage des malades %	4%	20%	37%	12%	10%	11%	6%





**Graphe 4** : Répartition des malades selon le recrutement par an.

En se basant sur le nombre des malades recrutés par an, on constate que le plus grand nombre d'entre eux a été reçu pendant l'année **2008** avec un pourcentage de **37%** alors que le plus faible pourcentage des malades était en **2006** avec **4%** seulement, entre ces deux extrêmes se situent les autres années dans l'ordre comme suit :

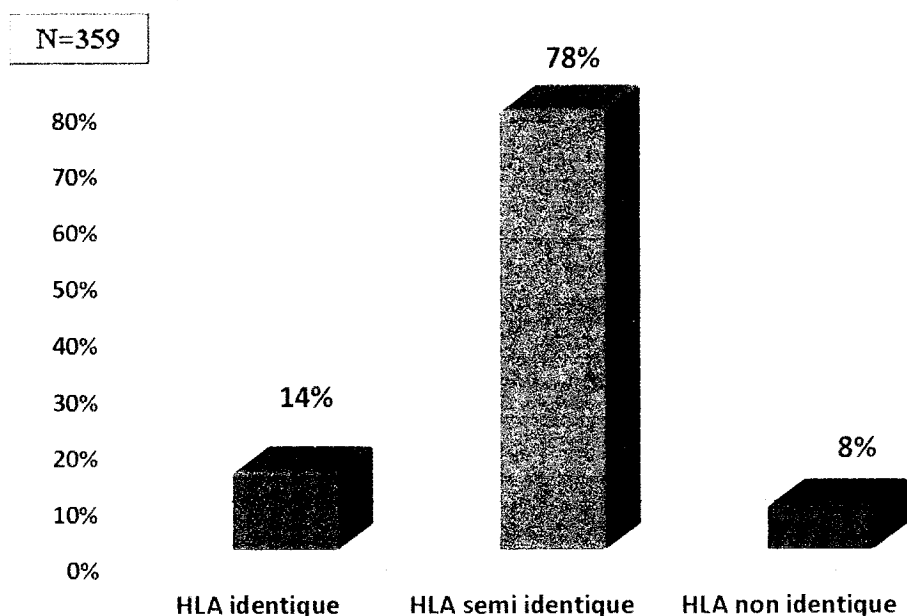
L'année **2007** avec un pourcentage de **20%**.

Les années **2009**, **2011**, et **2010** avec un pourcentage semblable  $\approx 11\%$  pour chaque année.

Et en fin l'année **2012** qui représente un pourcentage de **6%**.

#### 5) Répartition des malades selon les résultats de typage HLA :

Résultats de compatibilité	HLA identique	HLA semi identique	HLA non identique
Nombre des malades	51	281	27
Le pourcentage %	14%	78%	8%



**Graph 5 :** Répartition des malades selon les résultats du typage HLA.

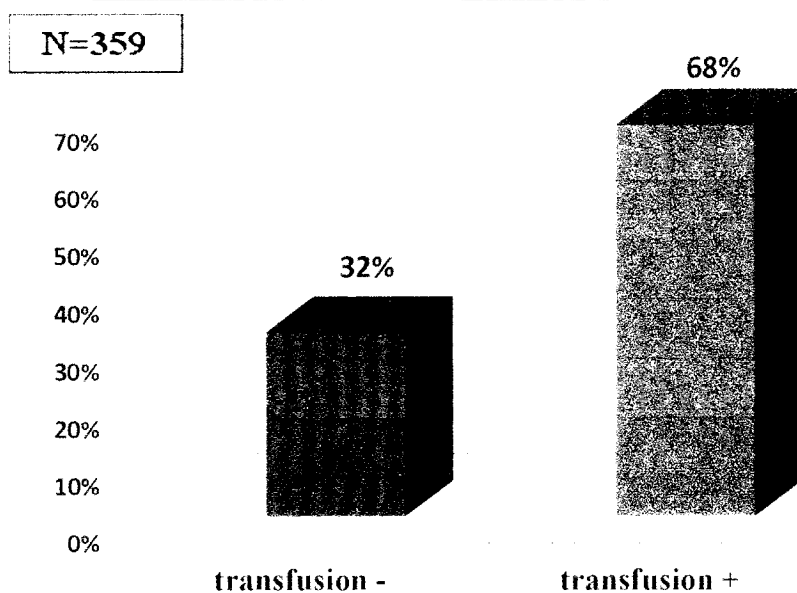
L'analyse des résultats illustrés dans ce graph concernant l'étude de la compatibilité HLA, montre que parmi nos couples D /R recrutés (N=359), 78% avaient des HLA semi identiques. 14% étaient identiques et 8% n'avaient aucune compatibilité HLA entre eux, ils sont donc non identiques.

#### **6) Répartition des malades selon les évènements immunisants :**

##### **A-Transfusion :**

##### **1- La présence de transfusion :**

Transfusion	Transfusion (-)	transfusion (+)
Nombre des patients	116	243
Le pourcentage%	32%	68%

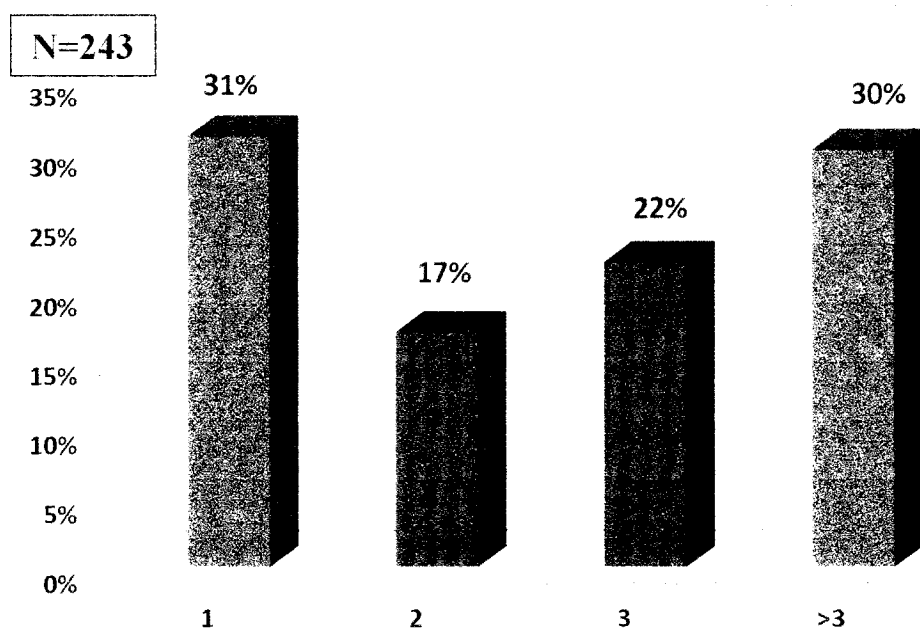


**Graph 6 :** La répartition des malades selon la présence ou l'absence de transfusion.

Parmi 359 malades recrutés, 68% (116) ont été transfusés au moins une fois contre 32% (243) qui n'ont été jamais transfusés.

2- La fréquence de transfusion :

Transfusion	1	2	3	>3
Nombre des malades	76	41	53	73
Le pourcentage %	31%	17%	22%	30%



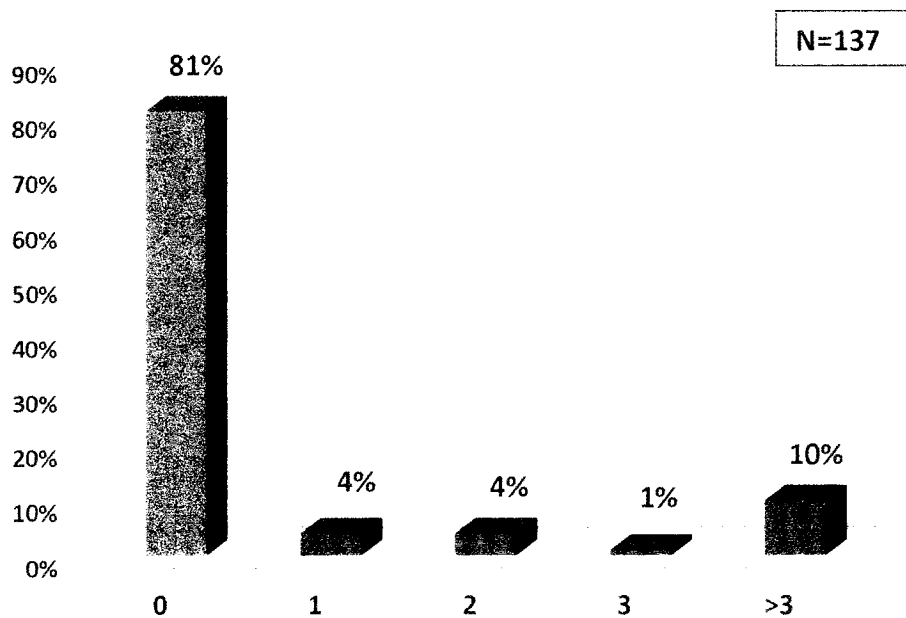
**Graph 7 :** Répartition des malades transfusés selon la fréquence de transfusion.

Sur 243 malades transfusés un pourcentage de **30%** sont des polytransfusés (plus de 3 transfusions), le reste c'est des malades **70%**, sont des malades qui ont subis moins de trois transfusions dont le pourcentage est représenté comme suit :

- **31%** des malades ont reçu **une seule** transfusion.
- **17%** des malades ont reçu **deux** transfusions.
- **22%** des malades ont reçu **trois** transfusions.

B-Grossesse :

Nombre de grossesse	0	1	2	3	>3
Nombre des malades	111	6	5	2	13
Le pourcentage %	81%	4%	4%	1%	10%



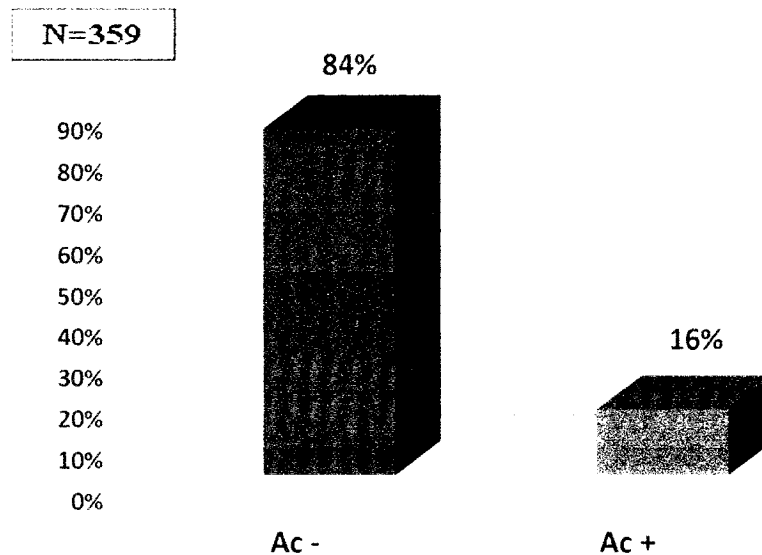
Graphe 8 : Répartition des malades selon le nombre de Grossesse.

Les résultats représentés dans ce graphe montre clairement que la majorité des femmes recrutées dans notre échantillon (**81%**) n'ont jamais fait de grossesse, contre **19%** des femmes qui ont fait au moins une grossesse dont la répartition est la suivante :

- **4%** des femmes ont fait **1 seule** grossesse et le même pourcentage pour les femmes qui ont fait **2 grossesses**.
- **1%** des femmes ont fait **3 grossesses**.
- Et en fin **10%** des femmes ont fait plus de trois grossesses avec un maximum de **9 grossesses**.

**7) Répartition des malades selon les résultats de la recherche des Ac :****A- Les Ac de classe I et II :**

Résultats des Ac	Ac -	Ac +
Nombre des malades	301	58
Le pourcentage %	84%	16%

**Graph 9 :** Répartition des malades selon les résultats de la recherche d'Ac de Classe I et II.

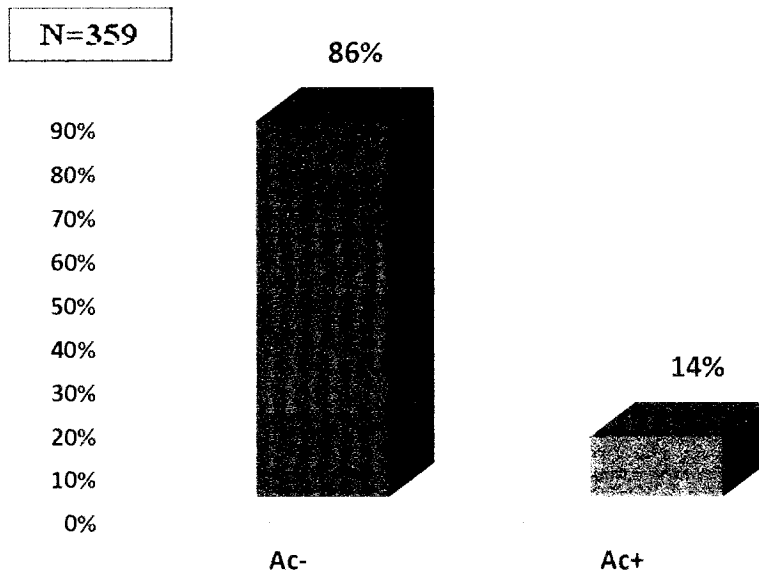
Parmi les malades recrutés (N=359), seul **16 %** ont développé des Ac anti HLA avant la greffe dont le recueil d'information n'était pas assez complet concernant le PRA pour dire qu'il s'agit des malades immunisés ou hyperimmunisés.

Le reste des malades, représentés par un pourcentage de **84%** n'ont pas développé des Ac anti HLA, ils sont donc considérés comme non immunisés.

Pour plus de spécificité on a calculé la positivité en Ac de classe I et II séparément dont les résultats sont représentés dans les deux graphes suivants :

**B- Les Ac de classe I :**

Résultats des Ac	Ac classe I-	Ac classe I+
Nombre des patients	308	51
Le pourcentage %	86%	14%

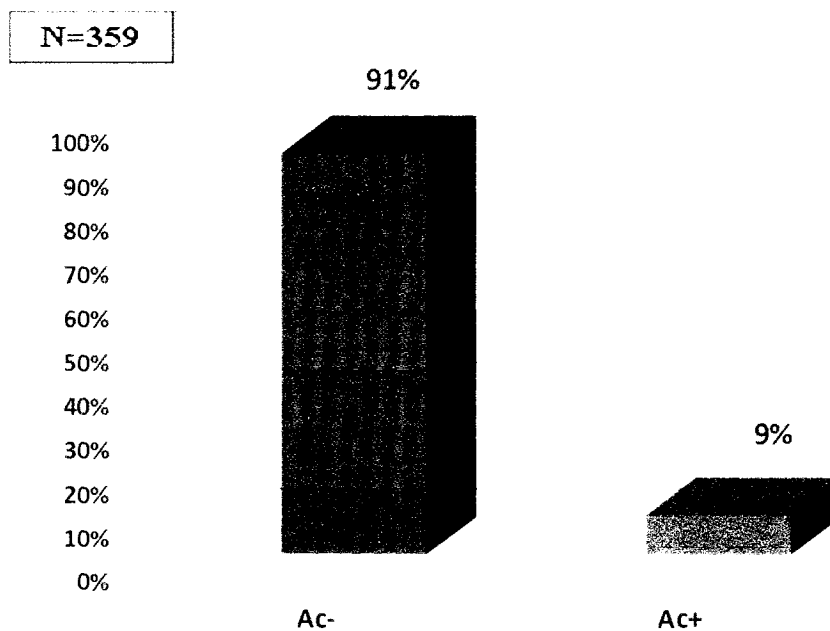


**Graphe 10** : Répartition des malades selon les résultats de la recherche d'Ac de Classe I.

On note que, parmi nos malades (N=359), 14% ont développé des Ac anti HLA de **Classe I**, contre 86% qui n'ont pas développé d'Ac anti HLA de **classe I**.

**C- Les Ac de classe II :**

Résultats des Ac	Ac classe II-	Ac classe II+
Le nombre des malades	327	32
Le pourcentage %	91%	9%

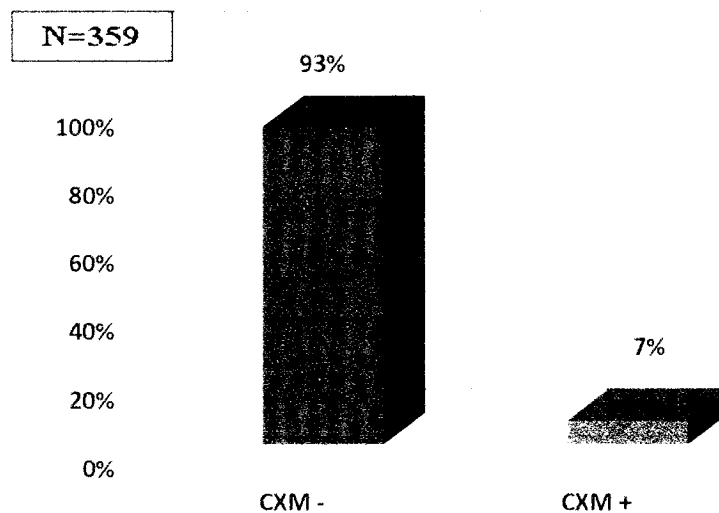


**Graphe 11** : Répartition des malades selon les résultats de la recherche d'Ac de Classe II.

Pour les Ac anti HLA de classe II, la positivité du résultat a été remarquée chez **9%** des malades recrutés, alors que le reste des malades **91%** avait des résultats négative concernant la présence d'Ac anti HLA da classe II.

### 8) Répartition des malades selon les résultats de cross match :

Résultat de CXM	CXM (-)	CXM (+)
Nombre des malades	335	24
Le pourcentage%	93%	7%



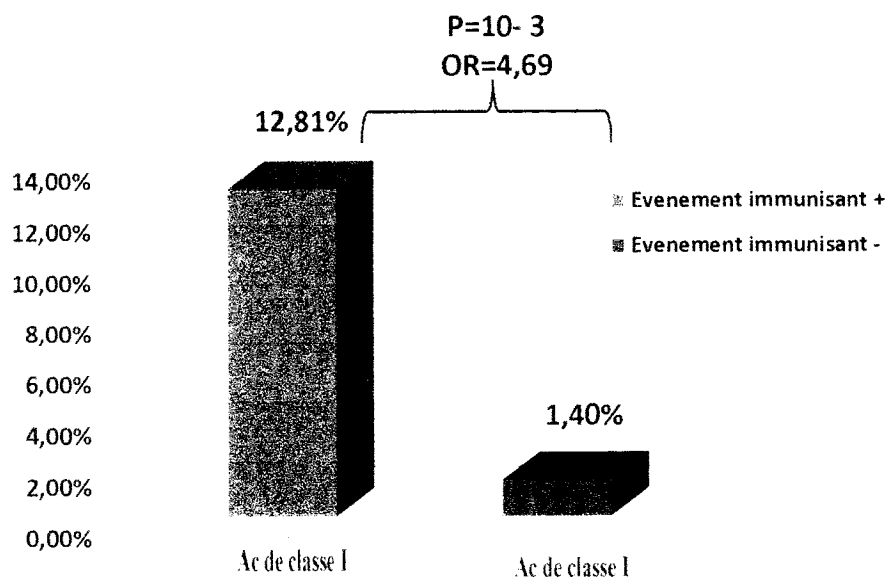
**Graphe 12 :** Répartition des malades selon les résultats du cross match.

Les résultats obtenu concernant le cross match montre que ce dernier était **négative** sur tous les sérums prélevés avant la greffe chez **93%** des malades, alors qu'il était **positif** au moins une seul fois avant la greffe chez le reste des malades c'est-à-dire **7%**.

### 9) Fréquence d'apparition d'Ac anti HLA en cas d'événement immunisant (transfusion et/ou grossesse) :

#### 1- Les Ac de classe I :

	Ac classe I +	Ac classe I -	TOTAL
En Présence d'événement immunisant	12,81%	56,82%	69,60%
En l'absence d'événement immunisant	1,40%	28,90%	30,40%
<b>TOTAL</b>	<b>14%</b>	<b>86%</b>	<b>100%</b>



**Graph 13 :** Evénements immunisants et apparition d'Ac anti HLA de classe I.

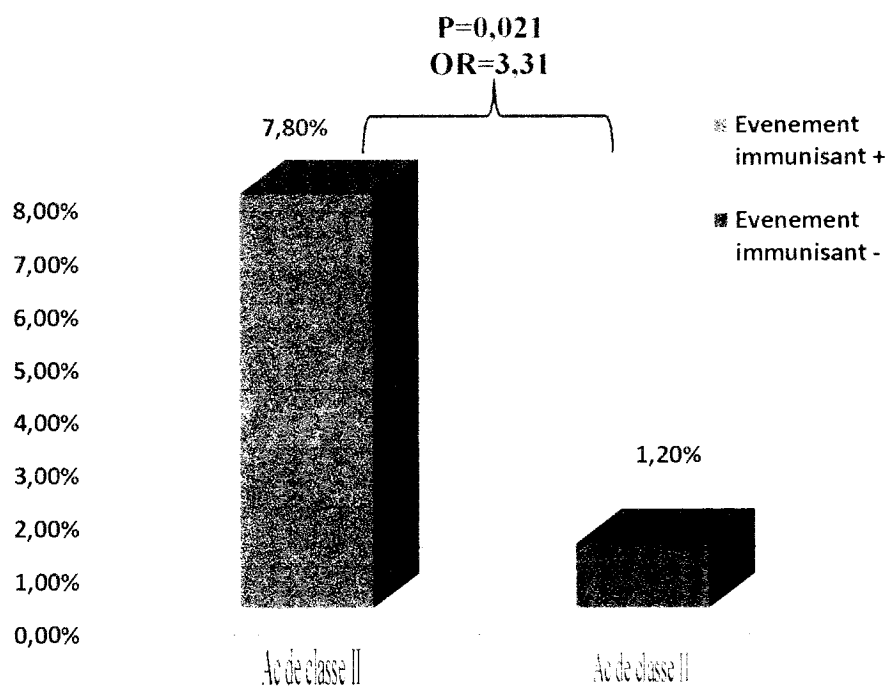
L'analyse des résultats mentionnés dans ce graphe, nous amènent à dire qu'il existe une différence significative concernant l'apparition des Acs anti HLA de classe I entre les malades ayant des événements immunisants et les malades n'ayant pas des événements immunisants (**12,81 Vs 1,40**), cela est démontré par le calcul de  $P=10^{-3}$ .

D'autre part, le calcul de  $OR=4,69$  et donc  $>1$ , illustre que : l'événement immunisant est un facteur de risque en faveur d'apparition d'Ac anti HLA de classe I.

## 2- Les Ac de classe II :

	Ac classe II+	Ac classe II-	TOTAL
<b>En Présence d'événement immunisant</b>	7,80%	61,80%	69,80%
<b>En l'absence d'événement immunisant</b>	1,20%	29,20%	30,40%
<b>TOTAL</b>	9%	91%	100%





**Graphe 14** : Evénements immunisants et l'apparition d'Ac anti HLA de classe II.

On constate que les résultats obtenu concernant l'apparition des Acs anti HLA de classe II, sont semblables avec les résultats précédents, avec une simple variation des valeurs dont:

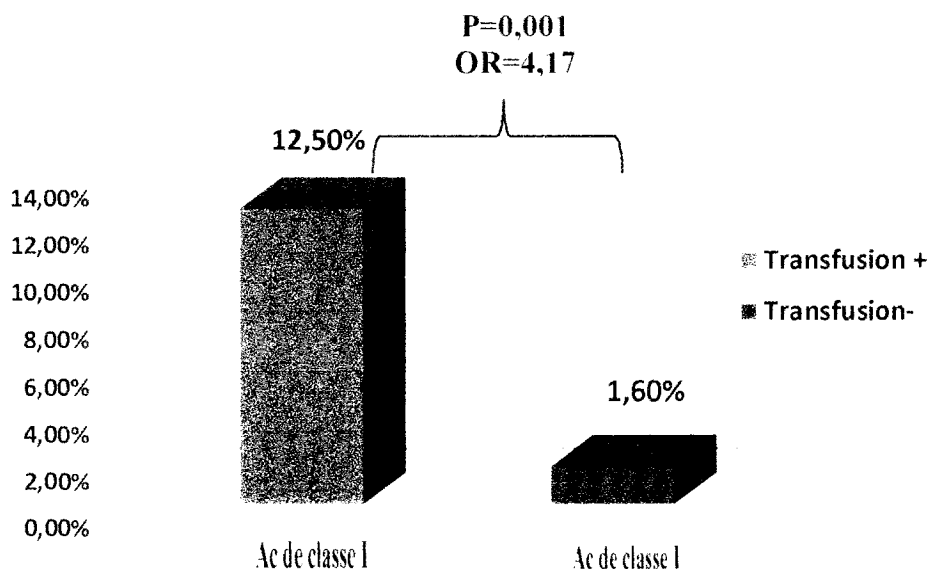
(7,80% Vs 1,20%) avec  $P=0,021$  et  $OR=3,31$ .

Donc on peut dire que quelque soit la classe d'Ac, l'événement immunisant est considéré comme un facteur de risque qui favorise leur apparition.

**10) Fréquence d'apparition d'Ac anti HLA en cas de transfusion :**

**1- Ac de classe I :**

	Ac classe I+	Ac classe I-	Total
Présence de transfusion	12,50%	55,10%	67,70%
Absence de transfusion	1,60%	30,60%	32,30%
Total	14,20%	85,70%	100%



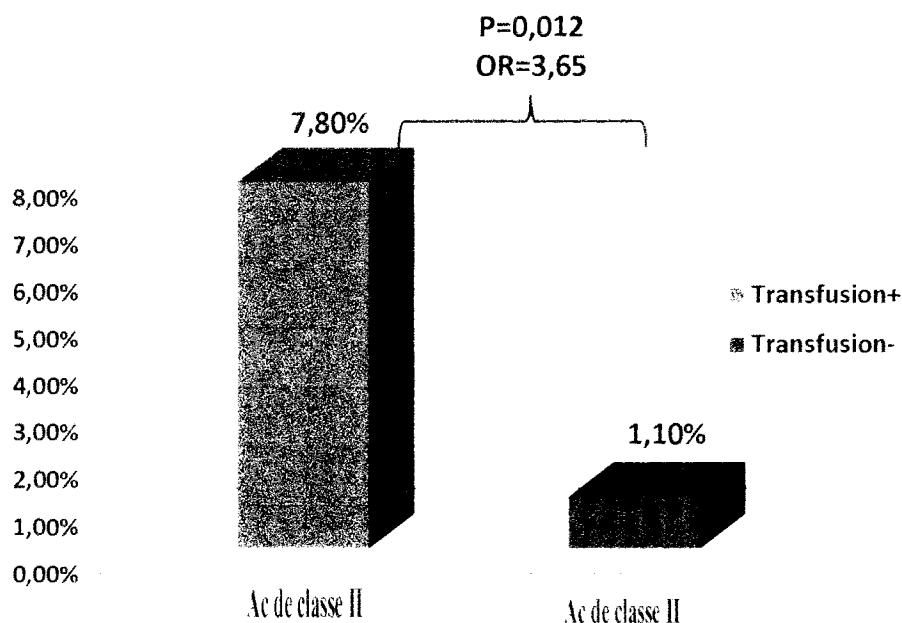
**Graphe 15 :** Transfusion et l'apparition d'Ac anti HLA de classe I.

Les résultats illustrés dans ce graphe montrent clairement, qu'il existe une différence significative concernant l'apparition des Ac anti HLA de classe I, entre les malades ayant fait des transfusions et ceux qui n'ont jamais été transfusés, (**12,5% Vs 1,60%**), cela est démontré par le calcul de **P= 0,001**.

Par ailleurs le calcul de **OR= 4,17 >1**, nous permettons de dire que la transfusion est un facteur de risque en faveur de développement d'Ac anti HLA de classe I.

## 2- Ac de classe II :

	Ac classe II+	Ac classe II-	Total
Transfusion +	7,80%	59,80%	67,60%
Transfusion -	1,10%	31,10%	32,40%
Total	9%	91%	100%



**Graph 16 :** Transfusion et l'apparition d'Ac anti HLA de classe II.

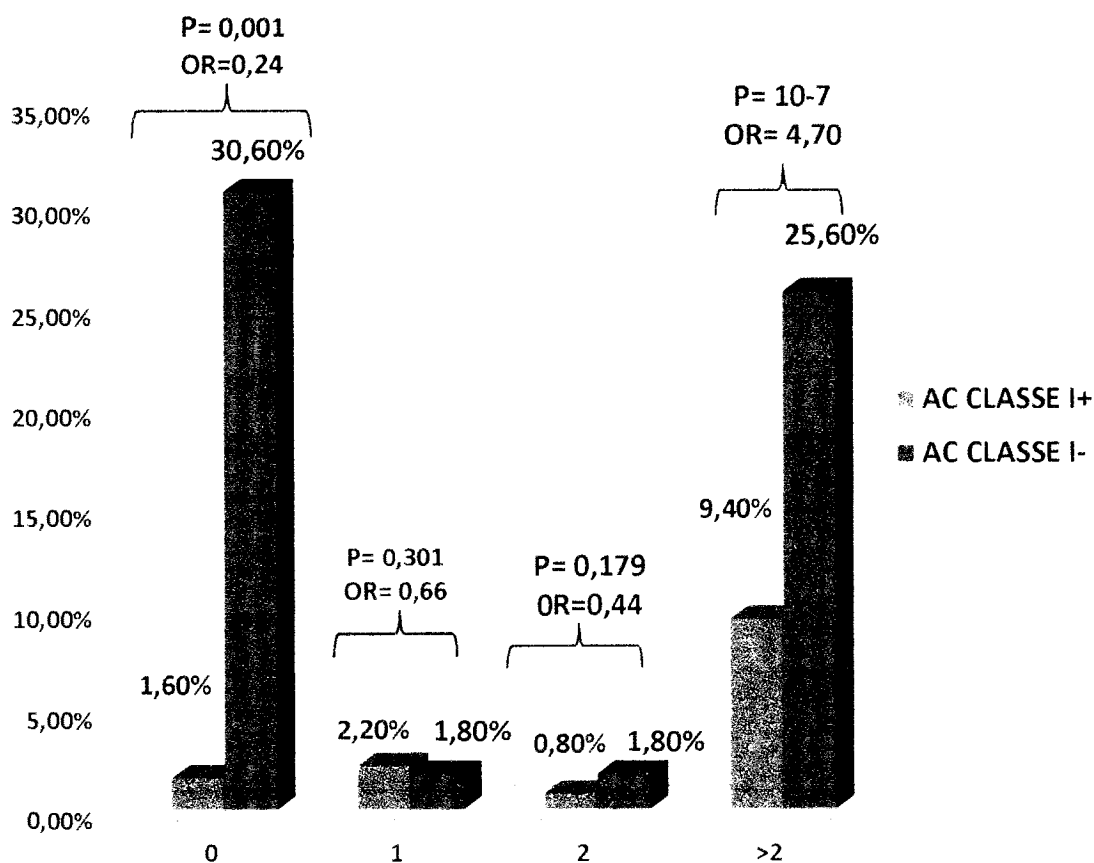
Les résultats obtenus, sont les mêmes avec les précédents en sens de variation, concernant l'apparition des Ac anti HLA de classe II sauf que les valeurs de P et OR sont différentes dont on a (7,80 % Vs 1,1%) → P=0,012 et OR=3,65.

Donc on peut dire que les transfusions sont un facteur de risque favorisant le développement d'Ac anti HLA que ce soit de classe I ou II.

**II) Le nombre de transfusion et l'apparition d'Ac anti HLA :**

**1- Ac de classe I :**

	Ac classe I+	Ac classe I-	Total
0	1,60%	30,60%	32,30%
1	2,20%	1,80%	21,10%
2	0,80%	1,80%	21,10%
>2	9,40%	25,60%	35%
<b>Total</b>	<b>14,20%</b>	<b>85,69%</b>	<b>100%</b>



**Graph 17 :** Fréquence des transfusions et apparition d'Ac anti HLA de classe I.

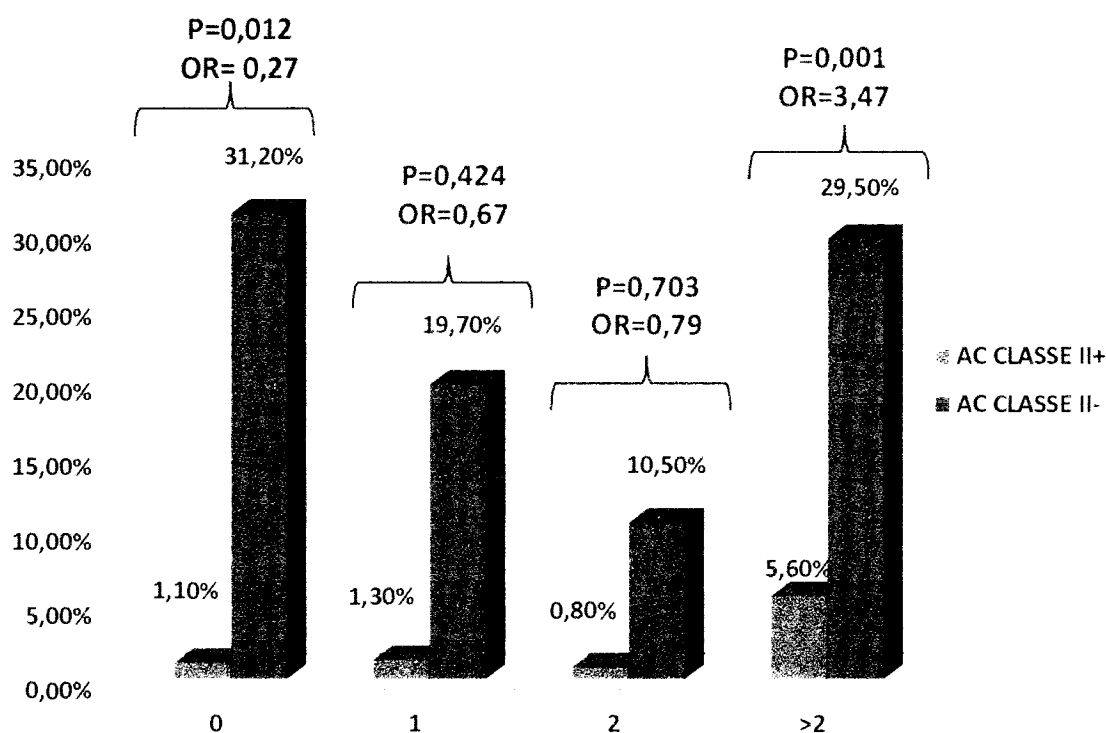
Les constatations des résultats illustrés dans ce graphe, nous orientons à mentionner que :

→ Le risque d'apparition d'alloAc anti HLA de classe I augmente avec le nombre de transfusion, plus précisément après la 2ème transfusion pour notre échantillon, cela est démontré par le calcul de  $P=10^{-7}$  et  $OR= 4,68$ .

→ Les malades n'ayant pas reçu une transfusion sont protégés contre une réponse allogénique humoral, dont  $P=0,001$  et  $OR=0,24$ .

## 2- Ac de classe II :

	Ac classe II+	Ac classe II-	Total
0	1,10%	31,20%	32,30%
1	1,30%	19,70%	21,16%
2	0,80%	10,50%	11,40%
>2	5,60%	29,50%	35,09%
<b>Total</b>	9%	91%	100%



**Graphe 18 :** Fréquence de transfusion et apparition d'Ac anti HLA classe II.

Les résultats mentionnés dans ce graphe en matière de risque d'apparition d'Ac anti HLA de classe II ont les mêmes interprétations avec les résultats précédents (Ac de classe I), sauf qu'une simple différence des valeurs de P et d'OR dont :

→ On note toujours un risque élevé d'apparition d'allo Ac anti HLA de classe II, chez les malades qui ont subis plus de deux transfusions sanguine par rapport à ceux qui ont fait une ou deux transfusions, cela est illustré par le calcul de  $p=0,001$  et  $OR=3,47$ .

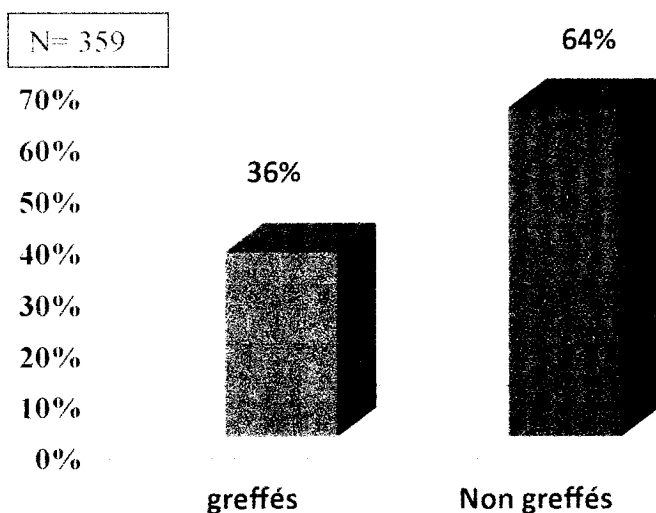
→ Les malades n'ayant pas reçu une transfusion sanguine sont également protégés contre l'apparition d'Ac anti HLA de classe II dont  $P=0,012$  et  $OR=0,27$ .

## II- Résultats de suivi des malades greffés :

### 1) Répartition des malades selon la greffe :

#### A) La totalité des malades :

Greffe	oui	Non
Nombre des malades	128	231
Le pourcentage	36%	64%

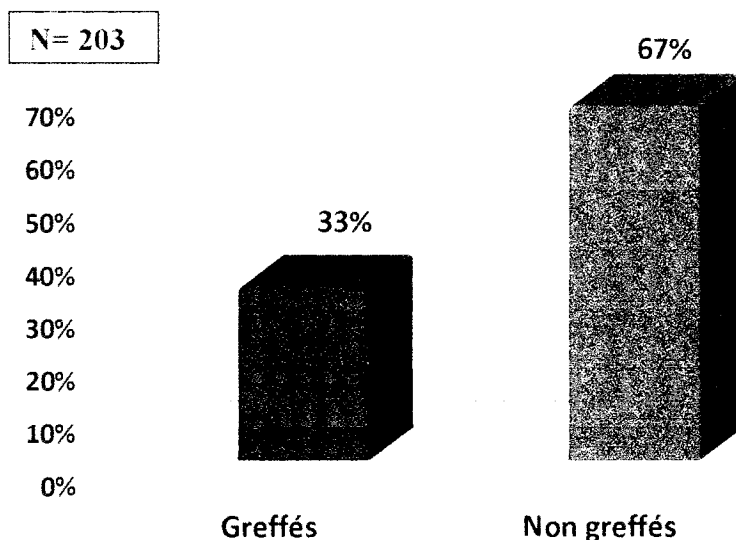


**Graph 19** : Répartition des malades greffés.

Parmi nos malades **36%** (128) ont été greffés, alors que **64%** (201) sont encore en attente d'une greffe.

**B) Les malades de Blida :**

Greffe	oui	Non
Nombre des malades	66	136
Le pourcentage %	33%	67%

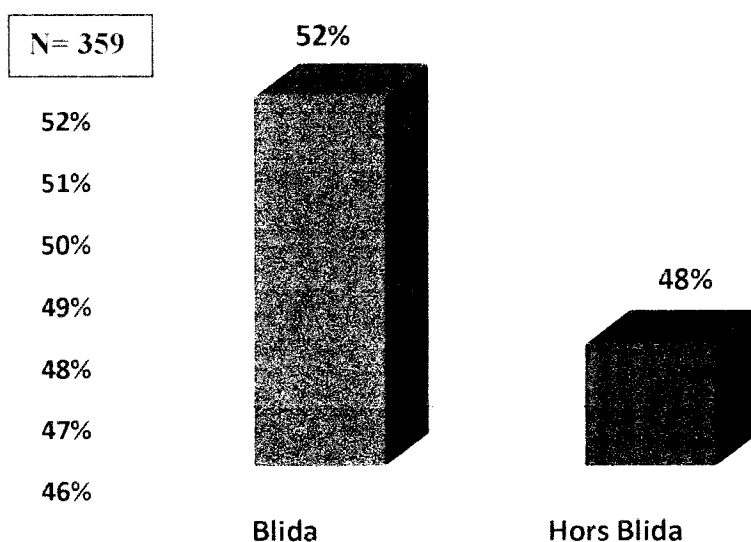


**Graph 20** : Répartition des malades de Blida selon la réalisation de la greffe.

Parmi les malades explorés du CHU de Blida, **33%** sont greffés, le reste **67%** sont encore en attente.

C) Le taux des malades greffés selon les CHU :

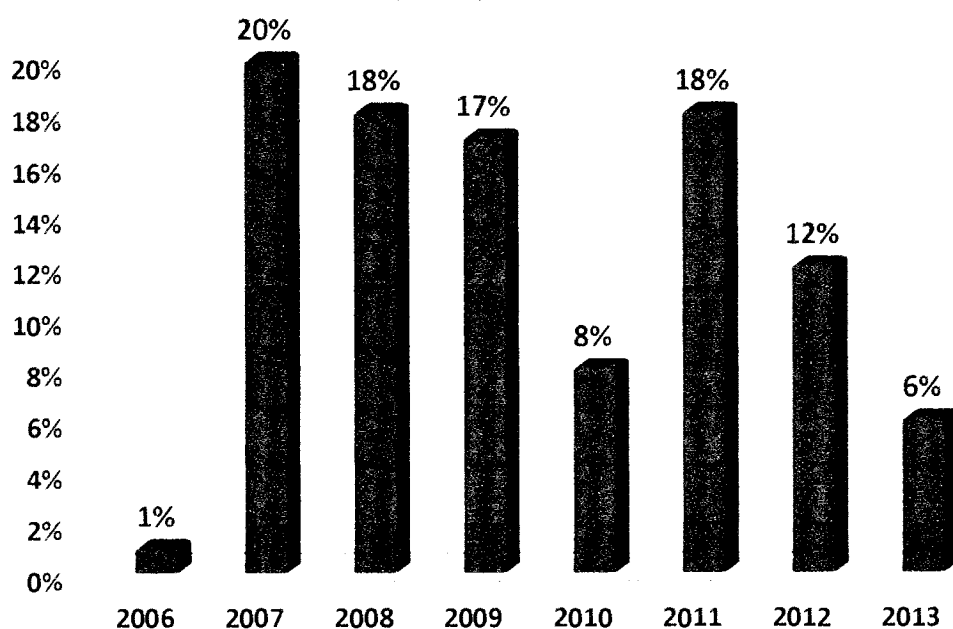
CHU	Blida	Hors Blida
nombre des greffés	66	61
Le pourcentage %	52%	48%

Graphique 21 : Répartition des malades greffés à Blida et hors Blida.

Parmi les malades greffés (N=128), 52% font parti du CHU de **Blida**, tandis que 48% font parti des autres CHU.

D) Répartition des greffes effectués à Blida par année :

Année de greffe	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Nombre des malades	1	13	12	11	5	12	8	4
Le pourcentage%	1%	20%	18%	17%	8%	18%	12%	6%



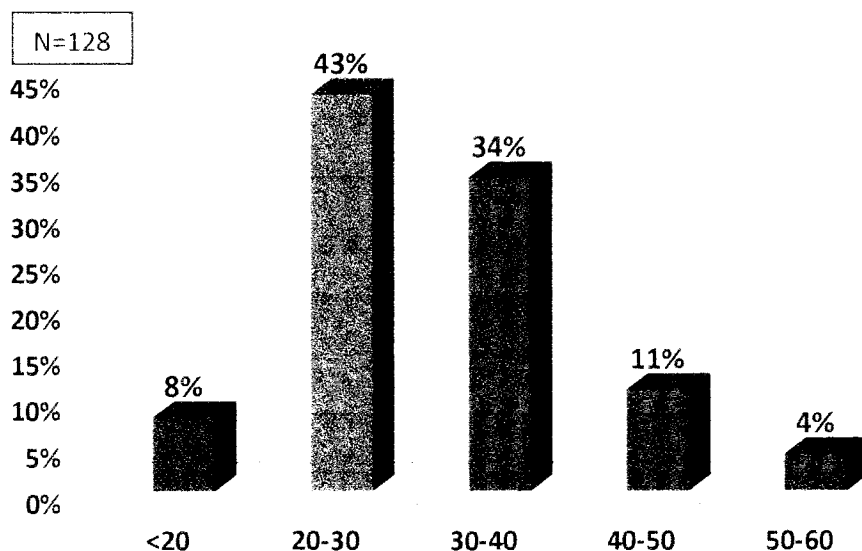
**Graph 22** : Répartition des malades greffés de Blida par année.

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, et 2009** dont elles présentent dans l'ensemble un pourcentage de **55%**. Également un pic a été observé au cours de l'année **2011**.

## 2) Répartition des malades greffés selon l'âge et les tranches d'âge :

Age	<20	20-30	30-40	40-50	50-60
Nombre des malades	10	55	44	14	5
Le pourcentage %	8%	43%	34%	11%	4%





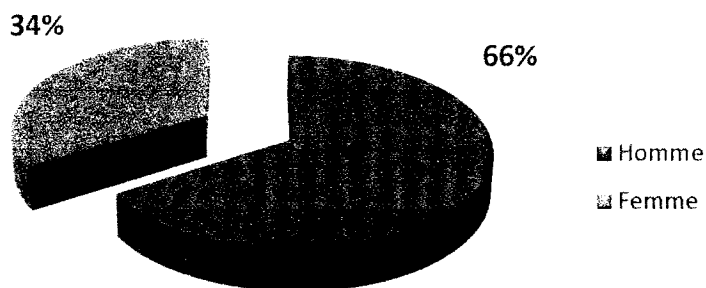
**Graphe 23 :** Répartition des malades greffés selon l'âge et les tranches d'âge.

On constate que la population de nos malades était jeune, dont plus de 77% des malades qui ont bénéficié d'une greffe ayant une tranche d'âge comprise entre **20 et 40 ans**.

Cela est confirmé par le calcul de **la médiane** qui égal à **26 ans** avec des extrêmes allant de **10 ans** jusqu'à **57 ans**.

### 3) Répartition des malades greffés selon le sexe :

Sexe des malades	Homme	Femme
Nombre des malades	85	43
Le pourcentage %	66%	34%

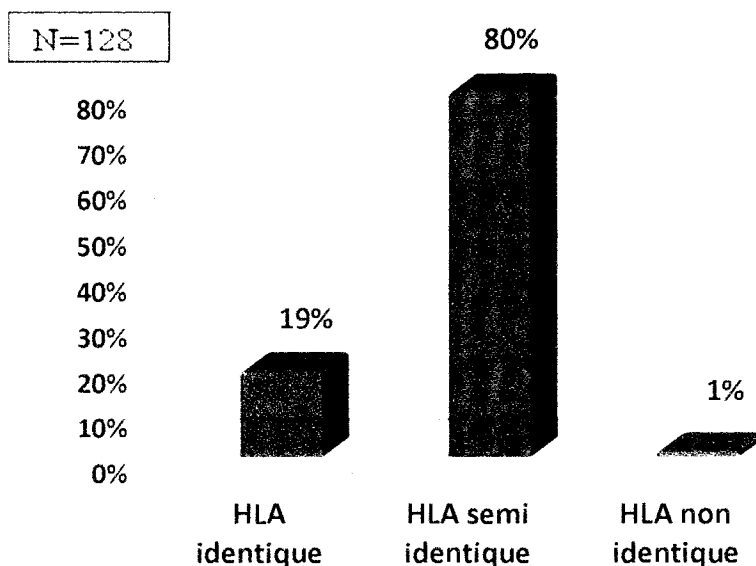


**Graphe 24 :** Répartition des malades greffés selon le sexe.

On note une prédominance masculine des malades greffés (**66% Vs 34%**) avec un sexe ratio égal à **1,9**.

**4) Répartition des malades greffés selon la compatibilité HLA :**

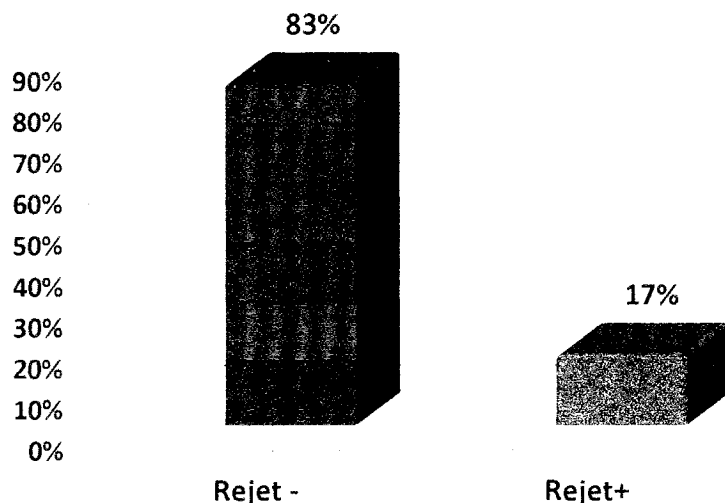
La compatibilité HLA	HLA identique	HLA semi identique	HLA non identique
Nombre des malades	24	102	2
Le pourcentage	19%	80%	1%

**Graphe 25** : Répartition des malades greffés selon la compatibilité HLA.

En se basant sur les résultats d'étude de compatibilité, on constate que la majorité des greffes ont été réalisés entre des couples D/R **semi identiques** avec un pourcentage de **80 %**, alors que **19%** sont des couples **identique**, le reste **1%** sont des couples **non identique**.

**5) Répartition des malades greffés de CHU Blida selon la survenu de rejet :**

La survenu de rejet	Rejet (-)	Rejet (+)
Le nombre des malades	55	11
Le pourcentage %	83%	17%

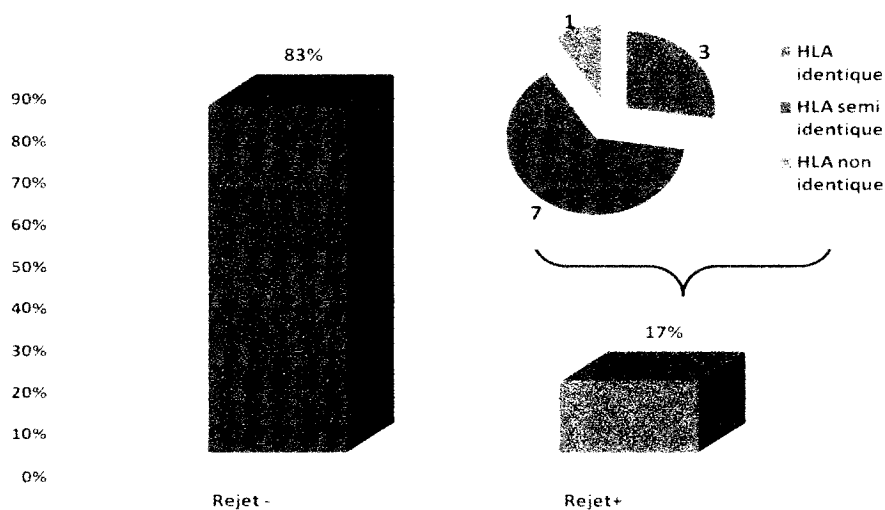


**Graphe 26 :** Répartition des greffés de Blida selon la servenu de rejet.

Au cours de la surveillance de nos malades greffés du CHU de Blida (66), on a noté que : 17% (11) ont développé un épisode de rejet.

**6) Répartition des malades qui ont fait le rejet selon la compatibilité HLA :**

La compatibilité HLA	HLA identique	HLA semi identique	HLA non identique
Nombre des malades	3	7	1
Le pourcentage %	27%	64%	9%



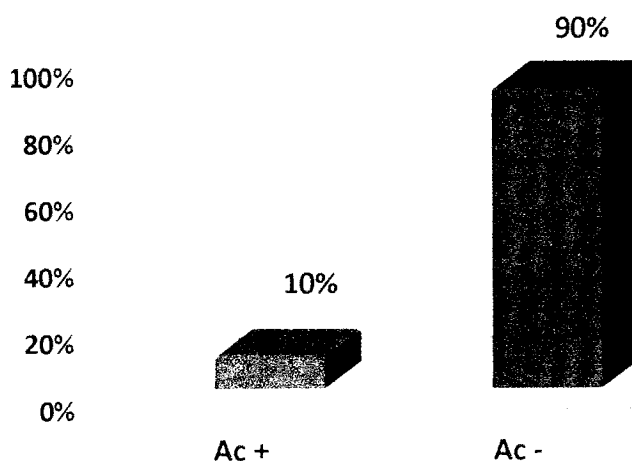
**Graphe 27 :** Répartition des malades qui ont fait le rejet selon la compatibilité HLA.

Parmi les **11 malades** qui ont fait un rejet, **7** d'entre eux étaient **semi identiques** avec leurs donneurs, alors que **3** étaient **identiques** avec leur donneurs, et seulement **un** qui n'était pas **identique**.

### 7) Répartition des malades greffés selon les résultats de la recherche des Ac avant la greffe :

#### A) La totalité des malades :

Résultats des Ac	Ac +	Ac -
Malades greffés	12	114
Le pourcentage	10%	90%



**Grphe 28 :** Répartition des malades greffés selon les résultats de la recherche des Ac avant la greffe.

Dans l'ensemble des malades greffés, **10%** avaient des Ac anti HLA (classe I et/ou II) avant la greffe, tandis que **90%** n'en avaient pas.

#### B) Les malades de Blida :

Résultats des Ac	Ac -	Ac+
Nombre des malades	66	5
Le pourcentage%	93%	7%

## Discussion :

### I- Données démographiques :

Dans notre série on note une prédominance masculine des malades enregistrés en vue d'une transplantation rénale avec un sexe ratio égal à **1,6**. Ces malades présentent une insuffisance rénale terminale et leur résultat cité ci dessus peut être corrélé avec les registres Européens qui ont noté que : l'incidence de l'insuffisance rénale terminale, est plus élevée chez les hommes que chez les femmes.

Dans le registre européen, le ratio des sexes varie de **1,1** en Belgique à **1,7** au Portugal, celui de la France étant égal à **1,4** (29). Comme celui des Etats-Unis(184). Ce ratio varie selon la pathologie à l'origine de l'insuffisance rénale.

De même une étude a été faite par A HOUZET sur **1203** patients en attente de greffe rénale au niveau de CHU de NANTES entre 1998 et 2002, où les pourcentages rapportés concernant le sexe des malades sont 56% pour les hommes et 43.3 %pour les femmes(88).

Cette inégalité des sexes face à l'insuffisance rénale est la conséquence de l'incidence plus élevée de certaines causes d'insuffisance rénale chez l'homme, telle que la néphropathie à IgA, mais plus encore, à pathologie égale, à la progression plus rapide des maladies rénales chez les hommes par rapport aux femmes (152).

De même, la majorité de nos malades sont jeune, avec une moyenne d'âge de **31 ans**. Ces résultats sont similaires avec ceux portant sur une étude prospective effectuée par Salah. H et coll au CHU de Beni Messous entre 1983 et 1985. Cet auteur a fait ressortir que l'âge moyen de **13 000** insuffisants rénaux au stade terminale se situe à moins de **40 ans** (178).

Par ailleurs, une étude épidémiologique de l'insuffisance rénale chronique en France et dans certains pays Européens, a montré que sur **4693** patients atteints de cette pathologie, l'âge médian était de **71 ans** (51).

La comparaison avec l'âge moyen des insuffisants rénaux des pays Européens, celui de l'Algérie et celui de notre échantillonnage, montre qu'il y a une différence de **30 ans**. Cette discordance peut s'expliquer par :

- La gestion de l'accessibilité aux soins des personnes à haut risque dans les pays industrialisés (105).

-Une hygiène de vie réglementée et plus adaptée dans les pays occidentaux, pouvant minimiser les facteurs de risque en faveur d'une insuffisance rénale.

-La différence de quantification des trois échantillonnages rattachés aux études sus citées.

## **II- Recrutement des malades par année et par CHU :**

L'existence d'infrastructure au CHU de Blida comme celle de l'unité de l'immunologie, lieu de notre étude, nous a permis de recruter la plupart de nos patients (**56%**) ainsi que d'autres rentrant dans le cadre de la collaboration inter CHU. La totalité de ces patients ayant été soumis au bilan immunologique pré greffe au niveau de la dite unité.

En Algérie, la première greffe rénale a été réalisée en **juin 1986** avec un rein 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 dans les maladies du rein) et le **CHU de Blida** (Service de Chirurgie Générale).

La création de ces centres et l'existence d'un cadre de collaboration inter hospitalière afin de répondre au nombre croissant de demande de greffe rénale, a permis de constater durant l'année **2008**, l'atteinte d'un pic d'exploration des tests immunologiques rentrants dans le bilan pré greffe.

## **III- La compatibilité HLA receveur /donneur :**

Notre série d'étude a porté sur la transplantation rénale à partir de donneur vivant, ce dernier faisant partie de la famille du receveur (père, mère, frère, sœur, enfants...). Cette situation a fait ressortir que : **78%** des couples D/R enregistrés avec une compatibilité **semi identique**, **14%** avec une compatibilité **identique** et **8%** avec une compatibilité **non identique**.

## **IV- Les phénomènes immunisants chez nos malades explorés :**

Les Ac anti HLA cytotoxiques présents dans le sérum du receveur avant la greffe, sont responsables du rejet hyperaigu. Chez les patients immunisés, le rejet aigu est plus précoce plus fréquent, plus sévère et plus résistant aux traitements que chez les patients non immunisés (196).

Ces Ac apparaissent suite à un événement immunisant :

### **1) Les Transfusions :**

La majorité des patients qui souffrent d'insuffisance rénale avancée souffrent aussi d'anémie. Cette anémie est due à une diminution de la production rénale d'érythropoïétine (EPO) (151).

Toute anémie chez un patient ayant une maladie rénale chronique doit être exploré quel que soit le niveau de sa fonction rénale. La prise en charge de cette anémie comprend la correction de la carence martiale, le traitement par EPO, et lorsque cela est possible, l'élimination des facteurs de résistance à l'EPO(33). Les transfusions doivent être évitées

autant que possible chez les malades rénaux chroniques et chez les patients en attente de transplantation (risque d'allo-immunisation).

Les seules indications des transfusions sanguines chez ces patients sont :

- une anémie symptomatique et un facteur de risque associé tel que : le diabète, l'insuffisance cardiaque, la coronaropathie, l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, l'âge avancé.

- une aggravation aiguë *de l'anémie* par perte sanguine (hémorragie ou chirurgie), ou hémolyse (56).

Ce qui peut être le cas de nos malades dont on a noté que **68%** ont subi au moins une transfusion en vue de corriger leur anémie.

Le nombre des malades polytransfusés est assez remarquable **30%**, chose qui doit être signalé à fin de connaître les causes réelles de cette pratique, que l'on explique par le fait que :

- Le diagnostic de l'insuffisance rénale de nos malades n'est pas posé en premier lieu pour éviter le traitement d'anémie par des transfusions sanguines, c'est-à-dire que l'anémie est considérée comme la cause de pathologie alors qu'elle est la conséquence de celle-ci.

- Le taux d'hémoglobine de nos malades enregistrés en vue d'une transplantation, en fonction de sa valeur, peut être à l'origine d'une aggravation de l'anémie nécessitant la prescription de transfusions sanguines en urgence.

## **2- Grossesse :**

La majorité de nos patientes explorées **81%**, n'ont jamais fait de grossesse, cela peut être expliqué par le fait que des modifications hormonales et du cycle menstruel sont fréquentes chez les patientes présentant une IRC. La fertilité est inversement proportionnelle au degré de dysfonction rénale. Chez les patientes avec une insuffisance rénale terminale (IRT), l'incidence d'une grossesse n'est plus que de **0,5%** par année.

Après transplantation et avec l'amélioration de la fonction rénale, la fertilité est généralement restaurée. Le pourcentage de grossesses aboutissant à un enfant viable est de **70-100%** chez les patientes présentant une IRC modérée ou après transplantation. Pour des femmes avec une IRT en dialyse, ce taux baisse à **50%** (77).

## **V- L'état immunitaire des patients explorés :**

### **1- Le cross match :**

Le cross match pré-transplantation rénale est pratiqué systématiquement pour détecter les différents Ac 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.

Dans notre série d'étude, malgré le grand nombre de malades qui ont fait au moins un phénomène immunisant c'est à dire **68%** des patients, seul **7%** ont présenté un cross match positif, donc des DSA dans leurs sérum, situation contre indiquant la greffe et l'exclusion du donneur.

En se basant sur les données mentionnées dans la littérature (32). Les résultats obtenus au cours de notre étude, laissent suggérer la pratique de transfusions à partir du sang préalablement phénotypés dont la compatibilité a été exigée.

On peut également expliquer ces résultats par l'exploration HLA au cours de laquelle **92%** des couples D/R se sont révélés compatibles, diminuant ainsi le pourcentage de positivité du cross match à **7%**.

### **2- La présence d'Ac anti HLA avant la greffe :**

Dans notre série d'étude, sur 359 patients, **16%** ont développés des Ac anti HLA (de classe I et/ ou II) avant la greffe, il s'agit des patients immunisés dont l'apparition de ces Ac est liés a une sensibilisation préalable (transfusion et /ou grossesse).

Ces Ac anti HLA détectés et identifiés par la technique ELISA sont des Ac d'isotype IgG, cytotoxiques.

On note également que la positivité en Ac été plus remarqué pour la classe I **14%** par rapport à la classe II **9%**, cela peut être expliqué pratiquement par le fait que les produits sanguins utilisés pour les transfusions (CG standard, CG filtré ...) sont dépourvu totalement ou partiellement des produit des gènes de HLA (Ly B+++), sans oublier que la littérature a mentionné un polymorphisme plus élevé pour la classe I par rapport à la classe II (60).

### **VI- Fréquence d'apparition d'Ac anti HLA avant la greffe suite à un événement immunisant :**

Les Ac anti HLA cytotoxiques d'isotype IgG se rencontrent après transfusion, après une ou plusieurs grossesses ou transplantation antérieure (160), c'est à dire après chaque événement immunisant.

Les transfusions sanguines potentialisent également l'alloimmunisation secondaire aux grossesses. L'alloimmunisation en situation de primiparité est voisine de **5%(157)**. Ce pourcentage s'élève à **20%** à partir de la deuxième grossesse puis augmente jusqu'à **30 à 50%** après cinq transfusions (154).

On peut corréler ces résultats avec notre étude pour laquelle on a noté que, l'événement immunisant apparait comme un facteur de risque en faveur de l'apparition des Ac anti HLA de classe I et /ou II avec ( $P= 10^{-3}$  et  $OR= 4,69$ ) pour la classe I et ( $P=0,021$  et  $OR=3,31$ ) pour la classe II.



Les transfusions isolées ne sont en fait responsables d'une immunisation anti-HLA que chez 9 à 14% des patients transfusés(76)

Okasaki et coll(153) rapportent un taux de 14% d'immunisation anti HLA dans une série de 186 patients ayant reçu un protocole transfusionnel. Barrou et coll(16) rapportent un taux d'immunisation de 5,7% dans une étude portant sur 52 patients. Dans une étude prospective et randomisée portant sur des sujets naïfs, Busson et coll(34), ont observé chez un seul patient sur 40 transfusés, le développement d'un taux d'Ac IgG significatif, après administration d'une unité de sang incompatible.

Dans notre série, les transfusions isolées représentent toujours un facteur de risque de développement d'Ac anti HLA de classe I et /ou classe II. En effet, dans notre étude, sur 116 patients ayant reçu un protocole transfusionnel, 12,5% ont développés des Ac anti HLA de classe I avec ( $P= 0,001$  et  $OR= 4,17$ ) et 7,8% ont développés des Ac anti HLA de classe II, avec ( $P=0,012$  et  $OR=3,65$ ).

En l'absence de plus de données permettant une meilleure compréhension de l'état immunitaire de nos patients, il nous est difficile d'évaluer l'allo-immunisation due au protocole transfusionnel.

#### **VII- Fréquence des transfusions et apparition d'Ac anti HLA avant la greffe :**

La relation entre la fréquence des transfusions et l'apparition des Ac est diversement appréciée. Pour Bux J et coll, (35), l'allo-immunisation résultant de transfusion ne semblerait pas être en rapport avec le nombre de transfusion, alors que pour d'autres auteurs comme Hachman R et coll (36) la relation dose- réponse existerait en dessous de vingt transfusions.

Les résultats de notre étude sont en faveur de la deuxième hypothèse pour laquelle on a remarqué une relation dose réponse à partir de la 2eme transfusion c'est-à-dire que nos malades transfusés plus de 2fois présentaient un risque d'apparition d' Ac anti HLA (de classe I et /ou II) plus élevé par rapport à ceux qui n'ont pas été transfusés ou transfusés moins de 2 fois, dont ( $P=0,001$  et  $OR=0,24$ ) pour la classe I et ( $p=0,001$  et  $OR=3,47$ ) pour la classe II.

Ces résultats nous orientent comme le recommande la Société algérienne de néphrologie, dialyse et transplantation lors du séminaire sur l'optimisation du traitement de l'anémie au cours de l'insuffisance rénale chronique, vers la préconisation de l'utilisation de l'érythropoïétine comme outil permettant de corriger les anémie rénale sans avoir recours aux transfusions chez les patients en instance de greffe. Cette politique de santé a déjà été adoptée dans la plupart des centres au USA à fin d'éviter les transfusions chez les malades candidats à la greffe(201).

### VIII- La réalisation des greffes:

En Algérie, l'accès à la transplantation rénale est hors de portée pour **80%** des patients souffrant d'une insuffisance rénale chronique terminale, a déclaré le professeur Tahar Rayane, président de la Société Algérienne de Néphrologie, Dialyse et Transplantation (SANDT) au cours de 18<sup>eme</sup> congrès national de néphrologie. Il a révélé que **100** greffes rénales étaient réalisées annuellement dans le pays, alors que les besoins minimums sont de l'ordre de **500** greffes pour une même période.

Une même incidence a été constaté, pour la période s'étalant de 2006 à 2012, dans notre série d'étude, au nombre de 359, pour laquelle seulement 128 (36%) malades enregistrés, mais originaire de divers établissements hospitaliers dont le CHU de Blida, ont bénéficié de greffe rénale. Cependant sur les 203 malades explorés et suivis au CHU de Blida seulement 66 (33%) ont bénéficié d'une greffe rénale dans le même intervalle de temps.

### IX- L'aspect démographique des malades greffés :

#### 1) L'Age :

Nos malades greffés présentent un âge jeune avec une moyenne de **26 ans**. Ces résultats sont comparables avec une étude japonaise qui a fait ressortir que l'épidémiologie de la greffe rénale pouvait être influencée par certaines spécificités culturelles et sociologiques. Ainsi, au Japon, les patients transplantés sont de plus en plus jeunes (**30,2 ± 10,8 ans** pour les hommes, et **36,4 ± 8,4 ans** pour les femmes) (156).

#### 2) Le Sexe :

Une prédominance masculine est notée chez les malades greffés, objet de notre étude. Cela est tout à fait logique au vu du nombre plus important d'hommes par rapport aux femmes enregistrées dans notre échantillon.

### X-La survenue du rejet de greffe (CHU de Blida):

Sur **66** malades transplantés, **17%** (11malades) ont développés un rejet pour le quel le manque d'informations ne nous permet pas de préjuger sur d'éventuels mécanismes qui en seraient à l'origine.

L'âge du receveur qui influencerait sur la survie du greffon, est un des paramètres rapporté par plusieurs publications(100).

Cependant des auteurs comme Bilgin, (25) ne rapportent aucune incidence de l'âge sur la survie du greffon.

Dans notre série d'étude il apparait que l'âge du receveur n'influx pas sur la survie de greffon. En effet les 11 malades qui ont développé un phénomène de rejet ont une moyenne d'âge égal à **28ans**, avec des extrêmes allant de **10** ans jusqu'à **57** ans et réparti en **8** hommes et **3** femmes.

### **XI- La compatibilité HLA chez les malades greffés et chez ceux qui ont fait un rejet:**

En transplantation rénale, la compatibilité HLA a montré un effet bénéfique sur le devenir du greffon d'un donneur vivant(173).

Toutes les études, en transplantation rénale à partir d'un donneur vivant ont conclu à une meilleure survie des greffons réalisées en situation identique. Sur une large série (N=62000), l'UNOS (United Network for Organ Sharing) fait état d'une survie du greffon à 1an de **95%** (N= 4446) pour les patients HLA identiques et de **90%** (N= 16495) pour les patients HLA semi identique (155).

Dans notre série d'étude, la sélection des couples D/R basée sur l'impact de compatibilité HLA sur la survie du greffon a fait que 80% des greffes ont été réalisés sue des couples HLA semi identiques, et que 19% ont été effectués sur des couples identiques. Notre échantillonnage c'est-à-dire les 359 couples étaient compatibles dans 99% des cas (répartition en identique et semi identique).

A cela il est utile de préciser que sur les 11 greffés présentant un phénomène de rejet, 7 sont en compatibilité semi identique, 3 en compatibilité identique et 1 non identique chacun avec son donneur.

### **XII- L'état immunitaire des malades greffés :**

En ce qui concerne l'état immunitaire de nos patients greffés c'est-à-dire 128, on a noté que **10%** d'entre eux, qui ont donné un cross match négatif, étaient positifs en Ac anti HLA (de classe I et /ou II) lors du bilan immunologique pré greffe. Pour ceux là, il ya lieu de confirmer l'existence de DSA ou non, afin d'exclure tout donneur possédant des Ag interdits pour le receveur.

Pour ce qui est des malades greffés au CHU de Blida c'est-à-dire 66, **7%** des patients avec réaction de cross match négative étaient positifs en Ac anti HLA (de classe I et /ou de classe II) lors de bilan immunologique pré greffe et pour lesquels se pose le même souci de confirmation que celui cité ci-dessus.

Par contre, les malades greffés qui ont développés un phénomène de rejet c'est-à-dire 11 ou 17%, ont tous donné un résultat négatif concernant la présence d'Ac anti HLA lors du bilan pré greffe. Ces mêmes malades ont tous présenté une réaction de cross match négative et une compatibilité HLA pour la majorité (seulement un seul cas non identique).

Le manque de données sur ces épisodes de rejet (date de rejet, la nature de rejet,...) ainsi que l'absence de mise en place de programme pour le suivi des post greffés ne nous permet pas d'évaluer les causes de rejet en ce qui nous concerne c'est-à-dire l'impact immunologique.

# Conclusion

### Conclusion :

...Meilleure survie du patient, meilleure survie du greffon, meilleure qualité de vie surtout à long terme c'est les trois points capitaux qui résument l'effet bénéfique que rapporte la transplantation rénale aux patients en insuffisance rénale chronique par rapport à la dialyse.

Cet acte dépend principalement de la réponse immunitaire du patient contre le greffon, qui pourra dans certaines situations conduire à sa perte.

Pour en éviter ce constat, les patients doivent être soumis à un suivi immunologique convenable, qui repose essentiellement sur la constitution de la sérothèque en pré et post greffe qui permettra d'évaluer le risque de rejet et de surveiller l'apparition de signe de dysfonctionnement rénale afin d'instaurer un traitement précoce et adéquat.

D'où l'intérêt de notre travail qui a fait ressortir l'importance majeure de la surveillance immunologique des malades :

-En amont de la transplantation par l'établissement d'un bilan d'histocompatibilité y compris la surveillance d'une éventuelle allo immunisation à chaque fois qu'il est nécessaire.

-En aval de la transplantation par la recherche systématique d'Ac anti HLA complétée par d'autres bilans nécessaires pour le suivi des transplantés.

L'analyse de notre série, portant sur 359 couples, dont 128 transplantations à partir du donneur vivant sur une période de 6 ans, montre que les résultats sont parfois satisfaisantes et comparables à ceux de la littérature, chose qui doit être signaler afin de mettre en évidence le rôle primordial exercé par l'unité d'histocompatibilité de Hassiba Ben Bouali dans la chaîne de suivi. On a noté également parfois des discordances des résultats obtenus avec celles de la littérature, cette discordance peut être la cause indirecte du manque des informations récoltés par difficulté d'accès aux données.

Au terme de cette étude, on a essayé d'atteindre l'ensemble de nos objectifs tracés au départ, dont on a essayé d'évaluer la qualité de la prise en charge des malades ainsi que les moyens de leur suivi, et à proposer un protocole afin d'assurer la réussite de la TR.

Concernant le reste des objectifs établis pour le suivi des malades en post greffe, la difficulté d'accès aux données nous a empêchés à accomplir notre étude.

Comme clôture de notre étude, on s'est mené à souligner certaines recommandations, ils s'agissent de :

- ✓ Etablir une base de donnée la plus complète possible représenté par le dossier de malade et reporté sur un fichier informatisé afin d'être facilement consultable.
- ✓ Construire une bonne sérothèque en amont et avale de la transplantation, élément clé de la fiabilité de la recherche et d'identification des Ac.

- 
- ✓ Améliorer la mise en évidence d'une allo-immunisation en matière de la sensibilité et la spécificité des techniques par l'introduction de la nouvelle technologie (Elisa single Ag, LUMINEX...).
  - ✓ Créer de forts liens de collaboration entre les professionnels de santé principalement du service de néphrologie et le laboratoire d'histocompatibilité.
  - ✓ Etablir une bonne communication entre les différents centres nationaux de transplantation.
  - ✓ Se référer aux agences internationales concernant les nouvelles recommandations et les mises à jour.
  - ✓ Améliorer l'accès à la greffe et cela par :
    - L'inscription précoce des malades en vue d'une transplantation, dès le passage de leur insuffisance rénale au stade terminal.
    - La non exclusion du donneur présentant un CXM positif de classe II avec le receveur en prenant en compte des mesures nécessaires.
    - Amélioration du système de répartition des greffons en adoptant l'approche du don croisé entre donneurs vivants.
    - La sensibilisation de la population pour la greffe à partir d'un donneur cadavérique
    - L'introduction des programmes pour les patients présentant des difficultés d'accès à la greffe : programme Hyper immunisé Antigène Permis (HAP) par exemple.

## Référence bibliographique :

01. Abbadi M.C, Amroun H, Benhalima M et coll : Atelier algérien sur HLA institut pasteur, 2006 : 11-30.
02. Abbal Michel, Lionel, Rostaing Greffes et Transplantations. 2012-2013
03. Abbal Michel, système HLA DIU de transplantation. PTT, 2009.
04. Abul K, Abbas, Andrew H, Lichtman et coll. les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Elsevier 2005 : p 196.
05. Amouraa Souhila, Valérie Duboisb, Malika Bouali, Benhalima. Revue Francophone Des Laboratoires : Actualités 2012 En Immunologie. La technologie de phase solide pour la détection des anticorps HLA ELISA versus Luminex® : les défis de l'interprétation 2012 N°444.
06. Amroun Habiba., technique de typage HLA et de recherche des Anticorps Anti-HLA, laboratoire de complexe HLA et d'auto-immunité, institut Pasteur d' Alger. 2005 : p.25
07. Amroun Habiba, techniques de typage HLA et de recherche D'anticorps anti HLA, laboratoire de complexe HLA et d'auto-immunité, institut pasteur d'Algérie 2005 :5-6
08. Anglicheau D, Loupy A, Suberbielle C et coll, Post-transplant prophylactic intravenous immunoglobulin in kidney transplant patients at high immunological risk: a pilot study. Am J Transplant 2007; 7: 1185-92.
09. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R et coll. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. Proc Natl Acad Sci USA . 2009. 106 : 5330-5335.
10. Anglicheau D, Zuber J, Martinez F et coll. Transplantation rénale : réalisation et complications. EMC 2007. 18-065-E-10.
11. Ansermot Nicolas, Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées en Pharmacie Hospitalière .Dosage sanguin d'immunosuppresseurs : mise au point d'une methode d'analyse par chromatographie liquide couplée a la spectrometrie de masse. 2004 : 2-26.
12. Ashwell JD, Chen C, Scwartz RH. High frequency and nonrandom distribution of alloreactivity in T cell clones selected for recognition of foreign, 1986, 136(2):389-95.
13. Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue française , PDF, Université Médicale Virtuelle Francophone ,2010: 9-17.
14. Baker RJ et coll, Loss of direct and maintenance of indirect alloresponse in renal allograft recipients: implications of the pathogenesis of chronic allograft nephropathy .J Immunol 2001 et Ng WF, Hernandez-Fuentes MP et coll .2001. 108. 1283-1290.
15. Barkley Sc, Sakai Rs, Ettenger Rb et coll. Determination of antiidiotypic antibodies to antiHLA IgG following blood transfusions. Transplantation 1987. 44. 30-34.
16. Barrou B, et coll. Transplantation rénale à partir de donneurs vivants apparentés. Expérience de la Pitié Salpêtrière.Séminaire D'uro-néphrologie Paris.1995.
17. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD et coll. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. Am J Transplant. 2004 : 4 : 996-1001.
18. Benhalima, Thèse de doctorat : implication de système HLA dans la transplantation rénale a partir du donneur vivant apparente, 2005 :33-

19. Benhalima. Bouali, Daoudi, la transplantation a partir du rein d'un donneur en état de mort encéphalique, 2009 :2-10.
20. Benichou G, Fedoseyeva E, Lehmann PV et coll, Limited T cell reponse to donor MHC peptides during, 1994, 153, 938-945.
21. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS, Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice *J Immunol* .1999,1;162(1):352-8.
22. Benseffaj , O. Atouf, M. Essakalli et coll .Préparation Immunologique A La Transplantation Rénale , Quatrièmes Journées de la Société Marocaine d'Immunologie Décembre 2012.
23. Bernard A, Coitot S et coll, Tand B cell cooperation a dance of life and death. *Transplantation* 2005. 15:79(3 Suppl):S8-S11.
24. Bevan M. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* .1984. 5: 128.
25. Bilgin N, et coll. Outcome of renal transplantation from elderly donors. *transplant*. 1998. 30. 744-746.
- 26 . Billen EV, Voorter CE, Christiaans MH et coll, Luminex donor-specific crossmatches. *Tissue Antigens*. 2008 Jun;71(6):507-13.
27. Bonhoff C , Sawyer T , Blair A et coll , Isolation Of B Lymphocytes For HLA DR Typing Using Monoclonal Antibodies . *J Immunol . Methods* 1986, 91 : p 175 -180.
- 28 . Brick C A, Ouafaa, B, Essakalli Malika, Rejet Immunologique De La Transplantation Rénale : Mecanismes Et Prevention , Quatrièmes Journées de la Société Marocaine d'Immunologie, Décembre 2012.
29. Broyer M, Brunner Fp, Brynner H et coll. Demography of dialysis and transplantation in Europe. 1984. Report from the European Dialysis and Transplant Association Registry. *Nephrol Dial Transplant* 1986 1 : 1-8.
30. Broyer Michel. La transplantation rénale avec donneur vivant Aspects particuliers dans le cadre des maladies rénales transmises génétiquement. *AIRG France* :2-5.
31. Bryce A et coll. Immunosuppression Chez Le Transplanté Rénal : Les Recommandations Cliniques Factuelles Du KDIGO *Am J Transplant* 2009; 9(suppl 3):S1-S155.
32. Bunnapradist S, et coll, Graft survival following living-donor renal transplantation: a comparison of tacrolimus and cyclosporine microemulsion with mycophenolate mofetil and steroids, *Transplantation* 2003, 76 : 10-15.
33. Burtey S et coll, Anémie de l'insuffisance rénale chronique [18-062-C-10] - Doi : 10.1016/S1762-0945(06)40516-7 EMC 2006.
34. Busson TL, Hiesse C et coll, Lymphocytotoxic antibody responses to one prospective HLA-DR typed blood transfusion in naive patients awaiting renal transplantation 1997.
35. Bux J et coll. NA gene frequencies in the German population. determined by PCR with sequence-specific primers. *Transfusion* 1995 . 35(1):54-7.
36. Bux J et coll, Quantitation of granulocyte antibodies in sera and determination of their binding Sites . *Br J Haemat* 1992, 282 : 20-5.
37. Candon S. Transplantation rénale. aspects immunologiques. *Néphrologie* 2007 : 4-31
38. Canivet Cindy : thèse de doctorat de l'université de toulouse , Apport du suivi pharmacodynamique des immunosuppresseurs en transplantation d'organes le 7 mai 2009 : 26-31.
39. Carter V, Shenton BK et coll, Vimentin antibodies ; a non-HLA antibody as potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc* 2005, 37(2) :654-7.



62. Ensminger SM, Spriewald BM et al. CD8+ T cells contribute to the development of transplant arterio sclerosis despite CD154 blockade, *Transplantation* 2002, 73, 1068-74.
63. Essakalli M, PDF Technologie Luminex applications et Perspectives, Service de transfusion et d'hémovigilance Hôpital Ibn Sina :5-44.
64. European Society for Organ Transplantation (ESOT) , The Authors. *Transplant International*, nov 2012.
65. Everly, M.J, et coll, Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. *Am J Transplant*, 2009, 9(5): p. 1063-71.
66. Falconi Isabelle, Hourmant Maryvonne, Bitker Marc-Olivier et coll. Prévention du rejet aigu de greffes rénales : place des anticorps monoclonaux : évaluation clinique. Évaluation pharmacoéconomique. Dossier CNHIM « Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament ». *Revue d'évaluation sur le médicament* . Publication bimestrielle février 2004. XXV, 1 :18-26.
67. Fedoseyeva EV, Zhang F et coll. De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process *J Immunol* 1999 et Ng WF, Hernandez-Fuentes MP et coll 2001:525–533.
68. Feucht He, Schneeberger H, Hillebrand G, et coll, Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993, 43: 1333-1338.
69. Forquet F, le Complexe Majeur d'Histocompatibilité et la Présentation antigénique, PDF. P02.
70. Gagne Katia, Typage HLA par biologie moléculaire en vue de greffe de CSH, PDF 2013.
71. Garovoy , Rheinschmilt, Bigos et coll. Flow cytometry analysis : a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant Proc* 1983, 15: 1939-1941.
72. Georgescu S, Ferrari-Lacraz J, Villard et coll. Anticorps anti-HLA et rejet en transplantation rénale : impact des nouvelles techniques de détection. *Revue Médicale Suisse* N° 108. 2007. Numéro d'article : 32215.
73. Gleason RE, Murray JE Report from kidney transplantation registry: analysis of variables in the function of human kidney transplants 1967, 36, 636-641.
74. Glotz D, Antoine C, Haymann J.-P et coll , transplantation rénale de patients immunisés dans le système hla et immunoglobulines intraveineuses , actualités néphrologiques 2000 : 1-11.
75. Glotz D, Antoine C, Julia P et coll. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg), *Am J Transplant*, 2002, 2, 758-760.
76. Glotz D, Haymann Jp, Niaudet P et coll, Successful kidney transplantation of immunized patients after desimmunization with normal human polyclonal immunoglobulins for intravenous use (IVIg). *J Am Soc Nephrol*, 1993, 4, 937.
77. Golshayan C et Coll, Maladies rénale et grossesse, *Revue médicale Suisse*, 2007. N°101 Numéro d'article : 32119.
78. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery et al Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal –allograft rejection *Med* 2001 .
79. Hadaya Karine. *Transplantation Renale / Prise En Charge clinique et tests de laboratoire* .HUG, 2010, PDF: p 35.
80. Hallooran PF Immunosuppressive drugs for kidney transplatation . *N Eng J Med* 2004. 351:2715-2729.
81. Hara S, Matsushita H et coll, Allograft glomerulitis ; Histologic characteristics to detect chronic humoral rejection, *Transplant Proc*, 2005, 37: 714–716.

82. He C, Heeger PS et coll. CD8 T cell can reject major histocompatibility complex class I deficient skin allografts *Am J Transplant* 2004, 4, 698-704.
83. Hiesse C, Kriaa F, Rousseau P et coll. Immunoabsorption of anti-HLA antibodies for highly sensitized patients awaiting renal transplantation, *Nephrol Dial Transplant*, 1992, 7, 944-951.
84. Hollomby David, Nickerson Peter et coll, Le conseil canadien pour le don et la transplantation : évaluation et gestion du risque immunologique lié à la transplantation, 2005 .
85. Homberg J-C, *Immunologie fondamentale : 2eme cycle des études de médecine, de pharmacie, d'odontologie*, 1999 :35-42.
86. Honjo K et coll, Tcell receptor transgenic Tcells alone can reject vascularized heart transplants through the indirect pathway of alloantigen recognition. *Transplantation* 2004, 15;77(3):452-5.
87. Hoogenboom HR, Chames P. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology Today*. 2000; 8: 371-8.
88. Houzet A, these de doctorat : signification clinique de la presence d'AC anti HLA après transplantation renale. 2003 :6-48.
89. Ishii Y, Sawada T, Kubota K et coll .Loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy, *Transplant Proc*, 2005; 37: 981-983.
90. Jiang S, Herrera O et coll, New spectrum of allorecognition pathways : implication for graft rejection and transplantation tolerance, *Immunol*, 2004, 16(5):550-7.
91. Jocelyne OTZ, Afssaps :Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale, 2011 : 2.
92. Jollet I, Labo HLA Poitiers : Structure Et Détermination Des Ag HLA Recherche D'Ac Anti-Hla Techniques De Cross-Match PDF 2009.
93. Jordan. *New England Journal of Medicine*, 2008.
94. Jordan Sc, Quartel Aw, Czer Ls et coll. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. *Transplantation*. 1998; 66. 800-805.
95. Jordan S. IVIg vs plasmapheresis for desensitization : which is better ? *Am J Transplant* 2006 : 6 : 1510-1.
96. Jacson G, Einsele H, Moreau P et coll. Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Treat Rev*, 2005, 31: 591-602.
97. Kapessidou Y, Habran C, Buonocore S et coll, The replacement of graft endothelium by recipient tye cells conditions allograft rejection mediated by indirect pathway CD4+ Tcell. *Transplantation* 2006, 27; 82(4):582-91.
98. Karulin AY, Hesse MD, Tary-Lehmann M, Single cytokine producing CD4 memory cells predominante in type 2immunity, *J Immunol* 2000, 164, 1862-72.
99. Katovich Carolyn ,Hurley, C.W. Bill, Young Marrow Donor Recruitment and Research Program – DNA methods for HLA typing a workbook for beginners.2008. 7: P 67.
100. Kerr SR, et coll, Living donors >55ans To use or not to use. 1999. 67. 999-1004.
101. Khayyamian S, Hutloff A et coll. Expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Thé cytokine secretion by memory CD4+ T cells *USA* 2002. 99, 6198-203.
102. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, et coll. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966. 24;2(7465):662-665.

103. Kreisel D et coll. et Krasinskas AM et coll. Non hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection : an alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med* 2002;8 :233-239.
104. Kreisel D, Krupnick AS et coll, Vascular endothélium does not activate CD4+ direct allorecognition in graft rejection *J Immunol* 2004, 1;173(5):3027-3034.
105. Krzesinski JM et coll, Prévention de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte. *Rev Med Liège* 2003, 58 (6) : 369-77.
106. Kuypers DRJ, Benefit, risk assessment of sirolimus in renal transplantation. *Drug safety* 2005; Volume 28, Issue 2 : 153-181.
107. Labalette .M. et coll; complexe majeur d'histocompatibilité HLA, polymorphisme et présentation des antigènes aux lymphocytes. PDF,p. 2-5.
108. LABScreen® one lambda Inc notice de produit.
109. Lachmann N. et coll. Anti human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2009. 87(10):1505-13.
110. L'agence de la Biomedecine . La greffe à partir d'un donneur vivant : une très bonne solution quand elle est possible 2012
111. l'agence de la Biomedecine , le plan greffe 2012-2016 , p 9.
112. Lakkis FG, Arakelov A, et coll, Immunologic ignorance of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue 2000, 6(6):686-8.
113. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Stroberty E, et coll. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant*, 2005; Volume 5, Issue 3: 443–453.
114. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M et coll. Migration of Langerhans cells in skin transplantation and explants. 1990;172: 1483-93.
115. Laugan LL, Park LP et coll . post transplant HLA class II antibodies associated with poor kidney graft survival . *Am J transplant* .2007 :7(4): 847-56.
116. Laure Emmanuelle Croze , these de doctorat : recherche d'un effet protecteur de HLA G membranaire et soluble contre la toxicité des Acs anti HLA dirigés contre le donneur en transplantation rénale 19 Oct 2011 : p16- 40.
117. Lechler RI, Lombardi G .et coll, The molecular basis of alloreactivity . *Immunol Today* 1990, 11(3):83-8.
118. Lechler RI , Batchelor JR, Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts, Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient 1982, 1;156(6):1835-41.
119. Lee. P.C., et coll, HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss, *Transplantation*. 2009; 88(4):568-74.
120. Lefaucheur Carmen, Glotz , Hôpital Saint-Louis, Paris Denis.
121. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Glotz D et coll. Clinical Relevance of Preformed HLA Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplantation. 2009;162:1-12.
122. Lefrere Jean Jacques, Schved Jean Francis : livre : transfusion en hematologie .2010 p150 .
123. Legendre, C. et coll; Transplantation rénale chez les personnes à « haut risque immunologique». *Actualités nephro* 2007, chap 21,10 :10-40 p.226.
124. Legendre C, Man N K, livre Insuffisance Rénale Chronique traitement –prévention. 2001 :p158.

125. Legendre C. Nouveaux traitements immunosuppresseurs. Actualités et perspectives en transplantation . 2007 Elsevier-Masson SAS . Transplantation.book 2007. 6:08 06 :32-42.
126. Lemy A. Do MICA antibodies impact on renal graft outcomes. Clinique de Transplantation Rénale these de doctorat. université Libre de Bruxelles. CUB-Hôpital Erasme. p6.
127. Li B, Hartono C, Ding R et coll, Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine, *N Engl J Med* 2001;344(13), 2001:947-54.
128. Loichot C , Les immunosuppresseurs , Faculté de Médecine de Strasbourg , 2008 :2-7
129. Lukovsky M ,Vo Aa. , Toyoda M et coll, Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation, *N Eng J Med*, 2008 ;359 : 242-251.
130. Maclennan IC, Toellner KM et coll. Extrafollicular antibody reponses. *Immunol Rev.* 2003. 194: 8-18.
131. Macleod Am, Al-Murarai Ia, Innes A et coll. Modulation of lymphocytotoxic activity in highly sensitized patients by anti-idiotypic antibodies. *Transplantation Proc.* 1989. 21:756-757.
132. Manz RA Theil A et coll. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature.* 1997. 16: 2996–3006.
- 133 . Mao Q et coll. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant.* 2007;7(4): 864-71 .
134. Martinez Ganzalo, Détection de l'allele HLA B\*5701 préalable à la prescription d'abacavir. Rapport d'évaluation HAS 2009 : p 09.
135. Matas AJ ,frey DJ, Gillingham KJ et coll, The impact of HLA matching on graft survival and on sensitization after a failed transplant evidence that failure of poorly matched renal transplants does not result in increased sensitization transplantation ,1990 ;50 ,4 :599 -607.
136. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment, 2002 Nov;11(6):609-18.
137. Mauiyyedi S , Crespo M , Collins AB et coll. Acute humoral rejection in kidney transplantation II : morphology, immunopathologic classification . *J Am Soc Nephrol* 2002 . 13 .3: 779-87.
138. Mauiyyedi S , Pelle PD . Saidman S et coll. chronic humoral rejection . identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in Deposits in Peritubular Capillaries . *J Am Nephrol* 2001 . 12 .3 :574-82.
139. Mercier B, Ferec C, *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée* . 2004 :181–187.
140. Metras : Transplantations d'organes ( aspects épidémiologiques et immunologiques- principes de traitement et de surveillance- complications et pronostic- aspects éthiques et légaux) Faculté de Médecine de Marseille, Mai 2005.
141. Miceli C. et coll, l'immunopathologie pour le praticien chapitre 8, les facteurs génétiques : les molécules HLA et les molécules apparentées :6-8.
142. Mihaylova A, Baltadjieva D, Boneva P et coll . Clinical relevance of anti-HLA antibodies detected by flow-cytometry bead-based assays--single-center.experience. *Hum Immunol* 2006 :67 :787-94.
143. Mizutani K, Terasaki Pet. et coll, Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J. Transplant* 2005. 5 : 2265-2272.
144. Moalic V. Réanimation. Comment Est Réalisé Un Typage HLA . 2008.

145. Monteiro F, Buelow R, Mineiro C et coll. Identification of patients at high risk of graft loss by pre- and posttransplant monitoring of anti-HLA class I IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Transplantation*. 1997 ;63:542-546.
146. Montgomery Ra, Zachary Aa. Transplanting patients with a positive donor-specific crossmatch: a single center's perspective, *Pediatr Transplant*, 2004, 8: 535-542.
147. Mora JK et coll, T cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges *Trends Immunol* 2006, 5: 491–504.
148. Morath C, Schwenger V, Beimler J et coll, Antifibrotic actions of mycophenolic acid. *Clin Transplant* ,2006 ; 20(Suppl. 1) :25–29.
149. Moura LRR, Torres MA, Tonato EJ et coll, Diagnosis and treatment of acute antibody-mediated rejection in renal transplant: the role of C4d and donor-specific antibody identification 2009 . 7(4 Pt 1) : 427-35.
150. Muthukumar T , Dadhania D et coll. Messenger RNA for FOXP3 in urines of renal allograft recipients. *N Engl J Med* 2005.353(22) :2342-51.
151. National Kidney Foundation “K/DOQI”. Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002: 39.S1-266.
152. Nuyts Gd, Van Vlem E, Thys J et coll. New occupational risk factors for chronic renal failure. *Lancet* 1995 346 : 7-11.
153. Okasaki O, Sato T et coll, Donor specific blood transfusion in living related transplantation 1997 ; 29 (1-2): 200.
154. Opelz G, Graver B et coll, Lymphocytotoxic antibody responses to transfusions in potential kidney transplant recipient , *Transplant*, 1981 :592.
155. Opelz G, et coll, HLA compatibility and organ transplant survival *Rev Immunogenet*. 1999, 1, 334-342.
156. Oat K, et coll . A ten-year follow-up study of renal transplant recipients treated with cyclosporine. *Clinical Nephrology*. 2000 ;5 : 69-2067.
157. Overweg J, Engelfriet CP Cytotoxic leucocyte isoantibodies formed during the first pregnancy *Vox Sang* 1969, 16(2) :97-104.
158. Pacheco-Silva A, Nishida SK, Silva MS et coll. Serum beta 2 microglobulin (beta 2M) following renal transplantation. *Rev Assoc Med Bras*. 1994 , 40:172-8.
159. Palomar R, Lopez-Hoyos M et coll. Impact of HLA antibodies on transplant glomerulopathy. *Transplant Proc* 2005, 9: 3830-3832.
160. Patel R, et coll, Significance of the positive cross match test in kidney transplantation. *N Engl J Med*, 1969, 280 (14), 735-739.
161. Petri B, Bixel MG Molecular events during leucocyte diapedesis *FEBS J* 2006, 273(19):4399-407.
162. Pietra BA et coll, CD4 T cell mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II *Clin Invest*, 2000, 106(8):1003–1010.
163. Pigneret-Bernard Stéphanie, Education thérapeutique du patient transplanté renal : impact d'une intervention pharmaceutique ? Mémoire du diplôme d'études spécialisées de pharmacie hospitalière septembre 2008 : p26.
164. Porter CJ, Ronan JE et coll. Fas –fas ligand antigen expression and its relationship to increased apoptosis in acute renal transplant rejection *Transplantation* 2000, 27:69(6):1091-4.
165. Prada Bordenave Emmanuelle, Belghiti Jacques , Lebrec Didier et coll, Recommandations Formalisées d'Experts sur le prélèvement et la greffe à partir de Donneur Vivant (Agence de la biomédecine ,Association de Chirurgie Hépato-Biliaire et de Transplantation hépatique (ACHBT)

- .Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF) .Association Française d'Urologie (AFU)  
 .Société de Néphrologie (SN) .Société Française .  
 Société Francophone de Transplantation (SFT) ) 2009.
166. Rebibou JM. Anticorps anti HLA en transplantation rénale . le courrier de la transplantation N°4,2004 :192-198 .
  167. Rebibou JM , de nouveaux marqueurs biologiques et la tolérance chez l'homme? . le courrier de la transplantation N°1 2009 : 10-13.
  168. Rebibou Jean-Michel, DIU immunologie et biothérapies 2011.
  169. Reed E, Hardy M, Benvenisty A et coll, Effect of anti-idiotypic antibodies on graft survival in renal allograft recipients, *N Engl J Med*, 1987, 316: 1450-1455.
  170. Richards DM, Dalheimer et coll, 2004.
  171. Riethmüller et coll, *Transplantation* 2010.
  172. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD et all Effector mechanisms in transplant rejection .*Immunol Rev* 2003, 196:51-64.
  173. Rosenberg JC et coll. HLA and clinical solid organ transplantation : a review of the literature of the 90 s In *HLA*. 1997. Eds. PI Terasaki and DW Gjertson UCLA Tissue Typing Laboratory Los Angeles USA 1997 :7-38.
  174. Rothstein DM, Sayegh MH T. cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance .*Immunol Rev* 2003, 196: 85–108.
  175. Rotzsche O , Falk k , Faath S, Rammensee HG, On the nature of peptides involved in Tcell alloreactivity *J Exp Med* 1991, 174:1059-71.
  176. Rudiger Bumester G et coll, *Atlas de poche d'immunologie*,1998 :44-48.
  177. Rudolph MG, Stanfield RL ,Wilson IA. How TCRs bind MHCs peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006, 24:419-66.
  178. Salah H, et coll, A propos d'une étude prospective effectuée au CHU Messous entre 1983 et 1985. Conférence internationale sur la transplantation rénale en Algérie. 1985.
  179. Scornik Jc, Ireland Je. Salomon Dr et coll, Pretransplant blood transfusions in patients with previous pregnancies, *Transplantation*. 1987, 43 : 449-450. et Jean- Claude Immunologie fondamentale Homberg édition : Estem 1999] .
  180. Scornik Jc, Ireland Je, Howard Rj et coll, Assessment of the risk for broad sensitization by blood transfusions, *Transplantation*. 1984, 37:249-253.
  181. Sébahoun G.: hématologie clinique et biologique. p.498. 2005.
  182. Shapiro-Shelf M et coll, Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005, 2: 593–604. 2004.
  183. Shen L, Rock KL. Priming of T cells by exogenous antigen crosspresented on MHC class II molecules 2006,18(1):85-91.
  184. Silbiger Sr, Neugarten J, The impact of gender on the progression of chronic renal disease . *Am Kidney Dis* ,1995 25 : 515-533.
  185. Smith KG, Hewitson et all The phenotype and fate of the antibody-forming cells of splenic foci . *Eur J Immunol* 1996, 4(2):107–111.
  186. Solez et coll, l'Inserm, *Transplantation d'organes quelles voies de recherche?* 2009 : 89-95.
  187. Solez et coll, 2007.
  188. Solez K. Colvin Rb, Racusen Lc et coll, Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008, 8(4) : 753-760.

- 189.** Sonkar G K, Usha, Singh R G. A preliminary study on the significant value of beta-2-microglobulin over serum creatinine in renal transplant rejection and renal failure. *Singapore Med J*, 2008 ;49 (10): 786-789.
- 190.** Stegall Md, Gloor J, Winters JI et coll. A comparison of plasmapheresis vs high-dose IVIG desensitization in renal allograft recipients with high levels of donor specific alloantibody. *Am J Transplant*, 2006 ; 6: 346-351.
- 191.** Stegall Md, Nouvelles options thérapeutiques dans le rejet aigu humoral en transplantation rénale, actualités néphrologiques ,médecine sciences publications/lavoisier ,2011 :1-8
- 192.** Steinman RM, The dendritic cell system and its role in immunogenicity 1991, 9:271-96.
- 193.** Stroncek DF ; Plachta LB ; Herr GP et coll, Analysis of the expression of neutrophil specific antigens 1993,8, 119-23.
- 194.** Suberbielle Boissel C, PDF Examens d'Histocompatibilité Pré-Transplantation.
- 195.** Sylvie Ferrari-Lacraz ,HUG ,Les anticorps anti-HLA ont-ils une signification clinique dans la greffe de rein , p 47.
- 196.** Takemoto S, Sensitization and cross match. eds Clinical transplants In : Cecka JM, Terasaki PI eds Clinical transplants 1995, chap 34 Los Angeles CA : UCLA Tissue Typing Laboratory. .
- 197.** Terasaki PI, Cai J . Humoral theory of transplantation : further evidence. *Curr Opin Immunol* 2005 :17(5) : 541-5.
- 198.** Terasaki, PI, Ozawa M, Castro R, Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival, *Am J Transplant*, 2007; 7(2):408-15.
- 199.** Terasaki PI, Mizutani K et coll ,Antibody Mediated Rejection, *Clin J Am Soc Nephrol* . 2006 ,1: 400-403.
- 200.** Thunath O, Patey N et al Lymphoid neogenesis in chronic rejection : the murderer is in the house. *Curr Opin Immunol* 2006, 17(1):294-304. 21.
- 201.** Thomas C, Faller PH.D, Francis.L.Delmonico et coll, Boston Impact of blood transfusion on renal transplantation.
- 202.** Thomas A, Davis, Antonio J, Grillo-Lo'pez et coll, Rituximab anti CD20 monoclonal antibody therapy in non Hodgkin's lymphoma : Safety and Efficacy of Re-Treatment. *Journal of Clinical Oncology* 2000, Vol 18, No 17 (September): 3135-3143.
- 203.** Transplantation rénale PDF 23/03/ 2009.
- 204.** Transplantation rénale PDF cour.
- 205.** Trounstein ML ; Peltz GA ; Yssel Huizinga et coll. KW reactivity of cloned Expressed human FcγRIII *INT Immunol* 1990
- 206.** Valujskikh A The challenge of inhibiting alloreactive T- cell memory *Am J Transplant* 2006, 6(4):647-51.
- 207.** Vanhove Bernard , Anticorps monoclonaux en transplantation , Inserm U643, Nantes, ,Institut de transplantation et de recherche en transplantation (ITERT) *Medecine/Sciences*, 2009 ; 25 : 1121-5.
- 208.** Vanbourdolle Michel , livre infectiologie 2007 : 38-55.
- 209.** Vella JP et al 1997 et Preston EH et al 2004.
- 210.** Venetz Jp, Pascual M? New treatments for acute humoral rejection of kidney allografts. *Expert Opin Investig Drugs* .2007. 16 : 625-633.
- 211.** Verdal F, Gaudernack G , Funderud S et coll ,HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation . a fast reliable technique tissue antigens 1986 ,28: 301-308.

212. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A et coll .Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* .2005; 353(8) :770-81.
213. Warling Xavier .Actualités concernant la greffe rénale . CHR de la Citadelle . nephrologie immuno-infectieux 2007 .p 01.
214. Watschinger B, Pascual M. Capillary C4d deposition as a marker of humoral immunity in renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002 . Mizutani K, Terasaki P et coll 2006.
215. Wolfe RA, Ashby VB, Milford ELet coll. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341:1725-30.
216. Wolfgang Altermann, Gerald Schlaf, Anita Rothhoff et coll , High variation of individual soluble serum CD30 levels of pre-transplantation patients: sCD30 a feasible marker for prediction of kidney allograft rejection? , *Nephrol Dial Transplant*, 2007 ; 22: 2795–2799.
217. Yanai F, Ishii E et coll. Essential roles of perforin in antigen specific cytotoxicity mediated by human CD4+ T lymphocytes :analysis using the combination of hereditary perforin-deficient effector cells and Fas deficient target cells. *J Immunol*. 2003. 15: 170(4) :2205-13.
218. Yves Pirson et coll .Guide du patient candidat à une greffe rénale et/ou pancréatique . UTra GEndO 2010.
219. Yvon Lebranchu Gilles Blancho, Jacques Dantal, Jean Luc Taupin .Cibles et mécanismes d'action des immunosuppresseurs . PDF :1-11.
220. GE March.S et coll HLA Nomenclature Research Insitute. London.



# Annexe

### Annexe 1

**Tableau** : spécificités larges, subdivisions et spécificités associées. (3)

Spécificités larges (Broad)	Subdivisions (splits)
A9	A23, A24
A10	A25, A26, A34, A66, A6601, A6602
A19	A29, A30, A31, A32, A34, A74
A28	A68, A69
B5	B51, B52
B12	B44, B45
B14	B64, B65
B15	B62, B63, B75, B76, B77
B16	B38, B39
B17	B57, B58
B21	B49, B50
B22	B54, B55, B56
B40	B60, B61
B70	B70, B72
Cw3	Cw9, Cw10
DR2	DR15, DR16
DR3	DR17, DR18
DR5	DR11, DR12
DR6	DR13, DR14
DQ1	DQ5, DQ6
DQ3	DQ7, DQ8, DQ9
Dw6	Dw18, Dw19
Dw7	Dw11, Dw17
Bw4	B5, B13, B17, B27, B37, B38(16), B44(12), B47, B49(21), B51(5), B52(5), B53, B57(17), B59, B63(15), B77(15), A2403, A24(9), A23(9) A25(10), A32(19)
Bw6	B7, B8, B14, B18, B22, B35, B39(16), B40, B41, B42, B45(12), B46, B48, B50(21), B54(22), B55(22), B56(22), B60(40), B61(40), B62(15), B64(14), B65(14), B67, B70, B71(70), B72(70), B73, B75(15), B76(15).
<b>Spécificités associées</b>	
DR51	DR2, DR15(2), DR16(2)
DR52	DR3, DR5, DR6, DR11(5), DR12(5), DR13(6), DR14(6), DR17(3), DR18(3), DR1403, DR1404.
DR53	DR4, DR7, DR9

## Annexe 2 :

### **Classification de BANFF :**

Il existe maintenant une classification histologique dite de « Banff » des lésions de rejet et de toute autre lésion du transplant. Cette classification permet tout d'abord d'uniformiser les critères histologiques du rejet et ensuite de mieux apprécier le pronostic des lésions observées.

La classification initiale de Banff proposait de classer les rejets aigus en trois grades. Plus récemment, cette classification a été révisée en ajoutant de nouveaux critères diagnostiques permettant d'isoler les rejets aigus humoraux : la fixation de la fraction C4d du complément le long des capillaires péri-tubulaires, la présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre des antigènes HLA du donneur, la présence de polynucléaires neutrophiles dans les capillaires péri-tubulaires ou dans les glomérules et une fibrose intimale ou une nécrose tubulaire aiguë (Racusen LC, Colvin RB *et al* 2003)

### **Classification de Banff 1997 (modifiée en 2003).**

*Rein normal - lésions non spécifiques.*

*Rejet minime - rejet suspecté (borderline).*

#### **Rejet aigu humoral :**

- *I : nécrose tubulaire aiguë avec inflammation discrète et positivité du C4d sur les capillaires péri-tubulaires.*
- *II : capillarite avec margination des cellules inflammatoires et/ou thrombose, dépôts d'immunoglobulines et/ou de C4d.*
- *III : artérite (v3) avec inflammation transpariétale et/ou nécrose fibrinoïde de la paroi avec C4d (+).*




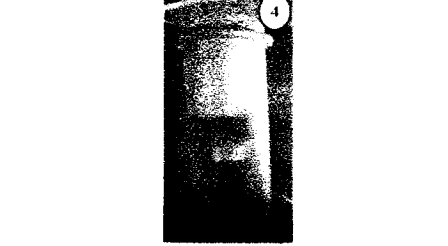
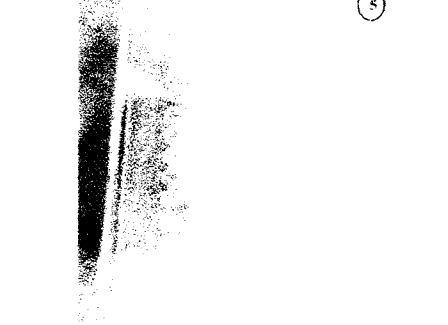
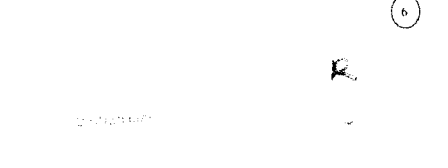

#### **Rejet aigu cellulaire :**

- *grade Ia : infiltration cellulaire significative avec tubulite (> 4 lymphocytes par section tubulaire) ;*
- *grade Ib : infiltration cellulaire significative avec tubulite (> 10 lymphocytes par section tubulaire) ;*
- *grade IIa : infiltration cellulaire significative avec artérite intimale (v1) ;*
- *grade IIb : artérite intimale sévère (> 25 % de la lumière vasculaire ; v2) ;*
- *grade III : artérite transmurale ou nécrose fibrinoïde de la paroi musculaire (v3).*

#### **Néphropathie chronique du transplant :**

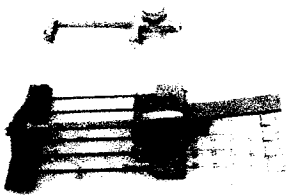
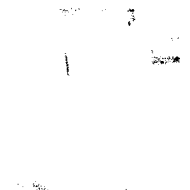
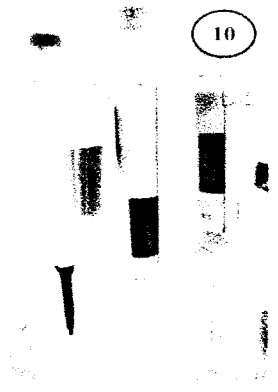

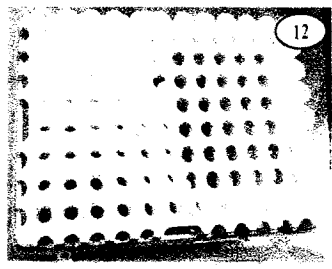
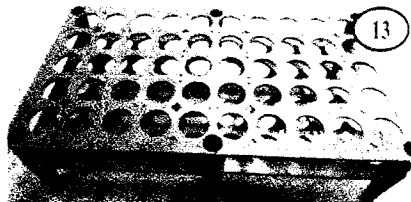
- *grade Ia : fines travées fibreuses (ci1) et atrophie tubulaire discrète (ct1) sans signe d'activité immunologique*
- *grade Ib : fines travées fibreuses (ci1) et atrophie tubulaire discrète (ct1) avec signe d'activité immunologique*
- *grade IIa : fibrose et atrophie tubulaire modérées (ci2 et ct2) sans signe d'activité immunologique ;*
- *grade IIb : fibrose et atrophie tubulaire modérées (ci2 et ct2) avec signe d'activité immunologique ;*
- *grade IIIa : fibrose diffuse (ci3), atrophie tubulaire étendue (ct3) sans signe d'activité immunologique ;*
- *grade IIIb : fibrose diffuse (ci3), atrophie tubulaire étendue (ct3) avec signe d'activité immunologique.*

Annexe 3 : Matériels non biologique utilisés au laboratoire

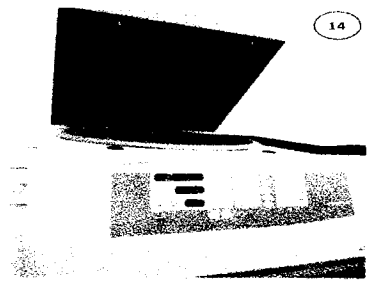
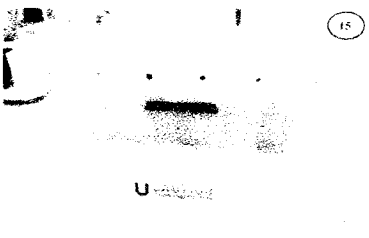
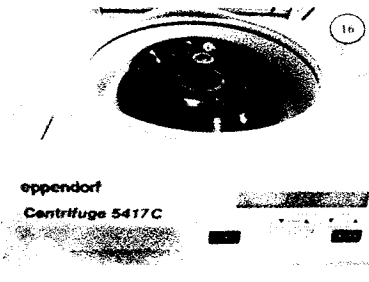
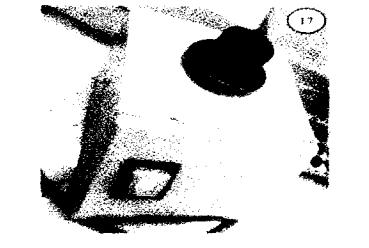

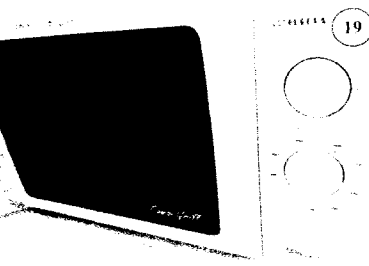
Numéro	Type	Photo
1	Tube à fond conique en plastique	
2	Tubes ACD	
3	Tube sec	
4	Colonne de Qiagen	
5	Plaque de Terasaki	
6	Cellules Malassez	
7	Eppendorf	


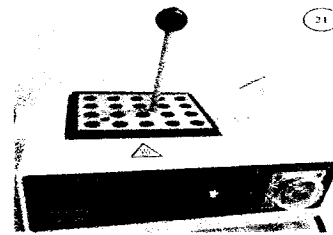
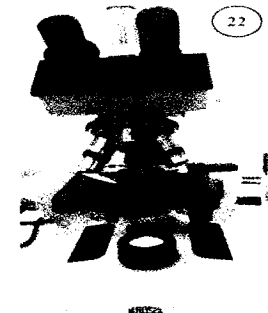
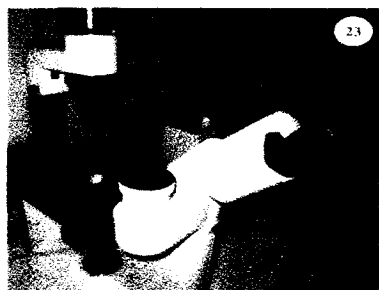
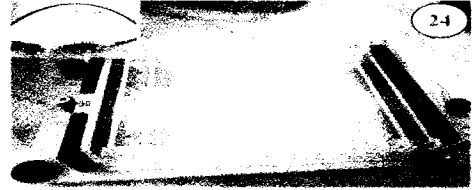
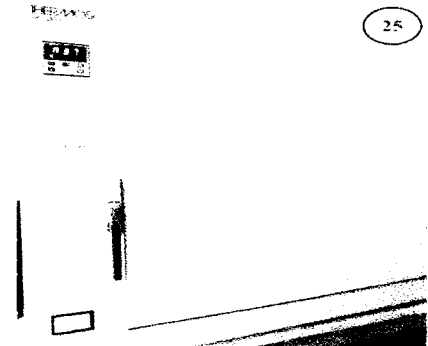
Matériel non biologique

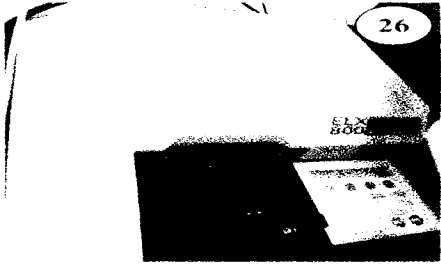
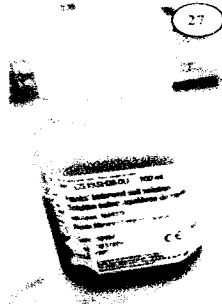
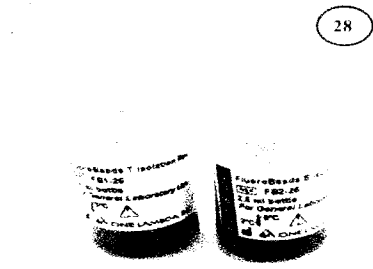
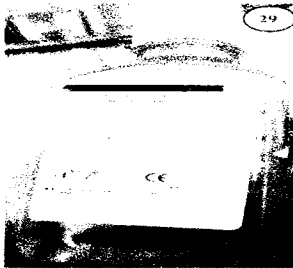
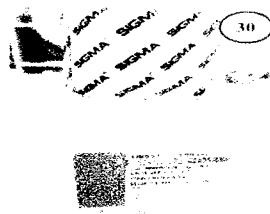
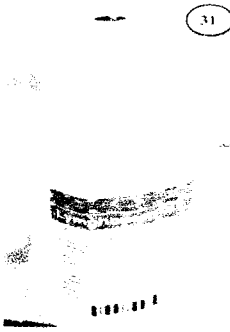
Verreries

	8	Seringue de Hamilton et multi seringue de Hamilton	 <span data-bbox="1183 168 1215 212">8</span>
	9	pissette	 <span data-bbox="1113 414 1152 448">9</span>
	10	Micropipette Et multimicropipette	 <span data-bbox="1121 761 1168 806">10</span>
	11	récipient en plastique	 <span data-bbox="1230 1187 1270 1232">11</span>
	12	Embouts	 <span data-bbox="1176 1433 1215 1478">12</span>
	13	Portoir pour tubes	 <span data-bbox="1223 1736 1262 1780">13</span>

Appareillages


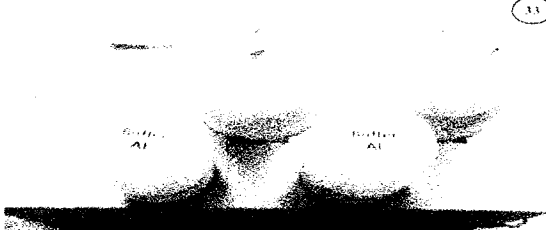
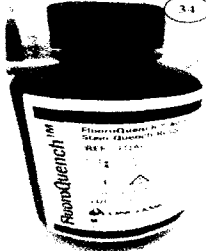
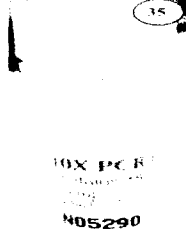

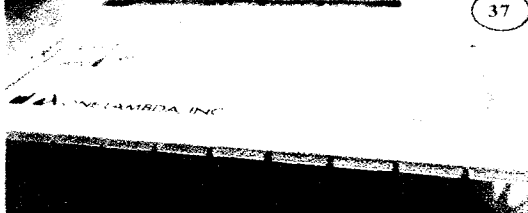

14	Centrifugeuse « THERMO... »	
15	Aimant « UCAUTION »	
16	Centrifugeuse des Eppendorf « Centrifuge 5417C »	
17	Vortex	
18	GelDoc™ XR+ « BIO RAD »	
19	Micro-onde	

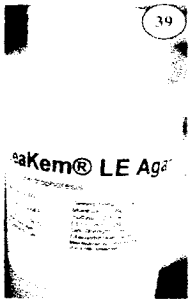
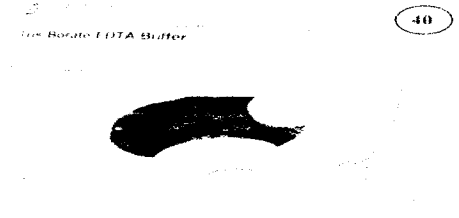
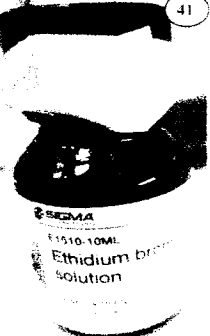
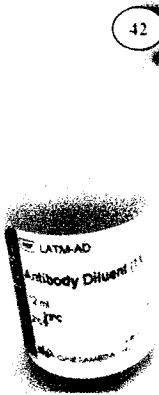
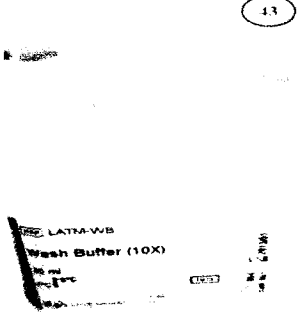
	<p>20</p> <p>Thermocycleur</p> <p>« GeneAmp* PCR system 9700 »</p>	 <p>20</p>
	<p>21</p> <p>Thermoblock</p> <p>« FALC »</p>	 <p>21</p>
	<p>22</p> <p>Microscope optique</p> <p>« KROSS »</p>	 <p>22</p>
	<p>23</p> <p>Microscope à fluorescence</p>	 <p>23</p>
	<p>24</p> <p>Champ de migration et voltmètre</p>	 <p>24</p>
	<p>25</p> <p>Etuve</p>	 <p>25</p>


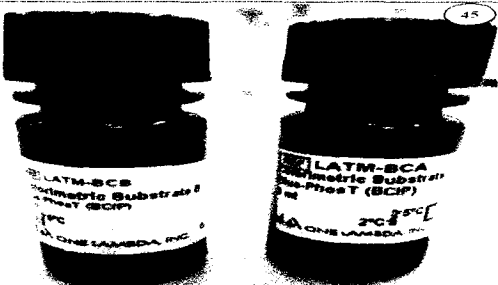

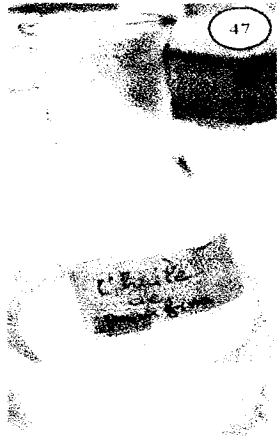
	26	L'appareil d'ELISA « ELX 800 »	
	27	Solution nutritive « HANKS BALANCED SALT SOLUTION »	
	28	Billes immunomagnétiques :  « FluoroBeads T » Et « Fluoro Beads B »	
	29	Tampon PBS : « phosphate buffered saline »	
	30	Solution saline :  « Dulbecco's Phosphate Buffered Saline »	
	31	Lymphoprep	



Réactifs

32	Réactif d'extraction par Quiagen	
33	Kit de Quiagen	
34	Colorant : Fluoroquench	
35	PCR buffer	
36	D-MIX	
37	Micro SSP™ DNA typing trays	
38	Taq polymérase	

	<p>39</p> <p>L'agarose : Sea Kem LE AGAROSE</p>	
	<p>40</p> <p>Tris Borate EDTA Buffer</p>	
	<p>41</p> <p>Solution de Bromure d'éthidium</p>	
	<p>42</p> <p>Diluant « ELISE » LATM-AD ANTIBODY Diluant</p>	
	<p>43</p> <p>Solution de lavage pour ELISA</p>	

	44	Le conjugué « phosphate alcalin »	
	45	Substrat d'ELISA « colorimétrique substrats A et B »	
	46	Stop solution	
	47	Huile de paraffine	
	48		

# Annexe4 : Le dossier du patient

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.MEGHLOUI (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<sup>ère</sup> dialyse : .....

### Vaccination :

Hépatite       Diphtérie       Tétanos   
Rougeole       Polio

Evénements immunisants :

1) Transfusions : Oui  Non

Si oui :

Spécifique : Oui  Non

Nombre : .....

Date : 1<sup>ere</sup> transfusion : .....

2<sup>eme</sup> transfusion : .....

3<sup>eme</sup> transfusion : .....

4<sup>eme</sup> transfusion : .....

Plus : .....

2) Grossesses : Oui  Non

Si oui :

Nombre :

Date : 1<sup>ere</sup> grossesse : .....

2<sup>eme</sup> grossesse : .....

3<sup>eme</sup> grossesse : .....

4<sup>eme</sup> grossesse : .....

Plus : .....

3) Transplantation ultérieure : Oui  Non

Bilan du receveur :

1) Groupe sanguin : ..... Rhésus D: ..... Phénotype : .....

2) Sérologie :

HBs : Pos  Nég

HBc : Pos  Nég

HBe : Pos  Nég

CMV : Pos  Nég

EBV : Pos  Nég

HIV : Pos  Nég

HTLV : Pos  Nég

Herpes : Pos  Nég

Syphilis : Pos  Nég

Toxoplasmose : Pos  Nég

Bilan demandé :

- Typage HLA

- Recherche d'anticorps anti-HLA

- Cross Match

- Autres :

DONNEUR :

Vivant

Cadavérique

NOM : ..... PRENOM : .....

Date et lieu de naissance: ..... à .....

Adresse : .....

Origine : ..... N° de tel :

Antécédents familiaux :

.....  
.....

Antécédents personnels :

.....  
.....

Lien de parenté avec le receveur:

.....

Bilan du donneur :

1) Groupe sanguin : ..... Rhésus D: ..... Phénotype : .....

2) Sérologie :

HBs : Pos  Nég  HBc : Pos  Nég

HBe : Pos  Nég  CMV : Pos  Nég

EBV : Pos  Nég  HIV : Pos  Nég

HTLV : Pos  Nég

---

N° de dossier :

## Fiche d'informations sérothèque

Pr A. MEGHIAOUI  
Dr Y. BOUCHEDOUB  
Dr M. L. BOUDJÉLLA

Nom : Prénom :  
Age : Pathologie initiale/origine :  
N° de tel : Adresse :  
Centre de dialyse : Médecin traitant :

Groupe sanguin :  
Donneur: Receveur  
Typage HLA :  
Donneur: Receveur

Date de prélèvement	Examens effectués	Résultats			
		AC		CXM	
		class S	class S	T	B

**CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BLIDA**  
**LABORATOIRE DE BIOLOGIE**  
**Unité Hospitalo-Universitaire d'Immunologie**

Blida, le :

Résultats du typage HLA et du Cross Match Initial

<u>RECEVEUR</u>	<u>DONNEUR</u>
Nom :	Nom :
Prénom :	Prénom :
<u>Technique de Microlymphocytotoxicité</u>	<u>Technique de Microlymphocytotoxicité</u>
HLA classe I :	HLA classe I :
HLA classe II :	HLA classe II :
<u>Technique de Biologie Moléculaire</u>	<u>Technique de Biologie Moléculaire</u>
HLA classe I :	HLA classe I :
HLA classe II :	HLA classe II :

**Résultat du Cross Match Initial : CXMI par Microlymphocytotoxicité**

Sérum du :

Cross Match Initial :


Le chef d'unité



La version informatisée des dossiers des malades

N°D	N° Sero	Nom et Prenom	1er privt	Age	Sexe	Service	CHU	1er Dialyse	Nb de Trsf	Gross	Recherche D'Ar	
											1er	2e
1	01/06		31/07/2006	23	M	CHG	BUDA	mai-05	1		neg	neg
2	03/06		27/05/2006	19	F	CHG	BUDA	juin-02	1		neg	neg
3	05/06		19/09/2006	40	M	CHG	BUDA	05/01/2006	1		neg	neg
4	07/06		24/05/2006	55	M	CHG	BUDA	2004	0		neg	neg
5	09/06		14/07/2006	3	M	CHG	BUDA		0		neg	neg
6	11/06		01/10/2006	31	M	CHG	BUDA	avr-04	0		neg	neg
7	13/06		08/10/2006	31	M	CHG	BUDA	2006, AN	0		neg	neg
8	15/06		08/10/2006	29	M	CHG	BUDA	2004	6		neg	neg
9	17/06		10/10/2004	37	F	CHG	BUDA		0		neg	neg
10	19/06		15/10/2006	28	M	CHG	BUDA	janv-05	3		neg	neg
11	21/06		17/10/2006	36	M	CHG	BUDA	avr-06	0		neg	neg
12	23/06		31/10/2006	3	F	CHG	BUDA	juin-04	0		neg	neg
13	25/06		04/11/2006	30	M	CHG	BUDA	oct-05	1		neg	neg
14	27/06		14/11/2006	48	F	CHG	BUDA	1990	1		neg	neg
15	29/06		09/11/2006	18	F	CHG	BUDA	2005	6		neg	neg
16	31/06		27/02/2007	25	M	CHG	BUDA	sept-06	3		neg	neg
17	33/06		15/03/2007	22	M	CHG	BUDA		0		neg	neg
18	35/06		18/03/2007	22	M	CHG	BUDA		2		neg	neg
19	41/07		25/03/2007	28	M	CHG	BUDA	oct-05	1		neg	neg
20	43/07		23/04/2007	24	M	CHG	BUDA		1		NEG	neg
21	45/07		07/05/2007	35	M	CHG	BUDA		2		NEG	neg
22	47/07		23/05/2007	20	F	CHG	PARNET		3		neg	neg
23	49/07		02/06/2007	43	F	CHG	BUDA	juin-2004	1		neg	neg
24	51/07		12/06/2007	21	F	CHG	PARNET	mars-07	1		NEG	NEG
25	53/07		17/06/2007	45	F	CHG	BUDA	janv-07	6		neg	neg
26	55/07		30/06/2007	37	M	CHG	BUDA	juin-06	0		neg	neg
27	57/07		08/07/2007	21	M	CHG	BUDA	oct-06	1		neg	neg
28	59/07		10/07/2007	19	F	CHG	BUDA	juin-02	5		neg	neg
29	61/07		15/07/2007	37	F	CHG	BUDA	juin-07	0		neg	neg
30	63/07		16/07/2007	19	F	CHG	PARNET	oct-06	4		neg	neg
31	65/07		21/07/2007	39	M	CHG	PARNET	avr-05	6		neg	neg
32	67/07		22/07/2007	24	M	CHG	SIDI BELABES	juin-06	1		Neg	pos
33	69/07		23/07/2007	29	M	CHG	PARNET	mai-07	1		neg	neg
34	71/07		24/07/2007	17	M	CHG	SIDI BELABES		0		neg	neg
35	73/07		25/07/2007	23	F	CHG	PARNET	DIALYSEE	2		neg	neg
36	75/07		28/07/2007	21	M	CHG	PARNET	FEV-07	1		neg	neg
37	77/07		06/09/2007	26	M	CHG	PARNET	mai-07	3		neg	neg
38	79/07		10/09/2007	27	M	CHG	PARNET	juin-07	0		neg	neg
39	81/07		15/09/2007	37	F	CHG	TELEMEN	juin-07	1	2	neg	neg
40	83/07		10/05/2007	31	F	CHG	TELEMEN	2006	1	2	neg	neg
41	85/07		16/05/2007	25	M	CHG	BUDA	mai-04	5		neg	neg
42	87/07		17/05/2007	44	M	CHG	TELEMEN	avr-07	0		neg	neg
43	89/07		17/05/2007	27	F	CHG	TELEMEN		0		neg	neg
44	91/07		22/09/2007	21	M	CHG	PARNET		1		neg	neg
45	93/07		22/09/2007	10	M	CHG	PARNET		0		neg	neg
46	95/07		23/09/2007	35	M	CHG	BUDA	mars-07	0		neg	neg
47	97/07		30/09/2007	30	M	CHG	TIZIOUIOU	2006	3		neg	neg
48	99/07		30/09/2007	29	M	CHG	BUDA	2004	2		neg	neg
49	101/07		09/10/2007	24	M	CHG	TELEMEN		0		neg	neg
50	103/07		08/10/2007	16	M	CHG	PARNET		4		neg	neg
51	105/07		06/10/2007	35	F	CHG	PARNET		0	0	neg	neg
52	107/07		06/10/2007	57	M	CHG	PARNET		1		neg	neg

**Annexe 5 :** Taille et densité des cellules sanguines

	Taille (µm)	Densité	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	

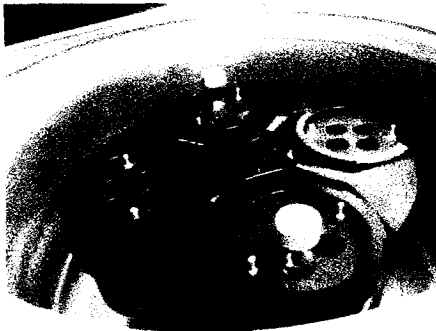
Annexe 6 : Protocole de séparation des LY totaux par technique de Ficoll



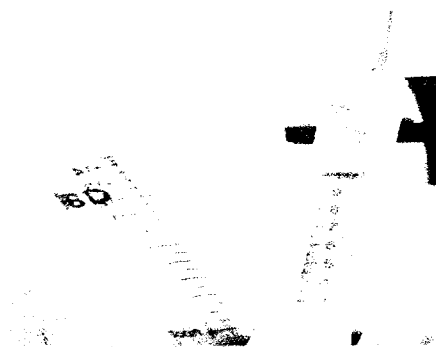
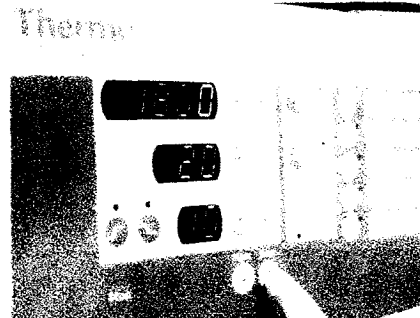
1-Dilution



2-Dépôt de sang



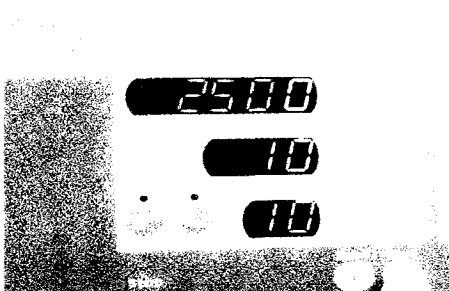
3-Centrifugation



4-Aspiration de la couche lymphocytaire



6-Addition de la solution de Hanks



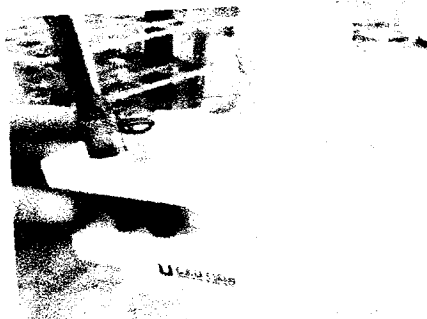
5-Centrifugation

Annexe 7 : Le protocole de séparation des LY par technique de bille



U CAUTION

Étape : 1



Étape : 2



Étape : 3



U CAUTION

Étape : 4



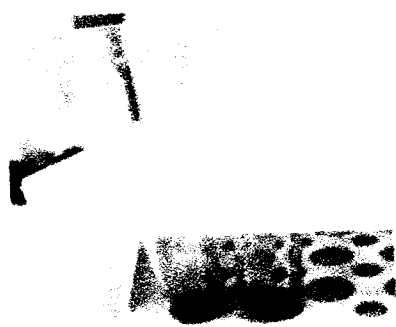
U CAUTION

Étape : 5



U CAUTION

Étape : 6

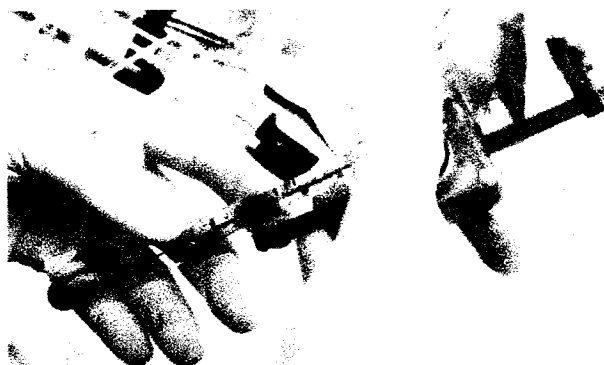


Étape : 7

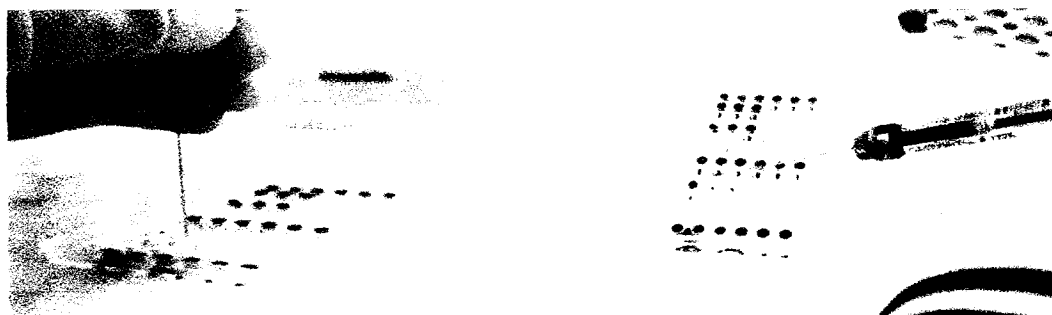


Étape : 8

## Protocole d'estimation des lymphocytes



Remplissage de seringue à micton par la solution mère



Dépôts des gouttes sur la plaque



L'estimation au microscope  
à fluorescence

**Annexe 8 : Le protocole de typage par technique sérologique : LCT**

**1- Préparation des plaques de Terasaki :**



1-Addition d'huile de

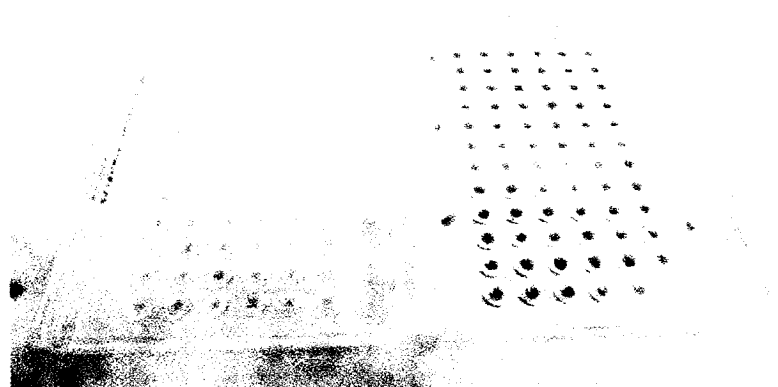


2-Addition d'eau physiologique

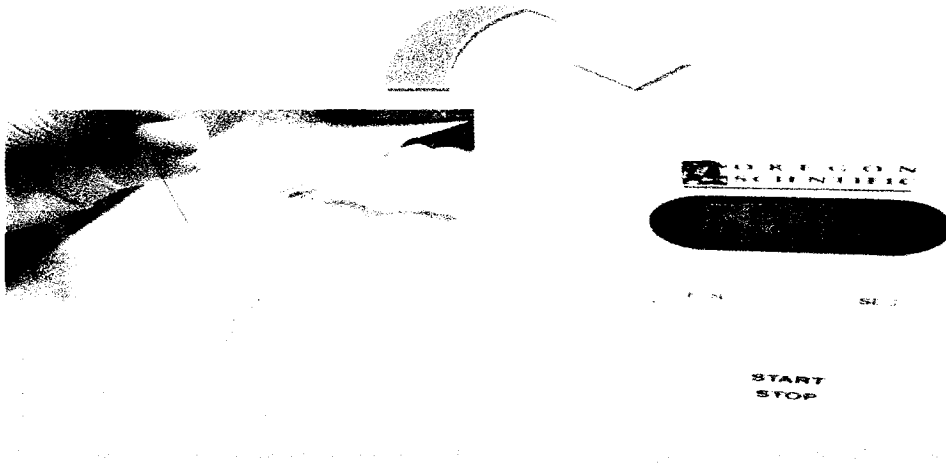
**2-Le typage par LCT proprement dit :**



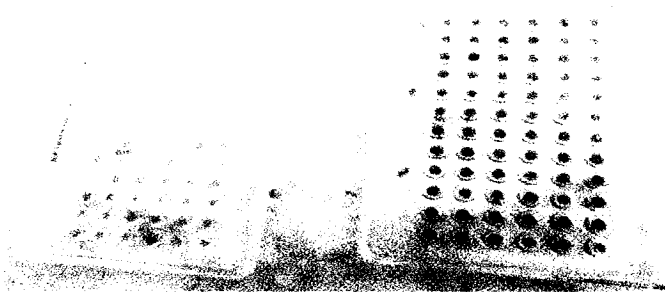
Remplissage des plaques de Terasaki



Les plaques de typage remplis



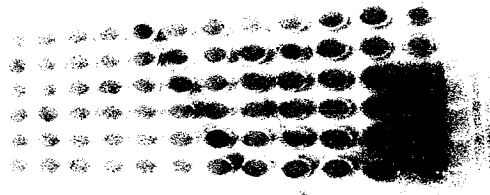
Incubation des plaques



Les plaques après incubation

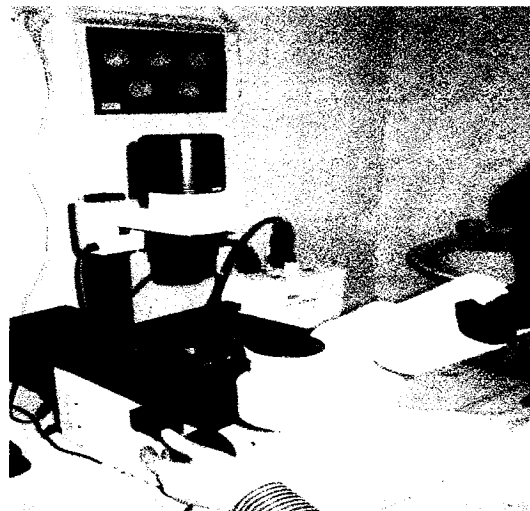


Addition de colorant

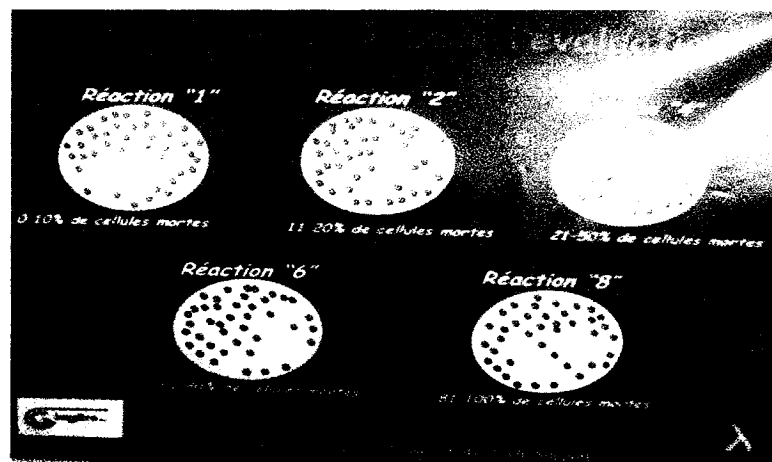


Incubation des plaques

3-La lecture :



La lecture sur microscope fluorescent



Les résultats possibles





Worksheet

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



Catalogue#

AB72D

24/04/2013

Name TEHAOUAOU AMEL Patient  Male  Female

## Phenotype Assignment

Lymphocyte Source:

PBL Fresh  Spleen  Other  
 PBL Frozen  Lymph Node

Center/Institution

Complement Lot# C' Exp. Date

Sample I.D. Race Birthdate

Test Method

Room Temp

Tray Exp. Date

Cell Viability

Tray Position	1A	1B	1C	1D	1E	1F	2F	2E	2D	2C	2B	2A	3A	3B	3C	3D	3E	3F	4F	4E	4D	4C	4B	4A	5A	5B	5C	5D	5E	5F	6F	6E	6D	6C	6B	6A		
Reaction		8	4		8	8	8												8	8							8	8	CB									
Specificity		A 1 38	A 1 38	A 2 89	A 2 89	A 3 24	A 3 24	A 9 23	A 23 2403	A 24 10	A 24 10	A 25 23	A 26 34	A 28 34	A 33 34	A 33 34	A 11 6601	A 11 6602	A 2 28	A 3 30	A 10 19	A 29 31	A 30 31	A 30 31	A 31 31	A 32 32	B 5 48	B 5 78	B 5 51	B 5 52	B 7 81	B 7 55	B 7 55	B 8 59	B 8 78	B 12 44		

Tray Position	7A	7B	7C	7D	7E	7F	8F	8E	8D	8C	8B	8A	9A	9B	9C	9D	9E	9F	10F	10E	10D	10C	10B	10A	11A	11B	11C	11D	11E	11F	12F	12E	12D	12C	12B	12A			
Reaction			8	4										4/8												8	CB												
Specificity	B 44 38 -/+ 27	B 13 14	B 14 65	B 15 57	B 15 75	B 15 75	B 16 62	B 16 67	B 18 39	B 17 17	B 17 57	B 18 18	B 50 41	B 49 59	B 50 49	B 41 41	B 7 22	B 22 17	B 22 17	B 42 42	B 42 42	B 54 54	B 27 37	B 27 37	B 35 53	B 35 53	B 35 53	B 40 40	B 81 81	B 60 60	B 48 81	B 48 1511	B 48 1511	B 70 35	Bw 4 4	Bw 8 8			

Serum I.D.	X8301	Z3008	Z3015	Z1192	X8617	Z0133	X8170	Z1111	Z1343	Z1907	Z1210	Z5380	Z0857	X5312	X7780	Z0746	X7005	X8637	Z5424	Z1223	Z3322	X9027	X7215	Z1207	Z0643	Z5504	Z482	X7408	Z262X	Z1834	Z1574	Z0647	Z0714	Z0723	Z4748	X6654
------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

**HLA Broad Specificities and Their Splits**

A2	A23#	A210#	A8001	A80								
A6	A23	A24	A2403#	B15	B82	B63	B75	B76	B78	B77	B1508	B1511
A10	A25	A26	A34	A6601	A6602	B16	B38	B39				
A19	A26	A30	A31	A32	A33	A74	B17	B57	B58			
A28	A68	A69	B21	B49	B60	B4005#	B22	B64	B55	B66		
B5	B51	B52	B6102#	B5103#	B22N	B5803#						
B7	B703#	B705#	B40	B60	B61							
B12	B44	B45	B70	B71	B72							
B14	B64	B65	BDT	B81								
(Bw58)	5Y	B78#	Cw3	Cw6	Cw10							

**Bw4/Bw6 Associations**

Bw4		Bw6				
A23	B27	B5103	B1608	B41	B6603	B703
A24	B37	B52	B1511	B42	B80	B71
A2403	B38	B53	B18	B45	B81	B72
A25	B44	B57	B2708	B46	B62	B73
A32	B47	B58	B35	B46	B64	B75
B13	B49	B59	B39	B60	B85	B76
B1304	B51	B63	B3805	B54	B67	B78
B1524	B5102	B77	B4005	B55	B7	B8
			B4008	B56	B70	B81
						B8201

Please refer to product insert for testing conditions

Test Performed by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Read by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Reviewed by \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

AI: A2, A3 B65(14), B64, Bw4, Bw6

Annexe 9 Exemple de rypage HLA par LCT



WORKSHEET

Terasaki HLA Class II Dry Tissue Typing Tray (72), Lot # 4

Catalogue# DR72D

Name: TEL ADVAADU AMEL Patient Donor Male Female

PHENOTYPE ASSIGNMENT

Lymphocyte Source: PBL Fresh, PBL Frozen, Spleen, Lymph Node, Other

Center/Institution: 24/04/2013

Sample I.D. Race Birthdate

Tray Exp. Date Cell Viability

Disease Relationship to patient ABO/RH

Test Method Room Temp

Table with 28 columns (1A-6A) and 3 rows: REACTION, SPECIFICITY, Serum I.D.

Table with 28 columns (7A-12A) and 3 rows: REACTION, SPECIFICITY, Serum I.D.

PREDICTED DR 13 AND 14 EPITOPES

- 13A 1301, 1302, 1304
13B 1301, 1302
13C 1301, 1302, 1305
14A 1401, 1404, 1405, 1407, 1408, 1410, 1411
14B 1402, 1403, 1406, 1409
14C 1401, 1404, 1407
14D 1401, 1402, 1404, 1405, 1406, 1410, 1411
14E 1401, 1402, 1404, 1405, 1410, 1411
14G 1401, 1404, 1405, 1407, 1410, 1411

COMMON DR/DQ ASSOCIATIONS

- DQ2 DR7, DR9, DR17
DQ4 DR4, DR8, DR18
DQ5 (Q1) DR1, DR10, DR14, DR16, DR103
DQ6 (Q1) DR13, DR15
DQ7 (Q3) DR4, DR11, DR12
DQ8 (Q3) DR4, DR8
DQ9 (Q3) DR7, DR9
DR51 DR15, DR16, DR11
DR52 DR3, DR11, DR12, DR13, DR14, DR1403, DR1404
DR53 DR4, DR7, DR9
Rarely observed haplotype

Please refer to product insert for testing conditions.

DR3, DR4, DR52, DQ2, DQ3, DQ9(3)

Test Performed by Date

Read by Date

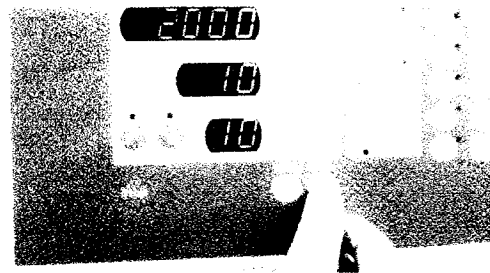
Reviewed by Date

Annexe 10 : Le protocole de typage par biologie moléculaire PCR-SSP

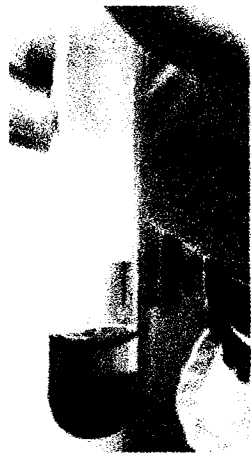
1- Extraction de l'ADN par technique de quiagen :



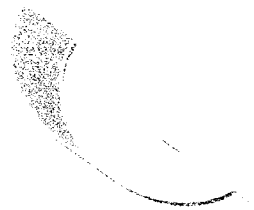
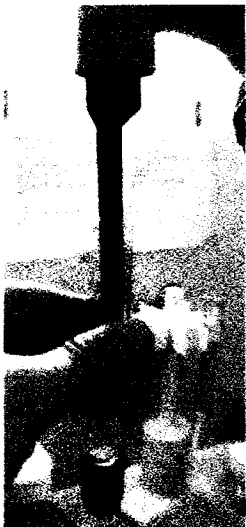
Prélèvement



Centrifugation

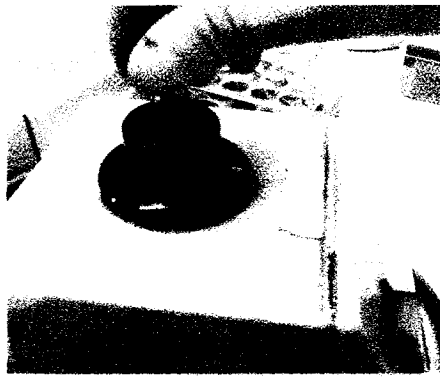


Le Buffy-coat



Aspiration de  
Buffy-coat

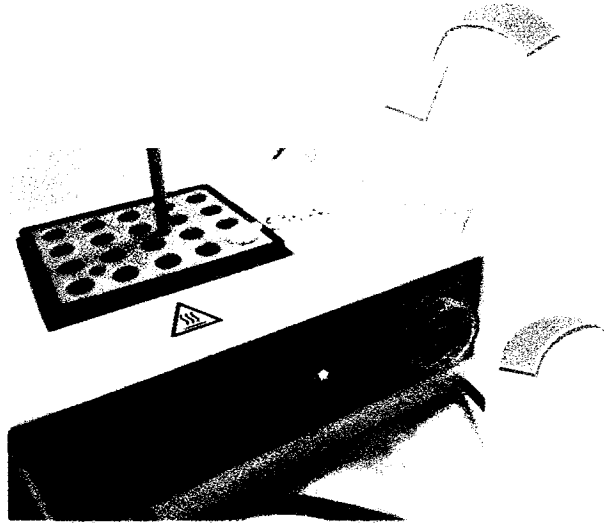
Le Buffy-coat dans un  
Eppendorf



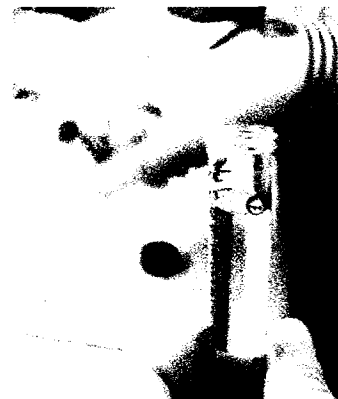
Agitation au Vortex



L'Eppendorf après agitation

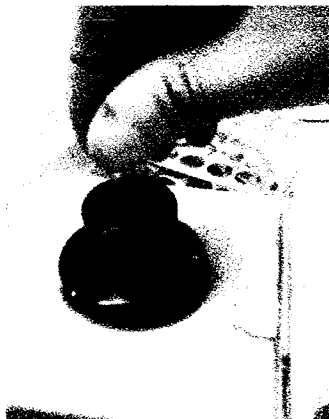


L'Eppendorf dans le thermoblok

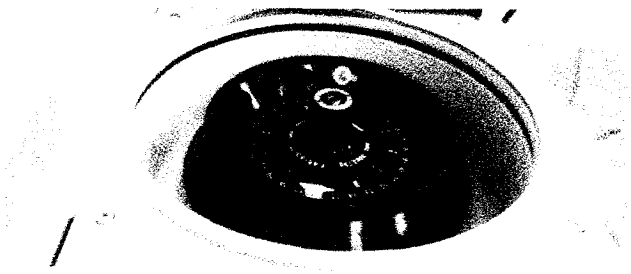


Addition d'éthanol

Agitation au Vortex



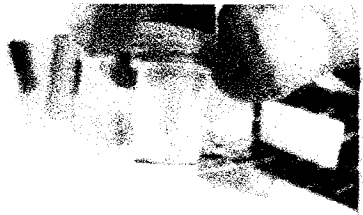
Transfert de contenu dans une colonne de QUIAGEN



**eppendorf**  
**Centrifuge 5417C**



Centrifugation



Remplacement de la poubelle par une autre

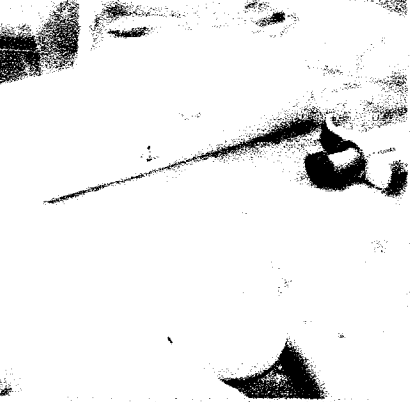


Addition de la solution AW1

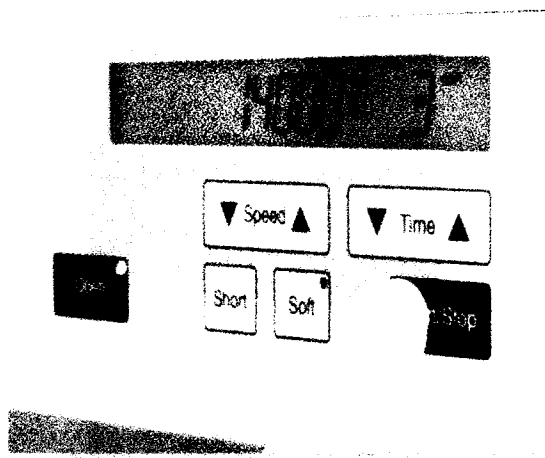


**eppendorf**  
**Centrifuge 5417C**

Centrifugation



Addition de la solution AW2

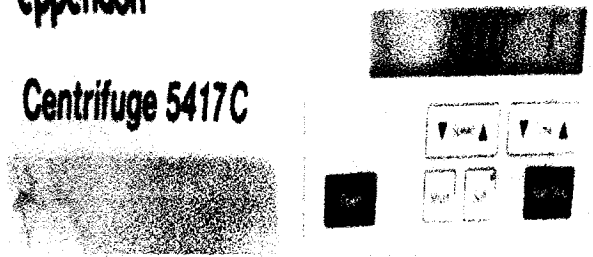


Centrifugation



Addition de la solution

**eppendorf**  
**Centrifuge 5417C**



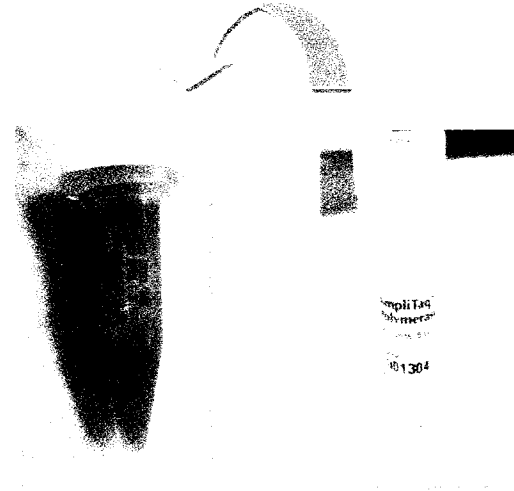
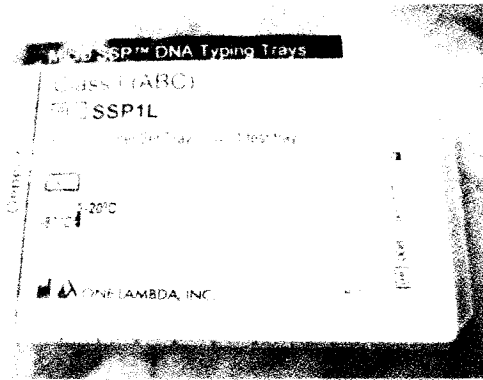
Centrifugation



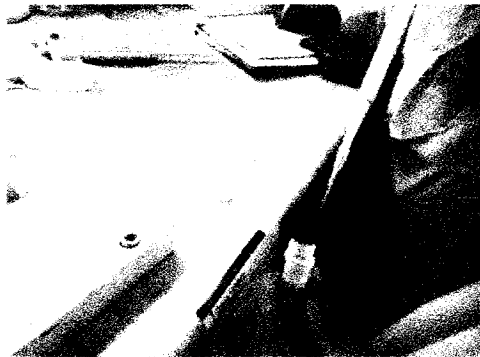
L'ADN après extraction  
réparti en deux  
Eppendrofs et prêt pour  
le typage

**2- Le typage par PCR-SSP :**

**A-Préparation de la plaque de Micro-SSP**

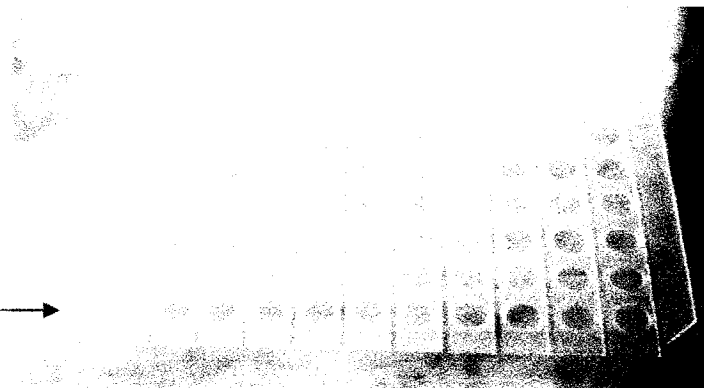


Sortir la plaque et les réactifs

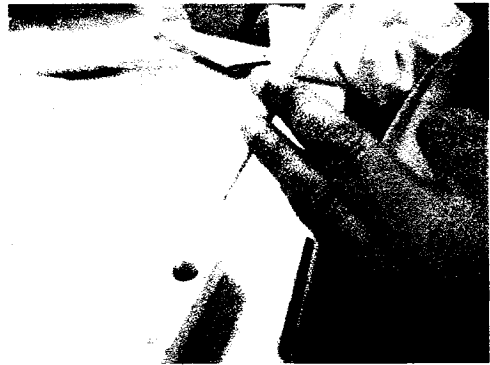
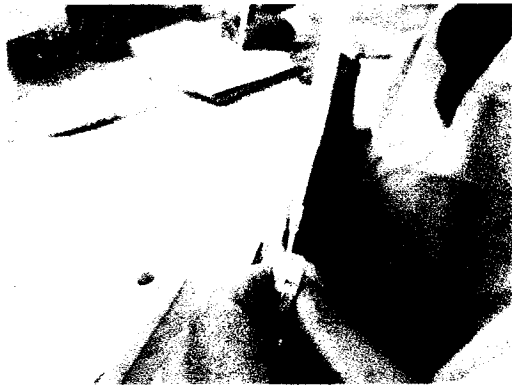


Mélange D-mix/ Taq avec le tampon PCR

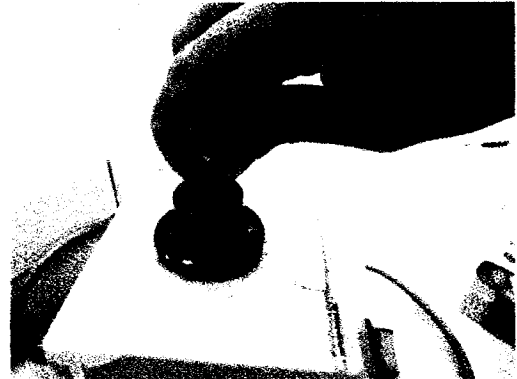
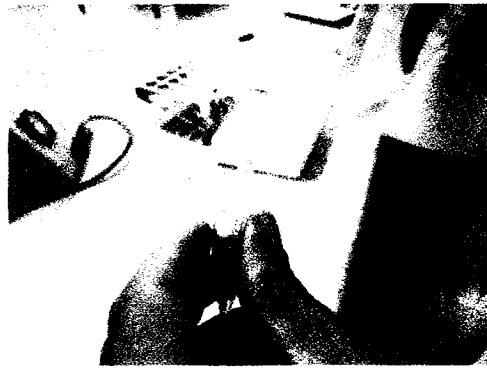
1H →



Dépôt de contrôle négatif

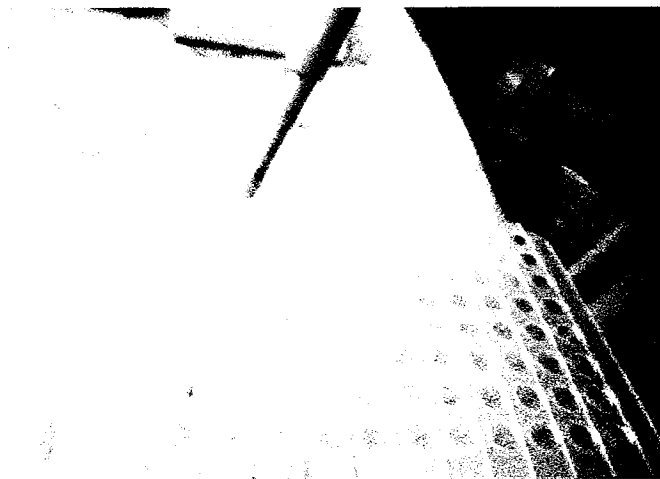


Addition de l'ADN sur le mélange D-mix/Taq



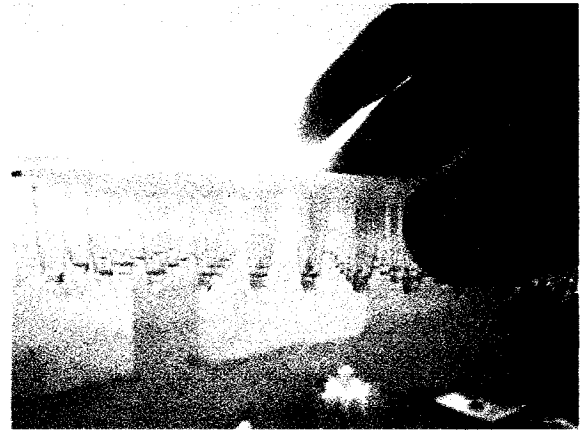
Prendre 10  $\mu$ l de mélange

Vortexer le mélange



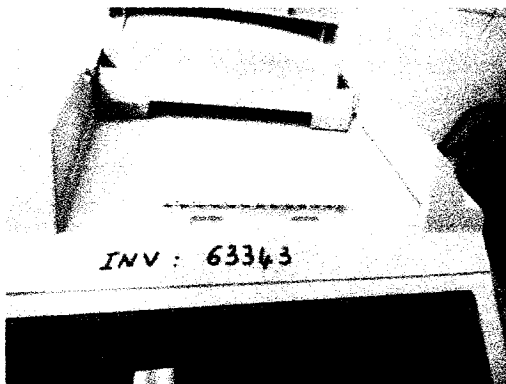
Répartition de mélange DNA/  
D-mix/ Taq dans les puits de  
la plaque





Fermeture de la plaque

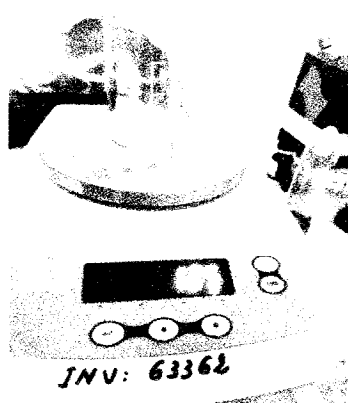
**B-Réalisation de la PCR :**



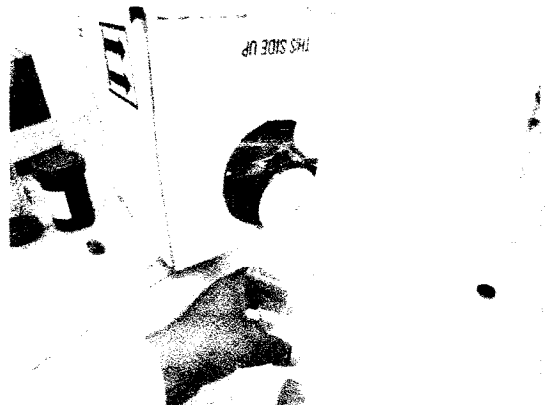
Placement des plaques au thermocycleur

**C-Electrophorèse sur gel d'agarose :**

- Préparation de gel :



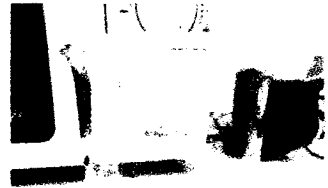
Peser d'agarose



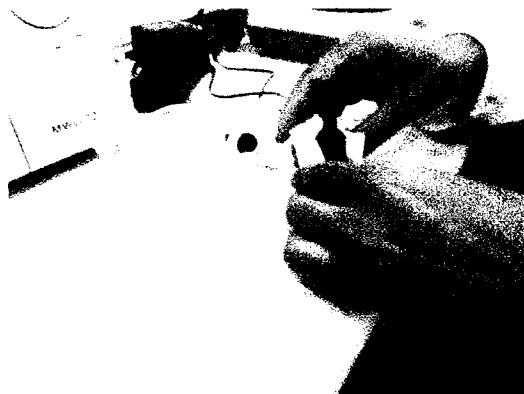
Addition de la solution tamponne



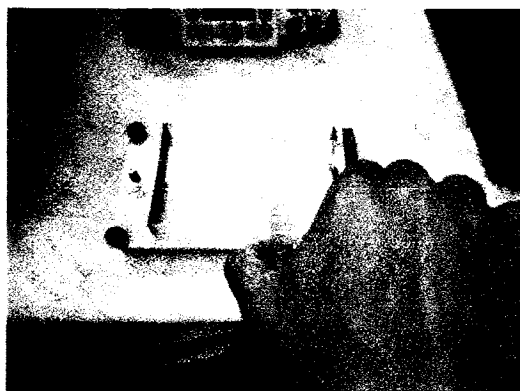
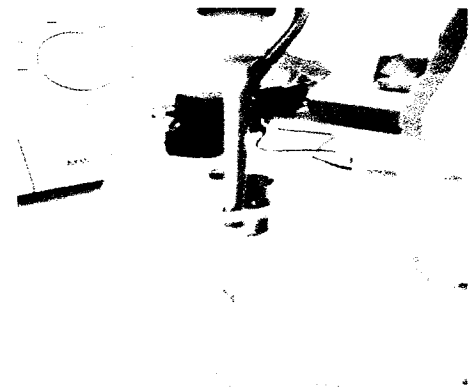
Placement de mélange dans le micro-onde pdt 3à 4 min



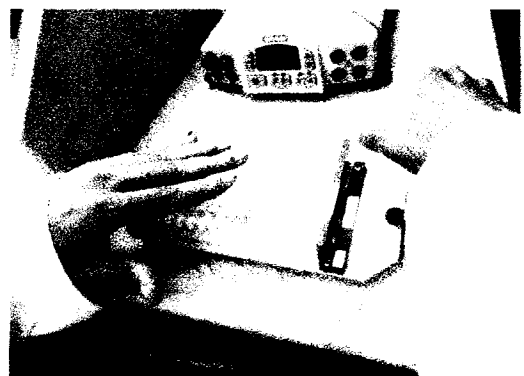
Le mélange après dissolution d'agarose



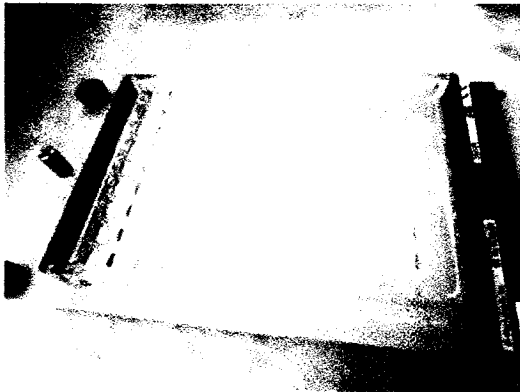
Addition de Bromure d'éthidium



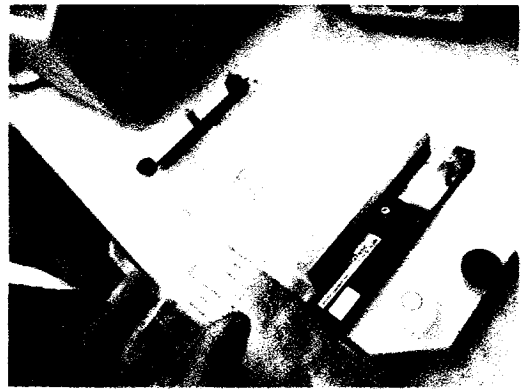
Ecoulement de mélange sur la plaque de migration



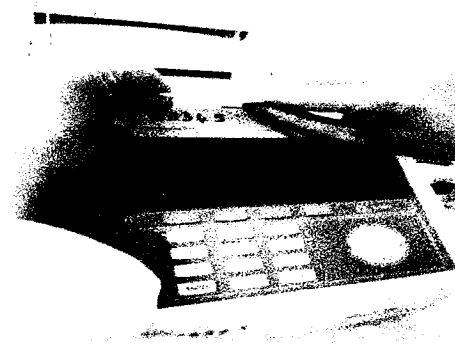
Placer les empreintes



La plaque prête pour l'utilisation

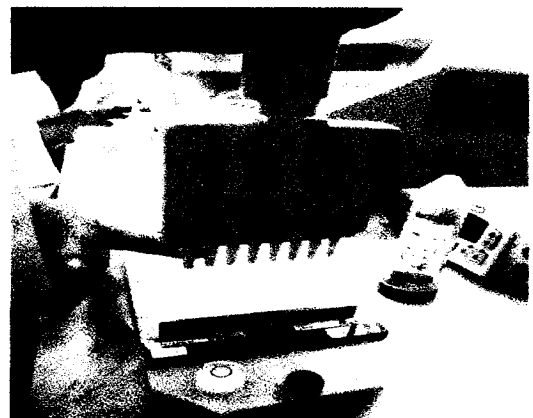


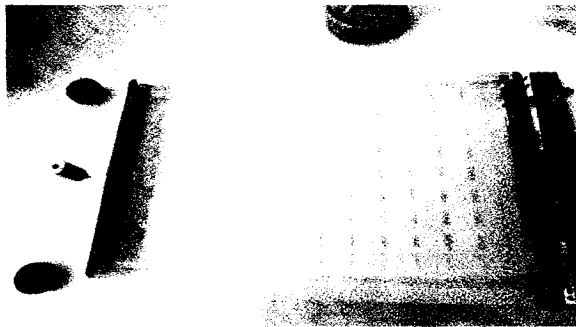
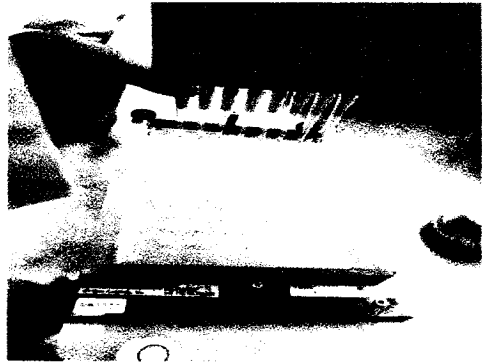
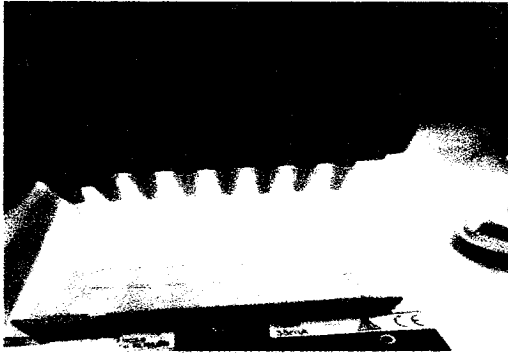
Addition de Tampon



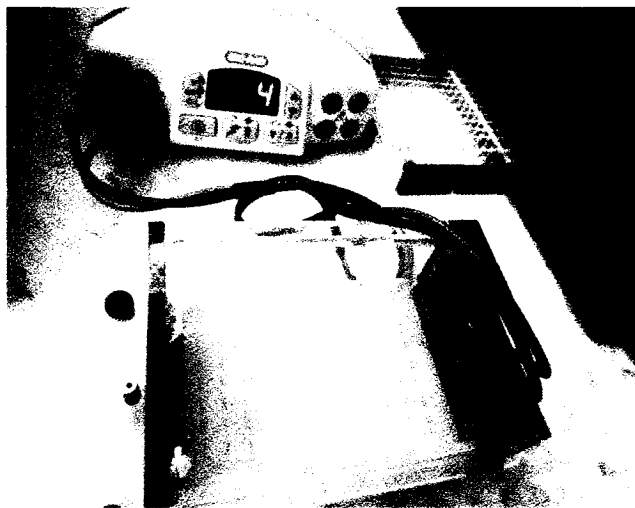
Sortir la plaque de thermocycleur

- La migration sur gel :



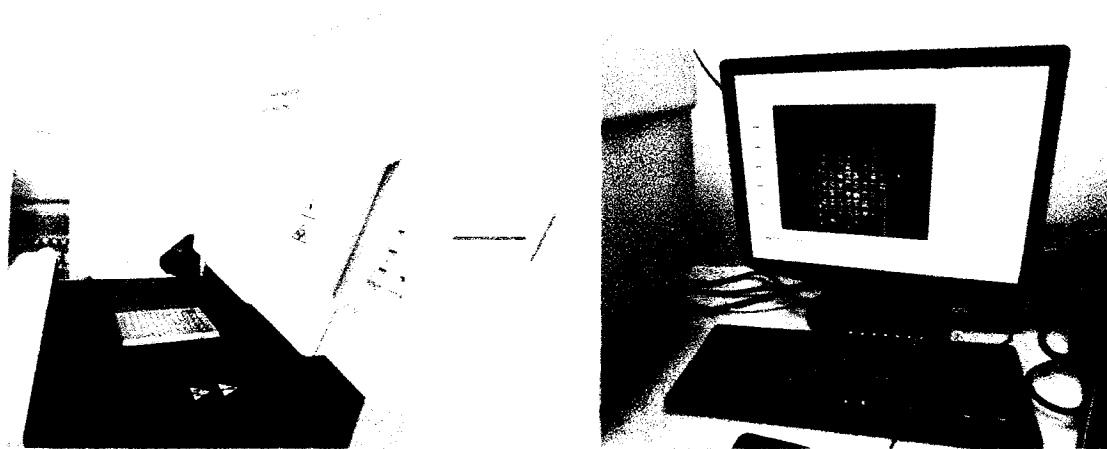


Transfert de produits  
d'amplification dans les puits  
de la plaque de migration

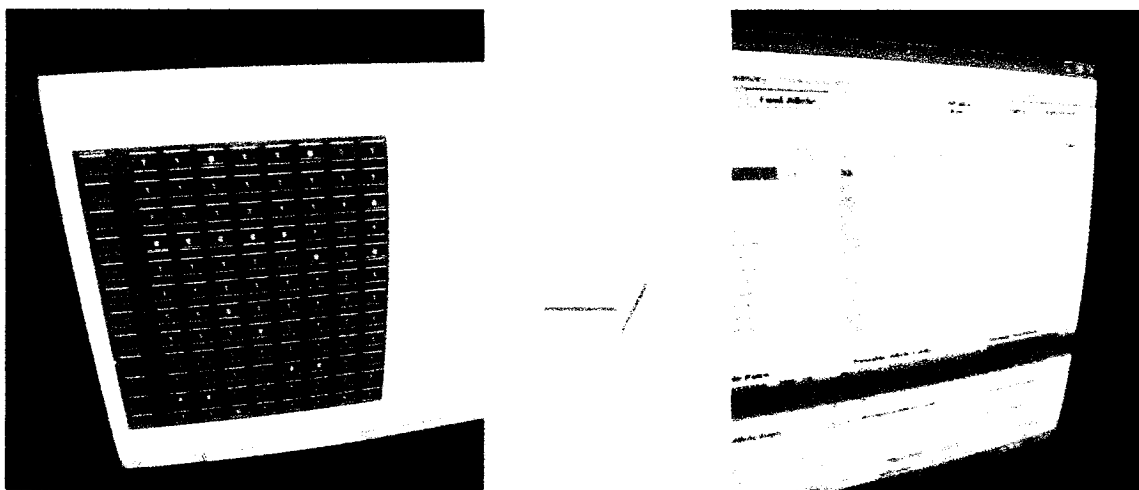


La migration

D-Lecture et interprétation :



Lecture sou UV Gel doc



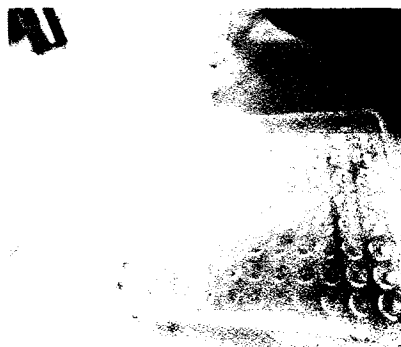
Interprétation des résultats /  
Logiciel HLA fusion

Annexe II: Protocole de la technique ELISA LAT-M<sup>®</sup>:

Distribution du tampon+  
sérum contrôle



Ajout du sérum



Incuber 1h  
puis lavage

Ajout du conjugué



Préparation du substrat et son  
ajout

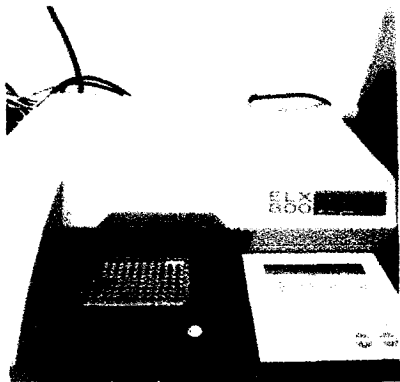


Ajout solution

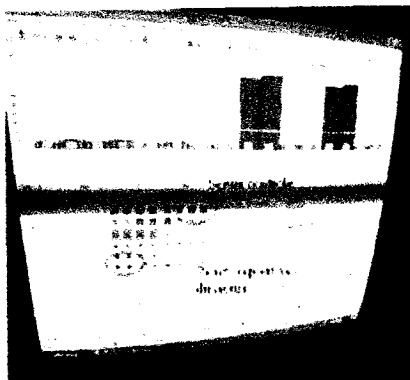


15min

Lecture

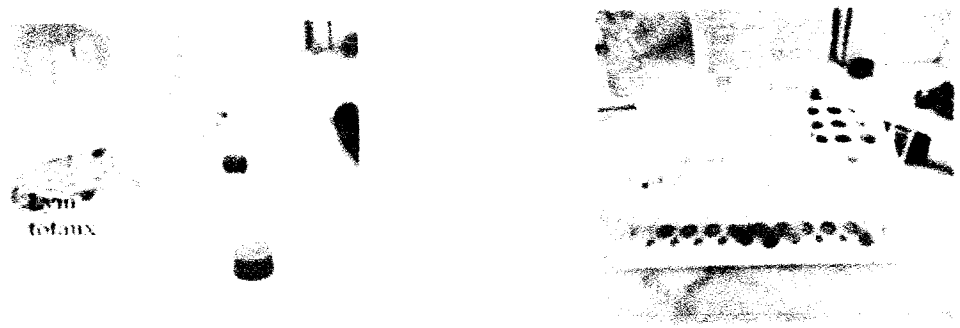


Résultat



Annexe 12: Protocole du Cross match par LCT :

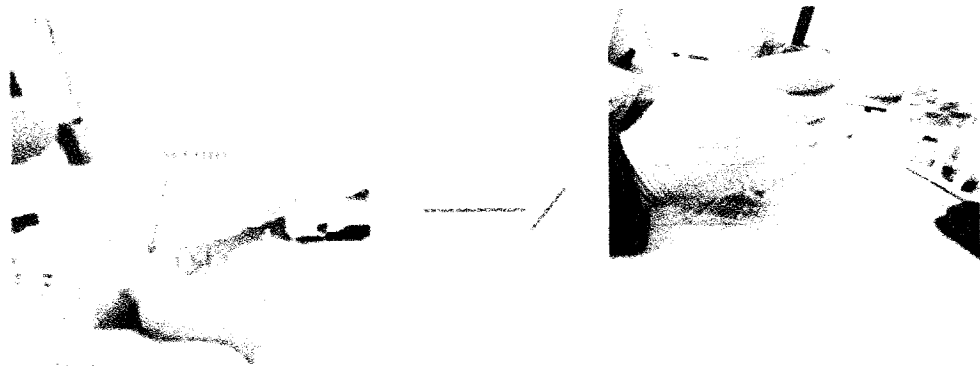
Séparations des Lym totaux, LT et LB à partir du sang dilué



Huiler la plaque

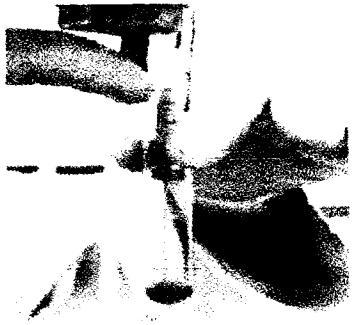


Répartition du sérum





Ajout des cellules



Ajout du complément



Coloration



Lecture

