

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCES DE LA NATURE
ET DE LA VIE

Spécialité :

BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE,
IMMUNOLOGIE

THEME

APPORT DE L'IMMUNOLOGIE EN TRANSPLANTATION RENALE

Présenté par

M^{elle}BAHOUT Sabrina

A Soutenir le : 15/12/2013

Devant le jury composé de :

M^{me} KADRI F.	MAA	USDB	Présidente
M^{me}ZERKAOUI A.	MAA	USDB	Examinatrice
M^{me}ZATRA Y.	MAA	USDB	Examinatrice
M^{me}SAADI L.	MCB	USDB	Promotrice

Promotion : 2011-2012

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le bon Dieu qui m'a donné le courage, la volonté et la santé afin d'accomplir ce travail.

Mes plus vifs remerciements et ma gratitude à ma promotrice ; Mme SAADI Leïla, maitre de conférences au département de biologie, pour ses efforts, son orientation, ses précieux conseils et son soutien.

Je tiens à remercier particulièrement les membres de jury :

M^{me} SOURS., Maitre assistante au département de biologie, d'avoir fait l'honneur de présider le jury examinant ce travail.

Mes vifs remerciements également M^{me} ZERKAOUI A., maitre assistante Maitre assistante au département de biologie, ainsi que M^{me} ZATRA Y., Maitre assistante au département de biologie, d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Mon plus grand et sincère remerciement ira aussi au Pr. HDOUM, chef de service de néphrologie au niveau de C.H.U Nafissa HAMOUD, ainsi que tous le personnel: Dr ZAIDI, Dr BOUGRIDA, Dr SMRANI, Dr REGHAS, Pr BENHALIMA, chef de service d'immunologie au niveau du C.H.U MUSTAPHA Pacha, de m'avoir accueillie chaleureusement et mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la mise en œuvre de ce travail.

Je ne terminerai pas sans adresser un immense merci à ma chère maman pour tout ce qu'elle a fait, pour le soutien qu'elle m'a apporté durant toutes mes études, et à qui je dois vraiment tout.

Dédicaces

Je dédie ce travail à celle qui a acquiescé pour mon éducation et mon bien être et que personne ne peut compenser son amour, affection, protection et douceur - A toi la meilleure Maman au monde, pour ta présence, attention et patience éternelle.

A LA mémoire de mon père.

À mon cher frère Chafik, et mes chères sœurs que j'aime Amel, Chanez, Dicra et Samia.

A mes adorables nièces Louisa et Camélia.

A toutes ma famille maternelle et paternelle.

A vous, Hanane - Mira - Wahiba, mes gracieuses et adorables copines qui m'ont accompagné tout au long de mon chemin universitaire, pour votre authenticité, soutien, et présences inconditionnel.

Ce travail est aussi dédié à mes ami(e)s avec qui j'ai partagé les meilleurs moments durant le cursus universitaire : Mina, Selma, Lamia, Hiba, Yasmine, Romeissa, Imene, Manel, Sarah, Amina, Sihem, Ferial, Hanane, Hafidha, Tassaadit, Isma, Naima, Nawel, Aicha, Meriem, Malik, Shaouki, Mehdi, Ali et Hichem.

Je ne pourrai oublier à la fin de ces dédicaces mes adorables Yasmina et Nesrine.

Sabrina

Résumé

Malgré les avantages que La transplantation rénale apporte, elle reste un traitement lourd pour les patients qui sont soumis à des thérapeutiques immunosuppressives à vie.

Nous avons effectué une étude du bilan pré greffe effectué au niveau du service d'immunologie au C.H.U Mustapha Pacha sur 28 patients (dont 14 sont candidats à une transplantation rénale et 14 patients sont des donneurs) et une étude rétrospective réalisée sur 27 transplantés rénaux (que les receveurs), tous recrutés au niveau du CHU Naphissa HAMOUD durant l'année 2012, dans le cadre d'une évaluation du statut immunologique du donneur et du receveur, afin de sélectionner un donneur immunologiquement compatible, et de déterminer l'influence des panneaux d'anticorps réactifs en pré greffe chez les receveurs sur la survie des greffons. Le bilan comprend le test de cross-match cellulaire entre le donneur et le receveur, le typage HLA du donneur et du receveur par technique de biologie moléculaire PCR-SSP, et la recherche des anticorps anti HLA dans le sérum du receveur par la technique luminex.

Notre étude montre que la transplantation rénale est effectuée chez les hommes ainsi que chez les femmes avec un sexe ratio 1,73. L'âge de nos patients varie entre 7 et 57 ans avec une moyenne d'âge de 31 ans (\pm 11,89). D'après le typage de nos patients, la semi-identité HLA entre le donneur et le receveur constitue le plus grand pourcentage 36,58%, suivi par l'identité HLA complète avec 17,07% et 5% de nos patients ne présentent aucune identité avec leurs receveurs. La recherche d'anticorps en pré-greffe, par luminex screening, dans le sérum des receveurs a révélé que 15% des patients avaient des anticorps anti HLA. Qui ont été identifiés comme étant des anticorps non spécifiques des donneurs. Certains patients ont présenté des signes de complication de la fonction du greffon dû à l'augmentation de la créatininémie dans le sang. Ces patients ont récupéré la fonction du greffon en quelques jours, seulement.

Tous les patients de notre série d'étude ont montré une survie à 100% le long De la période du suivi.

Mots clés : Transplantation rénale, PCR-SSP, Cross-match, Identité HLA.

LISTE DES FIGURES

N° de figure	Titre	page
FIGURE 1 :	Structure et vascularisation du rein	01
FIGURE 2 :	Activation lymphocytaire T.....	06
FIGURE 3 :	Exemple d'une image de migration des produits d'amplification sur gel d'agarose.	16
FIGURE 4 :	Répartition des patients greffés selon le sexe.....	20
FIGURE 5 :	Répartition des patients greffés selon l'âge.....	21
FIGURE 6 :	Pourcentage d'identité HLA entre le donneur et le receveur.....	22
FIGURE 7 :	la spécificité des anticorps anti HLA développés en pré greffe	23

LISTE DES TABLEAUX

N° de tableau	Titre	page
TABLEAU I	Programme d'amplification PCR	16
TABLEAU II	la spécificité des anticorps anti HLA développés en pré greffe	22
TABLEAU II	la spécificité des anticorps anti HLA développés en pré greffe	27

Dossier (1) des données des 14 couples qu'on a effectué un bilan pré greffe

N° du couple	Sexe du receveur	Age du receveur	Lien de parenté du donneur avec le receveur	Taux d'identité HLA du receveur avec le donneur	Présence des PRA dans le sérum du receveur
1	Homme	14 ans	Frère	HLA identique	Négatif
2	Femme	27 ans	Sœur	HLA identique	Négatif
3	Femme	44 ans	Sœur	HLA non identique	positif
4	Homme	27 ans	Frère	HLA semi identique	Négatif
5	Homme	41 ans	Frère	Une seule identité HLA	Négatif
6	Homme	30 ans	Frère	HLA semi identique	Négatif
7	Femme	39 ans	Sœur	HLA non identique	Négatif
8	Femme	12 ans	Père	HLA semi identique	Positif
9	Femme	08 ans	Mère	HLA semi identique	Négatif
10	Femme	32 ans	Sœur	HLA identique	Négatif
11	Homme	47 ans	Sœur	Une seule identité HLA	Négatif
12	Femme	47 ans	Sœur	Une seule identité HLA	positif
13	Homme	07 ans	Mère	HLA semi identique	Négatif
14	Femme	36 ans	Frère	HLA semi identique	Négatif

Dossier (2) des données des patients transplantés rénaux dont on a réalisé une étude rétrospective

N° de dossier	Sexe	Age	Taux d'identité entre le donneur et le receveur	Panneaux d'anticorps réactifs
1	H	13 ans	HLA Semi identique	Négatif
2	H	49 ans	HLA Identique	Négatif
3	H	26 ans	HLA Semi identique	Négatif
4	H	41 ans	HLA Une seule identité	Négatif
5	H	26 ans	HLA Semi identique	Négatif
6	H	43 ans	HLA Semi identique	Négatif
7	H	34 ans	HLA une seule identité	Négatif
8	H	25 ans	HLA Semi identique	Négatif
9	F	25 ans	HLA Semi identique	Positif
10	H	34 ans	HLA Identique	Négatif
11	H	36 ans	HLA Semi identique	Négatif
12	F	35 ans	HLA Semi identique	Négatif
13	H	20 ans	HLA Semi identique	Négatif
14	F	34 ans	HLA Semi identique	Positif
15	H	49 ans	HLA Semi identique	Négatif
16	H	28 ans	HAL Semi identique	Négatif
17	H	57 ans	HLA 5 identités sur 6	Négatif
18	F	21 ans	HLA Semi identique	Négatif
19	H	42 ans	HLA Identique	Négatif
20	H	28 ans	HLA Semi identique	Négatif
21	F	25 ans	HLA Semi identique	Négatif
22	H	42 ans	HLA 4 identités sur 6	Négatif
23	H	16 ans	HLA 4 identités sur 6	Négatif
24	H	33 ans	HLA 2 identités sur 6	Négatif
25	F	26 ans	HLA Identique	Positif
26	F	39 ans	HLA 5 identités sur 6	positif
27	H	27 ans	HLA Semi identique	Négatif

INTRODUCTION

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

*MATERIELS ET
METHODES*

*RESULTATS ET
DISCUSSION*

CONCLUSION

*Références
Bibliographiques*

Annexes

I-GENERALITES SUR LE REJET RENAL

I-1- Rappel sur la structure rénale

Le rein est un organe rétropéritonal situé de part et d'autre de la colonne vertébrale à la hauteur de la douzième vertèbre dorsale et des deux premières vertèbres lombaires. Il comporte deux régions distinctes : le cortex et la médullaire dont l'extrémité interne se projette dans la cavité excrétrice, la calice (Sebe et *al.*, 2008). Le rein renferme environ un million de néphrons, chacun d'entre eux contient un corpuscule et un tubule rénal (Koolman et Roehm, 2005) (figure 1).

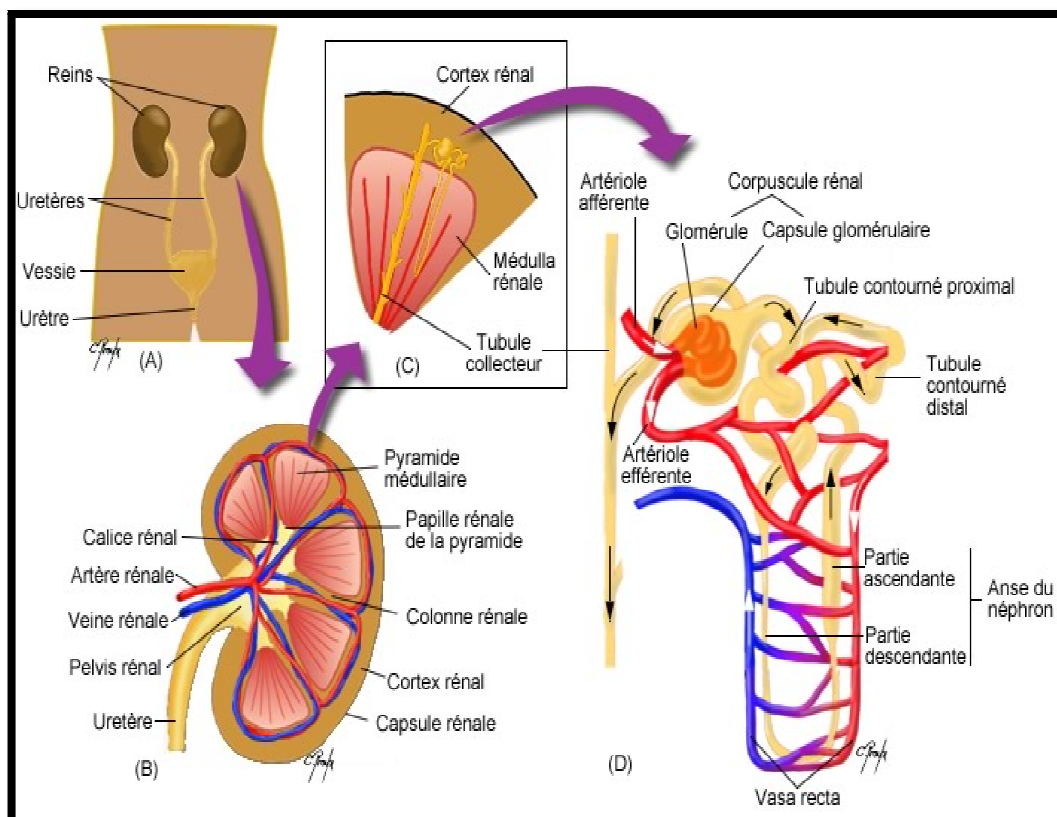


Figure 1 : Structure et vascularisation du rein (Proulx, 2011).

Le rein intervient dans l'homéostasie du corps et assure deux types de fonctions: exocrine et endocrine (Henry et Sebe, 2008) La fonction exocrine consiste dans l'épuration du sang des déchets métaboliques en sécrétant l'urine qui passe par plusieurs étapes : une filtration glomérulaire, une réabsorption et une sécrétion (Maddox et Brenne, 1991). La fonction endocrine est présentée par la synthèse de la

rénine, d'érythropoïétine, vitamine D. . etc (Kurokawa et *al.*, 1992; Gunning et *al.*, 1995)

I-2- Dysfonctionnement Rénal

Le syndrome néphrotique est secondaire à une atteinte glomérulaire rénale. Il peut être due à une néphrose corticorésistante évoluée dans la moitié des cas vers l'insuffisance rénale terminale, à une glomérulonéphrite primitive ou secondaire ou à d'autres causes (amylose, syndrome hémolytique et urémique, syndrome d'Alport) (Niaudet, 2000).

L'insuffisance rénale est une altération du fonctionnement des deux reins qui ne filtrent plus correctement le sang. Elle se caractérise par une baisse progressive du débit de filtration glomérulaire qu'on peut estimer par la clairance de la créatinine: rapport entre le taux sanguin de la créatinine et son débit urinaire (d'environ 125ml/min chez un sujet normal). L'insuffisance rénale est dite aiguë si le dysfonctionnement est transitoire et chronique lorsque la destruction est irréversible (Petitclerc, 1998).

Une fois le stade d'insuffisance rénale chronique terminale atteint, un traitement de suppléance doit être rapidement envisagé et mis en place afin d'éliminer les déchets qui vont s'accumuler dans l'organisme et d'assurer l'homéostasie du corps. Différents traitements peuvent être explorés à savoir l'hémodialyse, la dialyse péritonéale ou la transplantation rénale (Petitclerc, 1998 ; Canaud et *al.*, 2005 ; Bourquina et Martinb, 2005).

I-2-1- Transplantation rénale

L'acte de transplantation consiste à prélever un rein et à l'implanter chez un receveur avec rétablissement de la continuité vasculaire. Par rapport aux autres traitements de suppléance ; la transplantation est considérée comme la solution la plus satisfaisante de l'insuffisance rénale chronique terminale (Bourquina et Martinb, 2005)

En Algérie, la première transplantation rénale était réalisée en 1986. Durant l'année 2011, 133 transplantations rénales ont été réalisées à partir des donneurs

vivant et deux à partir d'un donneur en mort céphalique. Cependant, en 2012, 119 transplantations rénales ont été réalisées à partir des donneurs vivants (Chergui, 2012).

I-2-1-1- Privilège de la transplantation rénale

Les transplantés rénaux ont un score de qualité de vie supérieur en ce qui concerne la forme physique, la présence de douleur, l'état général et la vie sociale (Tonelli et al., 2011). Sur le plan financier l'Algérie dépense des sommes trop importantes dans la prise en charge en hémodialyse qui seulement atteint 20 milliards de dinars par an ; il faut savoir que le cout de l'hémodialyse s'élève à 91 millions de centimes par an par malade. Les frais de soins de la dialyse péritonéale sont de l'ordre de 110 millions de centimes par an et par malade. Ce qui constitue un lourd fardeau à la caisse nationale. Tandis que la prise en charge d'une greffe de rein est de 2 millions de dinars par malade (Chergui, 2012).

I-2-1-2-Complications de la transplantation rénale

Plusieurs complications peuvent survenir après une transplantation rénale. Elles sont d'ordres immunologiques et non immunologiques.

-Les complications d'ordre non immunologiques : ont pour point commun le rôle favorisant de l'immunosuppression induite par le traitement prophylactique du rejet. Ces complications ont des conséquences, souvent graves, peuvent mettre en jeu le pronostic vital. Elles regroupent :

-les complications infectieuses opportunistes: atteignant notamment le poumon et les infections virales telles que le cytomégalovirus (Jassal et al., 1998 ; Kohler, 2010),

-les complications néoplasiques : les tumeurs cutanées, du col et du rectum, les carcinomes à cellules rénales, le sarcome de Kaposi, les lymphomes et syndromes lympho prolifératifs associés au virus Epstein-Barr et enfin les hépatocarcinomes chez les patients porteurs d'une hépatite chronique B ou C (Moal, 2008).

-les complications cardiovasculaires : (hypertension artérielle, maladie athéromateuse) (Castillo-Lugo et Vergne-Marini, 2005).

- les complications digestives (ulcère gastroduodéal, perforation colique, hépatite, etc.) (Mourad et *al.*, 2005).

-les complications osseuses (ostéonécrose aseptique) (El-Agroudy *et al.*, 2005).

-ou encore certaines complications métaboliques, en particulier le diabète favorisé par la prise de corticoïdes et de tacrolimus (Heisel et *al.*, 2004).

-Les complications d'ordre immunologiques se manifestent sous forme de rejet. Trois types de rejets d'allogreffes sont décrits, classés par leurs mécanismes et par leurs chronologies d'apparition post-transplantation : rejets de greffe hyper aigus (intervention d'anticorps), aigus (réactions cellulaires) et chroniques (néphropathie chronique du greffon en transplantation rénale, d'athérosclérose du greffon cardiaque (Ducloux et *al.*, 2000 ; Kolopp-Sarda et *al.*, 2008).

I-3- Rejet Rénal.

le rejet rénal se caractérise par des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu et par les types de lésions constituées au niveau du transplant (Salmela et *al.*, 2004).

I-3-1- Activation du système immunitaire

La réponse du système immunitaire vis-à-vis du transplant se produit en trois phases distinctes: la phase de reconnaissance des allo-antigènes, suivie de l'activation des lymphocytes spécifiques d'antigènes, et enfin de la phase effectrice qui conduit, au rejet et à la perte de la fonction (Candon, 2007).

L'activation du système immunitaire du receveur ce fait par la présentation et la reconnaissance des antigènes du donneur. Le transplant exprime les molécules HLA présentant des peptides du donneur, qui vont être reconnus par les lymphocytes T du receveur. Cette reconnaissance se fait selon deux principales voies: allo-reconnaissance directe et indirecte (Kolopp-Sarda, 2008).

L'interaction du CMH / peptide exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes avec le récepteur des lymphocytes T induit la formation d'une synapse immunologique, qui est stabilisée par des molécules d'adhésion, et la transduction du signal 1 à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire du complexe moléculaire de signalisation CD3. L'interaction entre CD28 exprimé par le lymphocyte T et CD80 ou CD86 à la surface de la CPA fournit le signal 2 de costimulation. Ces signaux 1 et 2 activent trois voies de signalisation : la voie de la calcineurine, la voie des protéines kinases activées par les mitogènes et la voie protéine kinase C /NF- κ B. La transduction des signaux 1 et 2 par ces voies aboutit à l'activation de facteurs de transcription tels que les complexes NFAT (*facteur nucléaire des lymphocytes T activés*), AP-1 (*protéine activatrice1*) et NF- κ B, respectivement. Il en résulte l'induction de l'expression de CD154, de la chaîne α du récepteur de l'interleukine 2 (ou le CD25) et la sécrétion d'IL2. La liaison de l'IL2 à son récepteur de haute affinité fournit le signal 3 de prolifération, par l'intermédiaire des voies de la phosphoinositide-3-kinase et des mTOR (*cible moléculaires de la rampamycine*), qui induisent l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire (Legender et al., 2007) (figure 2). Ces voies de signalisation intracellulaire représentent à divers niveaux les cibles des thérapeutiques immunosuppressives utilisées en transplantation (Halloran, 2004 ; Brick et al., 2011).

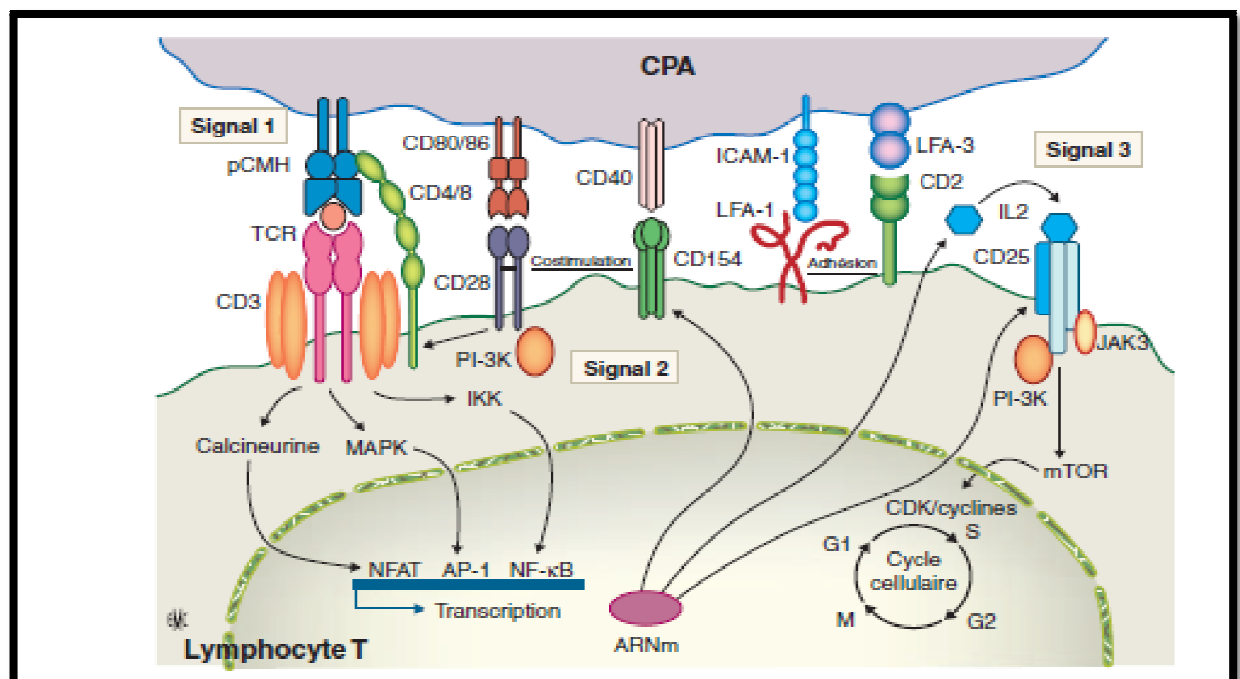


Figure 2 : Activation lymphocytaire T (Candon, 2007).

L'activation des cellules B est initiée par la liaison du récepteur du lymphocyte B aux antigènes exprimés à la surface des CPA du donneur. L'activation des lymphocytes B permet leur prolifération en présence de l'IL-4 puis leur différenciation en plasmocytes en présence de l'IL-6 (Thaunat et *al.*, 2006; Candon, 2007).

L'ensemble des cellules activées migrent par voie sanguine des ganglions vers le transplant, traversent la barrière endothéliale et infiltrent le transplant (Petri et Bixel, 2006).

La destruction du transplant met en jeu plusieurs mécanismes immunitaires, à la fois cellulaire qu'humorale et inflammatoire.

- Mécanisme effecteur médié par les lymphocytes T CD8⁺ : l'endothélium activé exprimant les molécules du CMH de classe I et de classe II constitue la cible des lymphocytes CD8⁺ effecteurs cytotoxiques (CTL) (Rocha et *al.*, 2003). Les CTL lysent le parenchyme du transplant selon deux mécanismes complémentaires :
 - Par la libération de granules cytoplasmiques, les perforines et les granzymes dans la synapse immunologique (Giaretta et *al.*, 2012).
 - aussi, par une voie dépendante de la protéine Fas impliquant l'interaction de la protéine Fas de la cellule cible avec son ligand Fas L sur la membrane du lymphocyte T CD8⁺, induisant un signal de mort cellulaire (Du et *al.*, 2004).

-Hypersensibilité retardée

C'est une réaction inflammatoire localisée induite par des cytokines produites par certaines sous-populations de lymphocytes T notamment les lymphocytes CD4⁺ de phénotype Th1. Ces cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale α , activent les monocytes et les macrophages en cellules plus destructrices. Les lymphocytes CD4⁺ de phénotype Th2 jouent un rôle dans la réaction d'hypersensibilité retardée, par la sécrétion de cytokines comme l'IL4, l'IL5 et l'IL13 capables de recruter et d'activer les polynucléaires éosinophiles au site de la réaction (Rocha et *al.*, 2003).

- cytotoxicité médiée par les anticorps

Certaines cellules à potentiel cytotoxique (cellules natural killer, macrophages) possèdent un récepteur du fragment Fc des immunoglobulines G (IgG) qui leur permet de capter les complexes IgG–cellule cible. La libération d'enzymes lytiques au niveau des zones de contact induit une lésion de la cellule cible. Les lésions de l'endothélium par les mécanismes effecteurs précédents entraînent des modifications secondaires locales comprenant : l'activation plaquettaire et la coagulation, la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses subintimales, et des lésions parenchymateuses du greffon (Colvin et Smith, 2005).

I-4- Protocoles de contrôle du rejet rénal

Depuis les années 60, date à laquelle la transplantation d'organe a réellement été envisagée comme une solution thérapeutique, différentes stratégies ont été mises au point afin de contrôler la réponse immunitaire du receveur, principal obstacle à sa réussite basée sur la prévention, la surveillance et le traitement (Legendre, 2007).

- Prévention

La prévention repose essentiellement sur la réalisation d'un bilan immunologique pré-greffe et l'utilisation des traitements immunosuppresseurs.

- Bilan immunologique : permet d'évaluer le statut immunologique du patient et d'établir la meilleure compatibilité entre donneur et receveur. Il comprend: le groupage érythrocytaire ABO, le groupage tissulaire HLA, la recherche régulière d'une immunisation anti-HLA et le cross match lymphocytaire (Brick et al., 2011).
- Traitement immunosuppresseur : actuellement disponibles n'est pas spécifique des antigènes du greffon et diminue donc les défenses

immunologiques du receveur. Les protocoles utilisés actuellement permettent de maintenir une prophylaxie anti rejet particulièrement importante durant les premières semaines après la greffe, et de traiter les épisodes de rejet. Les protocoles comportent 3 phases correspondant à la réalisation de trois objectifs :

- L'acceptation de la greffe par le receveur (période d'induction),

Par l'utilisation de doses moyennes, voire fortes, d'immunosuppresseurs,

- La prévention du rejet (période d'entretien), par des doses d'immunosuppresseurs pouvant être réduites,
- le traitement du rejet, par l'utilisation de fortes doses de corticoïdes ou d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux (Euvrard et *al.*, 2012)

Selon leur mode d'action, les immunosuppresseurs, peuvent agir : en inhibant l'activation et la prolifération des lymphocytes (inhibiteurs des quatre signaux d'activation), soit en induisant leur déplétion, ou en inhibant leur migration et leur adhésion (Hertig et Rondeau, 2006 ; Legendre et *al.*, 2007 ; Mariat, 2009).

Il est difficile d'établir une stratégie absolue d'immunosuppression Le traitement médical ne se limite pas au traitement immunosuppresseur mais également au divers médicaments: tel que les antibiotiques (prévention infection urinaire et pneumocystose), les antifongiques, de façon systématique (Brick et *al.*, 2011).

- La surveillance

La surveillance du transplanté est capitale pour sa survie et celle du greffon. Elle consiste à :

- La recherche des Ac anti-HLA post-greffe de façon systématique, selon la « théorie humorale de la transplantation » de Terasaki, toute perte de greffon est précédée par l'apparition d'Ac anti-HLA (Terasaki et *al.*, 2005).

- Biopsie : L'étude histologique, réalisée sur les biopsies, est interprétée selon les critères standards de la classification internationale de Banff (Racusen, 2004).

Devant ces complications redoutables, le rôle du clinicien est double : il s'agit d'abord de choisir, surveiller et adapter le traitement immunosuppresseur afin d'en réduire autant sans compromettre la prévention du rejet ; il s'agit ensuite de surveiller, prévenir, diagnostiquer et traiter précocement et efficacement toute affection maligne ou infectieuse, car le pronostic vital en dépend.

II.1.MATERIEL

II.1.1. Patients

Notre travail a porté sur 28 patients dont 14 patients sont candidats à une transplantation rénale et 14 patients sont des donneurs, recrutés au niveau du service de Néphrologie au CHU Naphissa HAMOUD durant la période septembre-décembre 2012. Ce groupe contient 16 hommes et 12 femmes. Le même protocole a été réalisé pour les 27 transplantés rénaux (uniquement les receveurs) de notre étude rétrospective durant l'année 2012.

II.1.2. Appareillage et réactifs

Afin de réaliser le suivi, une gamme de réactifs et une série d'appareil sont utilisés Appareillage et réactifs (annexe 1).

II.2.METHODES

Notre étude est réalisée avec le sang veineux de 14 donneurs et 14 receveurs, prélevé sur héparine lithium.

Après prélèvement, le sérum est séparé du culot après une centrifugation à grande vitesse (l'annexe 2) à température ambiante.

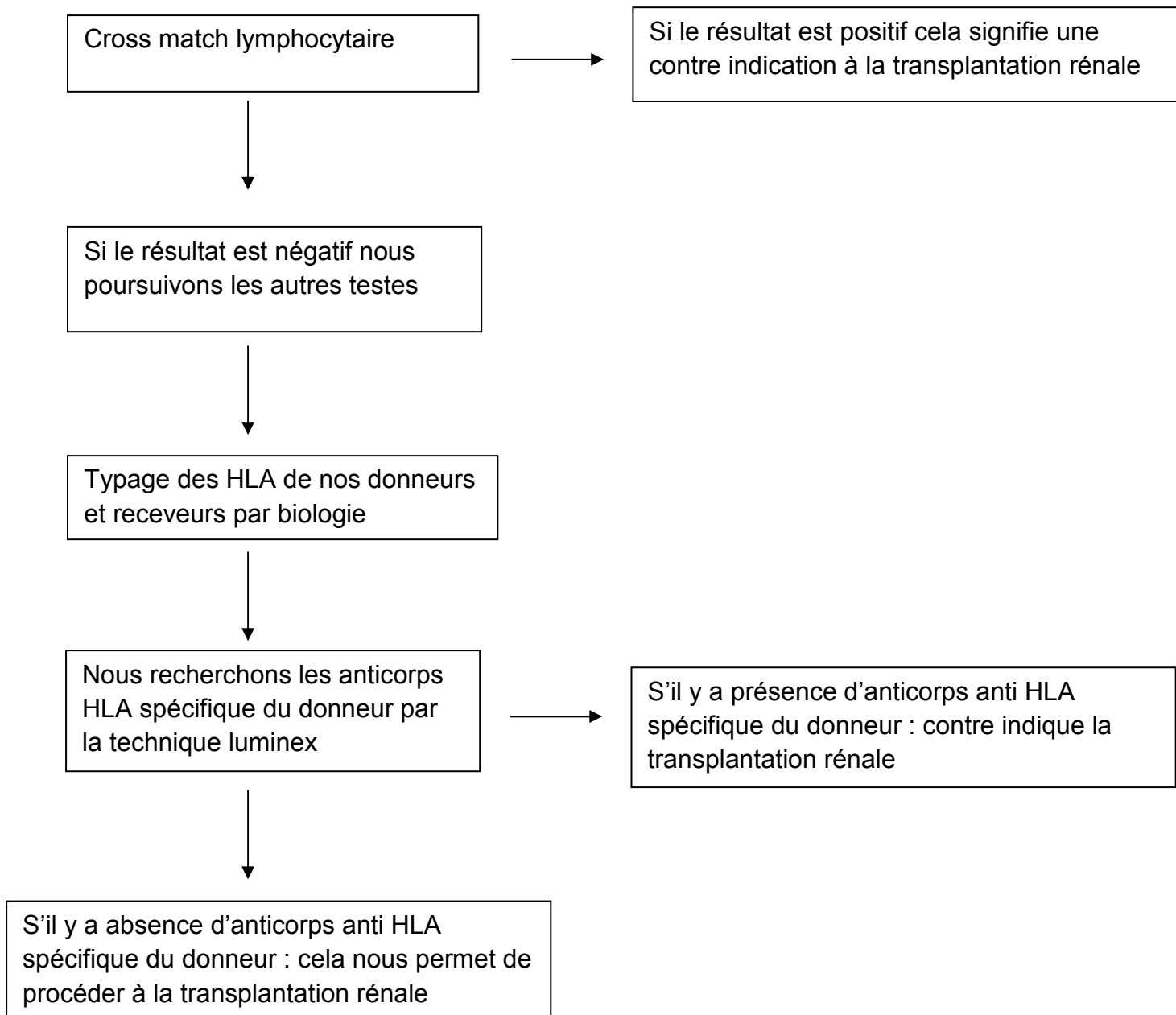
La préparation immunologique comprend la définition du groupe érythrocytaire ABO, du groupe tissulaire HLA, la recherche d'anticorps lymphocytotoxiques anti-HLA.

II.2.1 Compatibilité du système érythrocytaire ABO

Il est d'usage d'apparier receveur et donneur dans le système érythrocytaire ABO. Le groupage ABO est réalisé chez le donneur et le receveur car les Ag érythrocytaires ABO sont exprimés par les cellules épithéliales et endothéliales. Les Ac naturels anti-A et anti-B du receveur peuvent donc attaquer les vaisseaux sanguins du greffon ABO incompatible et entraîner un rejet

(Futagawa et Terasaki, 2005). Il n'est tenu aucun compte de la compatibilité Rhésus.

Nos donneurs et receveurs sont ABO compatible, nous procédons par la suite aux techniques suivantes :



II.2.2. Test de compatibilité entre donneur et receveur

II.2.2.1. Principe

Le cross match par lymphocytotoxicité sensibilisé à L'antiglobuline humaine (AGH) consiste à incuber les lymphocytes du donneur avec les sérums du receveur. Cette épreuve permet de détecter de façon sûre et spécifique des anticorps anti HLA spécifiques du donneur (Terasaki et Mc Clelland, 1965).

II.2.2.2. Mode opératoire

La préparation des cibles cellulaires est faite comme suit :

- Nous prenons 2 à 5ml du sang veineux du donneur prélevé sur héparine lithium que nous Diluons au demi dans l'eau physiologique et on Dépose sur Ficoll : 2/3 de sang dilué 1/3 de Ficoll. Nous Centrifugeons à 1800 tours/min pendant 20 min à 18°C. Après nous récupérons l'anneau lymphocytaire par aspiration.
- Nous effectuons deux lavages en solution Hanks à 3000 tours/min pendant 10 min. Nous re suspendons le culot des lymphocytes et on numérote la suspension obtenue au 1/10 au Hanks sur les cellules de Malassez.
- Nous ajustons la suspension 2500/ μ l à moyenne (entre 2000 et 3000 lymphocytes/ μ l) dans du Hanks normal, notre suspension cellulaire est prête à l'emploi.
- Nous répartissons les sérums des receveurs à raison 3, 2,1 μ l dans la plaque de Terazaki, qui est déjà enduite par l'huile de paraffine. Nous distribuons le témoin positif et négatif à raison de 3, 2,1 μ l dans chaque puit. Nous distribuons d' 1 μ l de suspension lymphocytaire. Nous incubons pendant 30 min à 22-25°C.
- Nous réalisons 2 lavages avec le tampon phosphate salin (PBS) en incubant 10 min pour chacun. Nous Fliquons légèrement la plaque puis on distribue 1 μ l d'anti globuline humaine (AGH) + 1 μ l de complément par puits. Nous incubons pendant 1 heure. Nous fliquons bien la plaque.
- Nous ajoutons le bleu de trypan et nous incubons pendant 2-5 min, nous effectuons la lecture au microscope optique (grossissement X100)

II.2.2.3 Lecture

La couleur bleu indique un cross match négatif qui veut dire l'absence d'anticorps anti HLA de classe I spécifique du donneur. La couleur blanche ou transparente indique un cross match positif qui veut dire la présence d'anticorps anti HLA de classe I spécifique du donneur.

II.2.3 Compatibilité HLA

Le typage HLA se fait chez le donneur et le receveur afin d'établir la meilleure compatibilité HLA possible (elle conditionne le succès de la greffe de cinq à 15 ans) (Aydingoz et *al.*, 2007). L'identité ou la semi-identité n'étant pas toujours possible. L'appariement est réalisé avec la personne ayant le moins de disparités (mismatch) au locus DR, puis B, puis A (Roberts et *al.*, 2004).

II.2.3.1. Technique de typage par biologie moléculaire selon le kit QIAGEN

Mode opératoire

- Préparation d'un bain marie à 56C°
- Le sang périphérique est centrifugé pendant 10mn.
- Nous prenons 200µl de buffy coat (anneau lymphocytaire) avec 20µL de QIAGEN protéase pour la lyse des membranes cellulaires. Nous ajoutons 200µl de tampon AL (tampon de lyse). Le mélange est agité pendant 15 secondes puis incubé à 56°C pendant 10 mn. 200 µl d'éthanol (96-100%) sont ajoutés puis agités pendant 15 s.
- Nous transférons le mélange dans une colonne QIAGEN, puis on centrifuge pendant 1mn à 13000 rpm, le filtrat est ensuite éliminé. Nous Ajoutons 500 µl de tampon AW1 à la colonne puis nous centrifugeons pendant 1 mn à 13000 rpm et on élimine le filtrat.
- Nous Ajoutons 500 µl de tampon AW2 à la colonne on centrifuge pendant 3mn à 14000 rpm puis on élimine le filtrat. Nous Ajoutons par la suite 200 µl de tampon AE à la colonne on incube pendant 5mn puis on centrifuge pendant 1mn a 13000 rpm.
- à la fin on récupère l'éluât que nous lisons sa DO à 260 et 280 nm.

II.2.3.2. SEQUENCE SPECIFIC PRIMER-PCR »

a-Principe

La technique de PCR-SSP est basée sur le principe que seules sont amplifiées les séquences d'ADN complémentaires des amorces spécifiques utilisées grâce à des ADN polymérases type thermostable sans activité correctrice. Ces couples d'amorces sont spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles selon le degré de résolution du kit utilisé. La technique de PCR-SSP dans le cadre du HLA a été décrite pour la première fois par Olerup en 1991 et 1992.

- Procédure

Nous mettons les ADN purs à une température ambiante à 25°. Le même Master Mix est utilisé pour tous les kits Olerup SSP®.

-Nous agitons le Master Mix avant de pipeter. Nous déposons le Master Mix et l'eau dans les puits à l'aide d'une pipette puis nous ajoutons à température ambiante l'échantillon d'ADN au mélange Master Mix – H₂O. (Voir le tableau 1). On couvre les plaques à l'aide de la feuille adhésive fournie.

- Nous plaçons les plaques dans le Thermocycleur à l'aide d'un adaptateur tube-plateau. Nous ne devons pas dépasser 5 minutes entre la distribution des échantillons et le début du programme de l'amplification.

- Au moment de lancer le programme Olerup SSP®, Nous précisons le volume réactionnel de 10 µl.

Dans le Thermocycleur, la réaction de PCR se déroule en 3 étapes constituant un cycle de PCR, et elles sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique :

- Dénaturation : réalisée à environ 95°C (94-96°C), elle permet la coupure des liaisons hydrogènes entre 2 bases complémentaires, ce qui entraînera une dissociation complète des deux brins d'ADN.

- Hybridation : elle permet la fixation des amorces. Elle est réalisée à une température définie selon la nature des amorces ($T=T_m-5^{\circ}\text{C}$), elle varie de 45 à 71°C.
- Elongation : elle permet l'allongement des amorces avec un ajout de dNTPs. Réalisée à environ 72°C. Les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

Nombres de cycles	Températures	Durées	Étapes
1 cycle	94°C	2 min	Dénaturation
10 cycles	94°C 65°C	10 sec. 60 sec.	Dénaturation Hybridation et élongation
20 cycles	94°C 61°C 72°C	10 sec 20 sec 50 sec	Dénaturation Hybridation élongation

Tableau Programme d'amplification PCR

Le programme PCR dure environ 1 heure et 16 minutes.

La dernière étape : nous conservons l'ADN amplifié à température ambiante.

Lecture

La lecture est faite dans l'instrument QIAxcel Advanced System. Le système avancé QIAxcel est une électrophorèse entièrement automatisée qui permet l'analyse des fragments d'ADN de 12 échantillons en moins de 3 minutes et un logiciel d'acquisition permet d'interpréter les résultats.



Figure 3 : Exemple d'une image de migration des produits d'amplification sur gel d'agarose.

II.2.4 Technique cross-match par LUMINEX (TEPNEL LIFECODES)

La technologie Luminex est une nouvelle technologie de cytométrie en flux permettant l'analyse de multiples réactions dans un seul tube ou micro puits (annexe 1). Il s'agit donc d'un système multi-analytique constitué d'un cytomètre de flux (Luminex 100) à 2 lasers (un laser rouge à 633 nm et un laser vert à 532 nm), d'un ensemble de microsphères (différents types de microsphères, possédant soit plusieurs soit un seul antigène HLA (SA) à leur surface), d'un lecteur de plaque 96 puits piloté par un ordinateur permettant l'acquisition des données et leur analyse.

II.2.4.1. Protocole de dépistage (screening) et identification (LSA)

- Préparation des Sérums

Nous conservons les sérums des receveurs qu'on a récupérés par centrifugation à grande vitesse du sang totale à moins de 20°C. Après la décongélation nous agitions puis centrifugeons à 3480 t/m.

- Cellules

Nous récoltons les cellules du donneur à partir sérums récupérés par centrifugation à grande vitesse du sang périphérique recueilli sur héparinate de sodium que nous conservons à température ambiante. Nous préparons les cellules

en lysat dans les 72h puis on le conserve sous forme d'alicotes à -80°C . Puis nous décongelons à 20°C , nous agitons et centrifugeons à 3480 (tours/min) pendant 5 minutes.

Mode opératoire

- Nous mettons le tampon de lavage 30 min à température ambiante (18° - 30°C), puis nous ajoutons $200\mu\text{L}$ H₂O pendant 2 min aux puits que nous utilisons. nous mettons un film sur les puits non utilisés. Nous aspirons la plaque à l'aide du laveur de plaque, nous utilisons le petit robinet gris. Nous essuyons le dessous de la plaque, et surveillons la pression du laveur.

- Nous agitons les sérums et les centrifugeons à 10000t/m pendant 3 minutes, puis nous distribuons dans chaque puits $40\mu\text{L}$ Tampon lavage + $12,5\mu\text{L}$ de sérum. Nous ajoutons les témoins positif et négatif sans toucher les filtres avec les cônes. Nous agitons les billes 1min puis ajoutons $5\mu\text{L}$ de billes à chaque puits et on Tapote la plaque

- Nous incubons la plaque pendant 30 min à l'agitation (~ 200 rotation/min) à t° ambiante et à l'abri de la lumière.

- Pendant l'incubation : Nous préparons la dilution du conjugué ((n+1) : Par puits : $45\mu\text{L}$ de tampon de lavage + $5\mu\text{L}$ de conjugué) et on conserve à l'abri de la lumière. Après l'incubation : nous ajoutons $100\mu\text{L}$ de tampon de lavage par puits et on aspire (on Utilise le petit robinet gris).on surveille la pression du laveur.

- Nous Ajoutons $250\mu\text{L}$ de tampon de lavage par puits et on aspire. Nous répétons cette étape 2 autres fois. On essuie le dessous de la plaque.

- Nous ajoutons $50\mu\text{L}$ de conjugué dilué dans chaque puits. Nous tapotons la plaque et incubons pendant 30 minutes à l'agitation (~ 200 rotations/min) à t ambiante et à l'abri de la lumière

- Après l'incubation : nous ajoutons $130\mu\text{L}$ de tampon de lavage par puits. Nous effectuons la lecture de la plaque sur luminex.

Résultats et critère de validité

- 3 billes de contrôle négatif dont la moyenne des MFI correspond à la fluorescence de bruit de fond. Teste non valide si > 500 .
- 1 bille de contrôle positif qui permet de vérifier que la fixation du conjugué (anti-IgG-SA-PE) a bien marché. Test valide si $MFI > 10000$.
- LCR : billes recouvertes d'Ac anti classe I et II biotynilés. Permet de vérifier que la fixation des Ag HLA du donneur est correctement effectuée sur les billes, avec un conjugué différent (SA-PE). Test valide si $MFI > 8000$.
- Pour vérifier la technique, il existe dans le kit un sérum de contrôle positif et un négatif qui seront testés vis-à-vis des lymphocytes de contrôle qui auront été réhydratés. La MFI du puits du sérum contrôle positif testé vis-à-vis des lymphocytes contrôle réhydraté doit être supérieur à 10000.
- L'intensité moyenne de fluorescence de chaque bille est comparée à 3 valeurs de cut-offs (BAF pour Background Adjustment Factors). Ces 3 cut-offs sont calculés à partir de la fluorescence du bruit de fond des 3 billes consensus (CON), dont les valeurs sont lots dépendantes :

-Adjust MFI 1 = $MFI \text{ bille capture} - BAF \text{ CON } 1$

-Adjust MFI 2 = $MFI \text{ bille capture} - BAF \text{ CON } 2$

-Adjust MFI 3 = $MFI \text{ bille capture} - BAF \text{ CON } 3$

- ❖ Un échantillon est positif si au moins deux adjMFI sont positives.
- ❖ Un échantillon est négatif si au moins deux adjMFI sont négatives.
- ❖ Le cut-off est à 300.

III.1 RESULTATS et DISCUSSION

III.1.1 Etude rétrospective

Notre étude porte sur 41 patients transplantés par un rein issu de donneurs vivants (apparentés aux receveurs), recrutés durant l'année 2012 au service de néphrologie C.H.U. Naphissa HAMOUD.

Nous avons effectué une étude rétrospective sur 27 transplantés rénaux tandis qu'un bilan pré-greffe a été adressé à 28 patients dont 14 sont des donneurs et 14 sont candidats à une transplantation rénale. Le bilan pré-greffe a été réalisé au niveau du service d'immunologie au C.H.U Mustapha Pacha (durant la période septembre- décembre 2012).

III.1.2 Etude épidémiologie

III.1.2.1 Répartition selon le type de donneurs

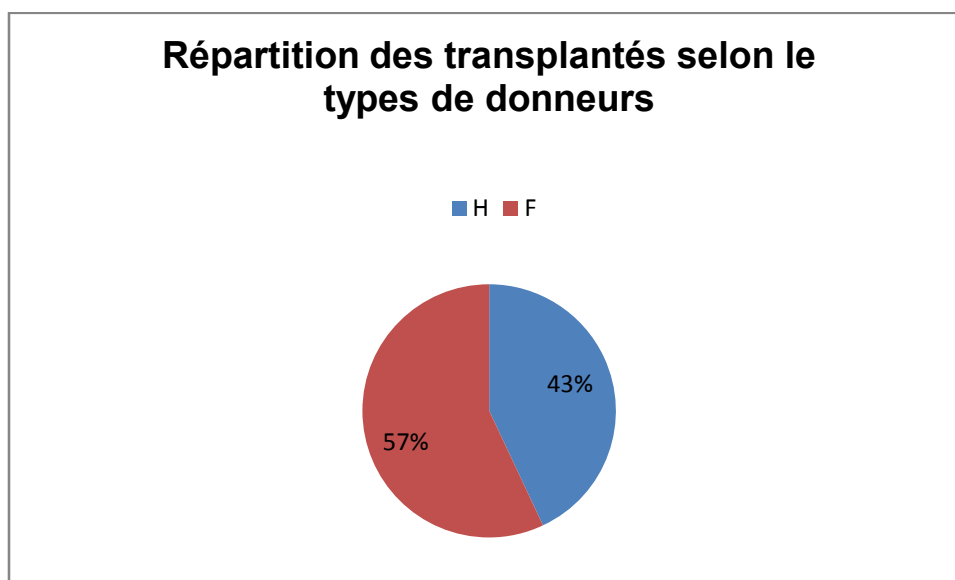


Figure 4: Répartition des patients greffés selon le type de donneurs.

Parmi les 14 couples les donneurs de sexe féminins sont majoritaires avec un pourcentage de 57% contre 43% pour les hommes. Ces résultats sont en accord avec la littérature.

III.1.2.2 Répartition selon le sexe des 14 transplantés rénaux

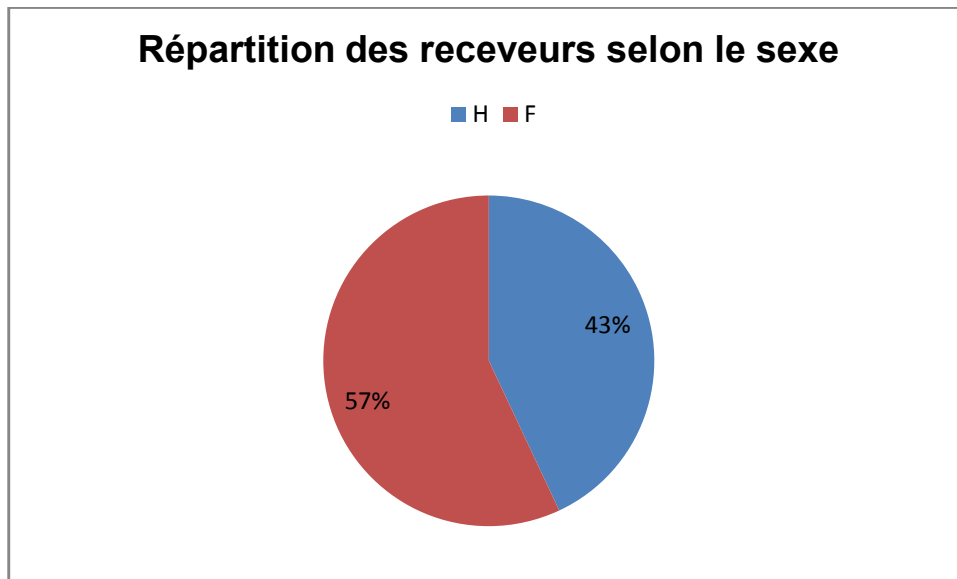


Figure 5: Répartition des patients greffés selon le sexe.

Notre série d'études comprend 14 couples dont 16 hommes et 12 femmes sont répartis en donneurs et receveurs. 57 % des transplantés (receveurs) sont des femmes (8 femmes) alors que 43 % sont des hommes (6 hommes). Le rapport sex-ratio H / F est des 1.3.

III.1.3 Etude clinique

III.1.1.3 Répartition selon le taux d'identité HLA entre les donneurs et les receveurs

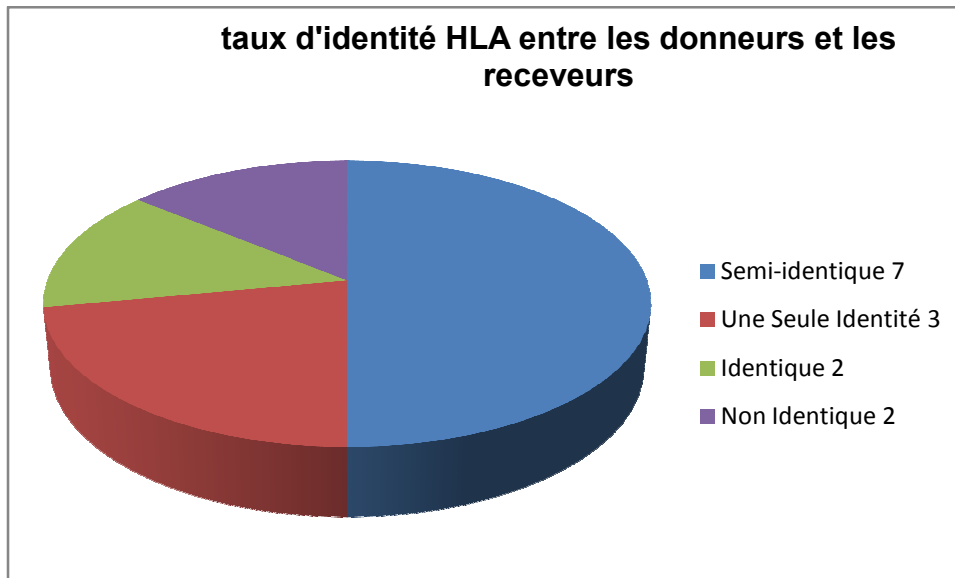


Figure 6 : Pourcentage d'identité HLA entre le donneur et le receveur

La semi-identité des HLA entre les donneurs et les receveurs occupe la moitié des taux d'identité avec un pourcentage de 50%, une seule identité HLA vient en deuxième position avec 22%, puis les HLA identique et non identique avec un pourcentage de 14% pour chacune.

III.1.3.2 Répartition selon le taux de PRA chez les 14 patients transplantés

Anticorps positifs en pré greffe	Anticorps spécifiques du donneur (DSA)	Anticorps non spécifique du donneur (NDSA)
Anticorps anti HLA de classe I	N=0	N=00
Anticorps anti HLA de classe II	N O	N=00
Anticorps anti HLA classe I et II	N=O	N=03

Tableau II : la spécificité des anticorps anti HLA développés en pré greffe

Parmi les 14 transplantés rénaux l'allo-immunisation en pré-greffe est présente chez 21% des transplantés ce qui est en accord avec les données bibliographiques.

Nous avons combiné nos résultats avec ceux de l'étude rétrospective des patients transplantés (receveurs) que nous avons effectués sur les transplantés recrutés au niveau du service Néphrologie du CHU Naphissa HAMOUD durant toute l'année 2012.

III.1.4 Etude épidémiologie

III.1.4.1 Répartition selon le sexe

La greffe rénale est effectuée chez les deux sexes.

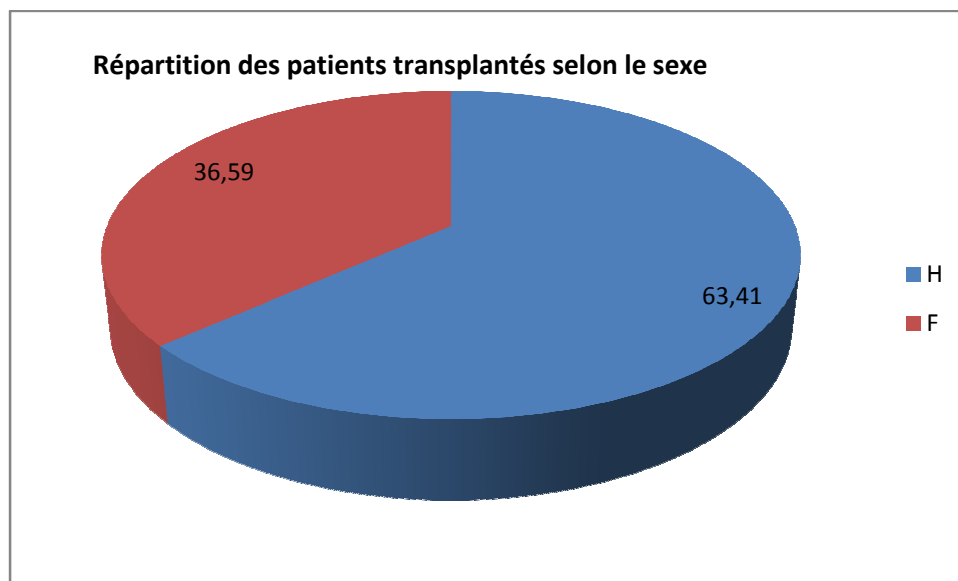


Figure 7: Répartition des patients greffés selon le sexe.

Notre série comprend 26 hommes et 15 femmes. 63,41% des patients sont de sexe masculin, tandis que 36,59% sont de sexe féminin. Le rapport sex-ratio H / F est 1.73.

Nos résultats vont de même que ceux apportés dans le rapport de l'agence de biomédecine en 2010 où le taux de prévalence de la transplantation rénale est 1,6

fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Ainsi que ceux apportés dans l'étude d'Intissar et al(2010) 64,1% des hommes et 35,8% des femmes.

III.1.4.2 Répartition selon l'âge

L'âge de nos patients transplantés rénaux, varie entre 7 et 57 ans, avec une moyenne d'âge de 31 ans ($\pm 11,89$). Notre série d'étude comporte 6 enfants transplantés rénaux (14,63%) moins de 16 ans et un seul transplanté rénal (2,44%) âgé de 57 ans.

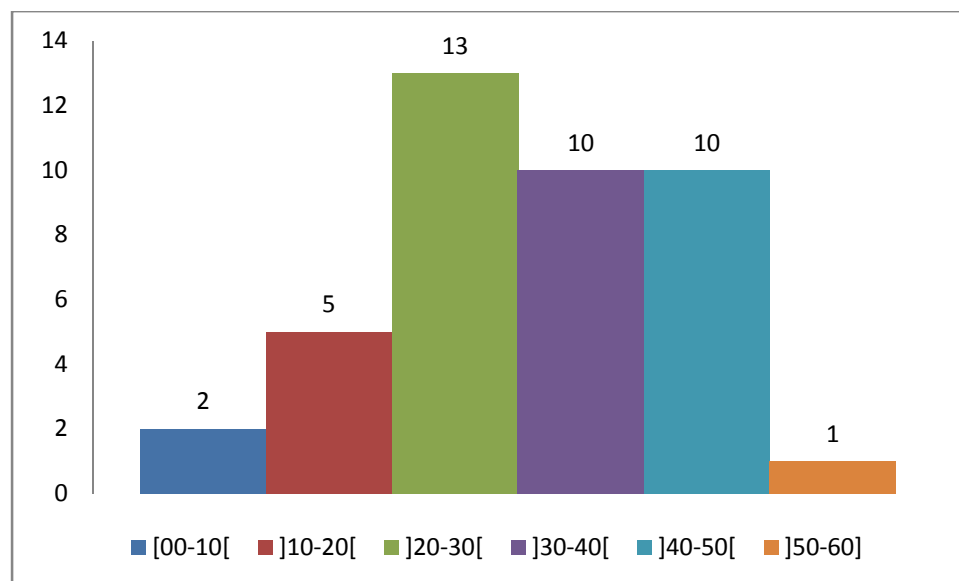


Figure 8 : Répartition des patients greffés selon l'âge.

La tranche d'âge] 20 -30[est la plus concerné par la transplantation rénale avec un effectif de 13 transplantés suivit des tranches d'âges]30-40[et]40-50[qui renferment 10 transplantés rénaux pour chacune.

La transplantation rénale n'a pas d'âge limite, avec une priorité pédiatrique en raison de la diminution de la durée de dialyse voir l'évité et diminuer l'impact que ce traitement a sur la scolarité et la vie sociale de l'enfant (Niaudet, 2001). Notre série d'étude comporte 6 enfants (14,63%) moins de 16 ans et un seul transplanté rénal (2,44%) âgé de 57 ans. Tous ces patients ont montré un taux de survie égale à 100% à un an. Nos résultats sont similaires à ceux retrouvé dans la littérature. Selon Niaudet (2001) en France, la survie des enfants de moins de 15 ans est de 97 % à 1 an. Benfield (1999) rapporte que selon le rapport du registre

du NAPRTCS, une survie des enfants de 96,5 % à 1 an après la transplantation. Le système des données rénales des états unis (1999), a rapporté qu'aux Aux États-Unis, les sujets de plus de 65 ans furent transplantés dans la période 1993-1997, représentant 8,5 % de la population greffée à la même époque. Jassal (1997) a montré dans une étude des individus âgés, le constat d'une survie plus longue chez les plus jeunes est confirmé : 1 an après greffe, le taux de survie est de 95 % chez les moins de 60 ans et de 92% pour les plus vieux. Le constat de Doyle est proche, après censure pour les décès, la survie du greffon est équivalente chez les sujets âgés et chez les jeunes : 90 % à 1 an et 80 % à 5 ans.

III.1.5 Etude clinique

Les réactions croisées réalisées entre les lymphocytes du donneur et le sérum du receveur (cross-match) ont été négatifs.

III.1.5.1 Répartition selon le degré d'identité entre le donneur et le receveur

Traditionnellement le degré d'identité HLA entre le donneur et le receveur est évalué par le nombre de mismatches des antigènes HLA-A, HLA-B et HLA- DR du donneur.

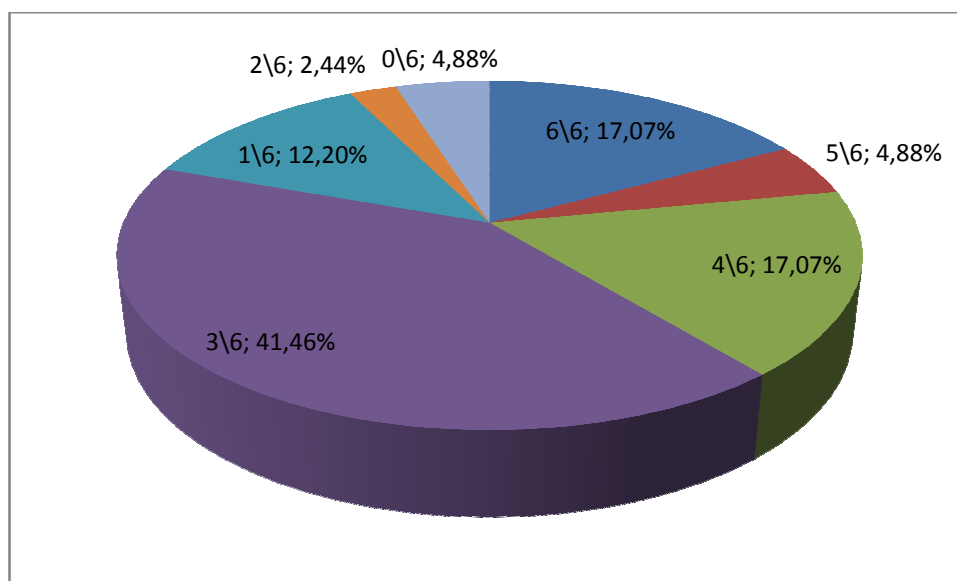


Figure 9 : Pourcentage d'identité HLA entre le donneur et le receveur.

Dans notre série d'étude, la semi-identité HLA (3/6) entre le donneur et le receveur constitue le pourcentage le plus élevé qu'est de 36,58%. Une identité HLA complète (6/6), ceci dit, aucun mismatch entre le donneur et le receveur avec un pourcentage de 17,07%.

Notre série comporte aussi des transplantés rénaux qui ne présentent aucune identité HLA (0/6) avec leur receveurs et constituent un pourcentage de 4,88%.

Malgré les incompatibilités entre le HLA du donneur et celui du receveur, nos patients ont montré un taux de survie, durant la période du suivi, égale à 100%. Les résultats de notre étude sur le degré d'identité HLA entre le donneur et le receveur sont similaires à ceux rapportés par le rapport annuel De l'Agence de biomédecine. Le nombre d'incompatibilités donneurs-receveurs n'influence pas les résultats de la greffe rénale.

Cekcu et Terasaki(1998), montre le rôle de l'identité HLA en matière de survie de reins prélevés chez le donneurs vivants estimée 95% à un an et à 80% à 5ans chez les individus HLA identiques. Ainsi que la survenu de quelques rares épisodes de rejet dans le cas d'une identité complète illustre l'importance en incompatibilité en allo-antigène mineurs qui s'exprime malgré le traitement immunosuppresseur.

Gerbase-de-Lima (1984) a aussi démontré que les patients présentant une similitude totale avec le système HLA du donneur ont des taux de survie du greffon à 1 et 5 ans de 90 et 83 % respectivement, contre 68 et 54 % pour les patients présentant un haplotype identique.

La quasi-totalité de nos résultats sont au contraire avec ceux trouvé dans la littérature : le résultat d'Opelz (1998) est de même que celui de Cekcu, qui montre un taux de survie à une année égale à 95% entre les individus HLA identique. Opelz a montré aussi que le taux de survie de greffon HLA semi-identique égale à 85% à un an. Tandis que les patients qui ne montrés aucune identité avec leur donneurs avait un taux de survie à un an égale à 80%.

III.1.5.2 Répartition selon le taux de PRA (Panel Reactive Antibodies) en pré-greffe chez les transplantés rénaux :

Anticorps positifs en pré greffe	Anticorps spécifiques du donneur (DSA)	Anticorps non spécifique du donneur (NDSA)
Anticorps anti HLA de classe I	N=0	N=02
Anticorps anti HLA de classe II	N O	N=02
Anticorps anti HLA classe I et II	N=0	N=03

Tableau III : la spécificité des anticorps anti HLA développés en pré greffe

Dans notre série l'allo-immunisation en pré greffe est de 17,07%. Elle rejoint celle d'Okasakiet *al.* (1997) qui ont rapporté un taux de 14 % d'immunisation dans une série de 186 patients. La technique luminex singl antigen (SA) a permis de les identifier les PRA présents dans le sérum des receveurs comme étant des anticorps non spécifique du donneur (DSA) Les 7 receveurs qui ont développé des anticorps anti HLA sont toutes des femmes ; 2 d'entre elles avaient été transfusé, et les 5 avaient mené des grossesses.

Selon une étude menée par Pelletier (2002) chez 277 receveurs d'un transplant rénal 16,8% avaient développés des anticorps en pré-greffe et parmi eux 11,3% n'étaient pas des anticorps HLA spécifiques du donneur. Selon Claas (2004) et Legendre(2007), la survie du greffon des patients immunisés à deux ans semble identique (87 %) à celle des patients non immunisés transplantés pendant la même période. Lefaucheur et Jasn (2010) ont montré que chez des patients qui avaient des anticorps anti HLA mais qualifié comme étant des non DSA (NDSA), avaient une

survie 95% une année après la transplantation. Contrairement à nos résultats (Glotz, 2008) a montré un taux de survie du greffon était intermédiaire, allant de 66 % à 86 % à un an lorsque les anticorps n'étaient pas dirigés contre le greffon.

Durant la durée du suivi, 4 de nos patients ont montré des complications de la fonction rénale qui est due à l'élévation du taux de la créatininémie. Selon Hariharan (2002), une créatininémie élevée à 6 mois ou 1 an est de mauvais pronostic à long terme, confirmant le rôle délétère de la réduction néphrotique quelle qu'en soit la cause. Selon Mourad et *al.*(2005), la créatininémie augmente de façon lente et progressive, parallèlement à l'apparition ou l'aggravation d'une protéinurie et/ou d'une hypertension artérielle.

Malgré ces complications du greffon, tous nos patients ont montré une survie du greffon égal à 100%.

Anglicheau D.,Zuber J.,Martinez F.,Méjean A.,Patey N.,Correas JM.,Le Quintrec M., Timsit MO.,Mamzer-Bruneel MF.,Noël LH.,Thiounn N.,Hélénon O.,Thervet E.,Legendre C. 2007. Transplantation rénale :réalisation et complications, Elsevier Masson SAS, 18-065-E-10. P :1-20.

Bakir N.,Sluiter WJ.,Ploeg RJ.,van Son WJ.,TegzessAM. 1996. Primary renal graft thrombosis. *Nephrol Dial Transplant.*, **11**:140-7.

Bayat S.,Kessler M.,Briançon S.,et al. 2010. Survival of transplanted and dialysed patients in a French region with focus on outcome in the elderly. *Nephrol Dial Transplant .*, **25**(1):292-300

Benfield MR.,McDonald R.,Sullivan EK.,Stablein DM.,Tejani A.1999. The1997 Annual Renal Transplantation in children report of the north american pediatric renal transplant cooperative study (NAPRTCS). *Pediatr Transplant.*, **3** :152-167

Bourquina V., et Martinb P Y. 2006. Insuffisance rénale chronique: prise en charge. In *CURRICULUM Forum Med Suisse.*, **6** : 794-803.

Brick C.,Atouf W.,Benseffaj N.,Essakalli M. 2011. Unite´ d'immunologie, service de transfusion sanguine et d'hémovigilance de l'hôpital Ibn Sina, CHU de Rabat, Rabat, Maroc b UFR d'immunologie, faculté de médecine et de pharmacie, université Mohamed V Souissi, Rabat, Maroc, P.18-26.

Castillo-Lugo JA et Vergne-Marini P. 2005. Hypertension in kidney transplantation. In *Seminars in nephrology.* WB Saunders, 2005. p. 252-260.

Canaud B.,Ryckelynck JP;et Hourmant MY. 2005. Le traitement de suppléance de l'insuffisance rénale chronique terminale. *La presse médicale*,34 (16), 1197-1199.

Candon S. 2007. Transplantation rénale : aspects immunologiques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Néphrologie*, **18**-065-B-10.

Cekca JM, Terasaki P. 1998. THE UNOS scientific renal transplant survey. In Terasaki P and Cekca JM. Eds, *clinical transplants 1994.* Los Angeles : UCLA Tissue typing laboratory ;1-18.

Chergui N. 2012. [La Journée Mondiale du rein. Centre de presse d'El Moudjahid : 70 % des donneurs sont des femmes.](#)

Cambe C. 2009 :Insuffisance rénale Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie. Rapport annuel.

Claas FH.,Witvliet MD.,Duquesnoy RJ.,Persijn GG.,Doxiadis II. 2004. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation* ;**78**:190.

Colvin RB.,et Smith R N. 2005. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Reviews Immunology*, **5**(10), 807-817.

Colvin RB. 2007. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, **18**(4), 1046-1056.

Delaporte., V. 2011 : Service d'urologie, hôpital la Conception, 145, boulevard Baille, 13005 Marseille, France Prog Urol, pp.789-792.

Doyle SE.,Matas AJ., Gillingham K., Rosenberg M. 2000. Predicting clinical outcome in the elderly renal transplant recipient.*Kidney Int.*, **57** : 2144-2150.

Du C.,Jiang J.,Guan Q.,Yin Z., Masterson M.,Parbtani A., ... et Jevnikar A M. 2004. Renal Tubular Epithelial Cell Self-Injury Through Fas/Fas Ligand Interaction Promotes Renal Allograft Injury. *American Journal of Transplantation*, **4**(10), 1583-1594.

Ducloux D.,Motte G.,Challier B.,Gibey R.,Chalopin JM. 2000. Serum total homocysteine and cardiovascular disease occurrence in chronic, stable renal transplant recipients: a prospective study. *JAmSoc Nephrol.* **11**:134-7.

Dussol B. 2011. différents stades de l'insuffisance rénale chronique: recommandations. *Immunoanalyse et biologie spécialisée.*, **10**-1016-J-003.

El-Agroudy AE.,El-Husseini AA.,El-Sayed M.,Mohsen T.,Ghoneim MA. 2005. A prospective randomized study for prevention of postrenal transplantation bone loss. *Kidney Int.*, **67**:2039-45.

Emmanuelle KOHLER.2010.Thèse médecine spécialisée, néphrologie.

Euvrard S.,Morelon E.,Rostaing L.,Goffin E.,Brocard A.,Tromme I., ...et Dantal J. 2012. Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation. *New England Journal of Medicine.*, **367**(4), 329-339.

Gerbase-de-Lima M.,Persoli LB.,Leser W.,Peres C., de Souza JM., Peixinho ZF et al. 1984. HLA compatibility and graft survival in 502 kidney transplantation. *Braz J Med Biol Res.*, **17** (3-4) : 309-12.

Ghisdal L., Touchard G., Goujon JM., Buob D., Durand D., Mourad G., Lang P., Kessler M.,Snanoudj R, Berthoux F, Merville P, Ouali N, Squifflet JP, Bayle F, Bourgeon B.,Rifle G.,Peeters P .,Delahousse M.,Legendre C.,Bourbigot B., Noe C.,Abramowicz D. 2008. Premier épisode de rejet aigu après transplantation rénale :étude des caractéristiques histopathologiques en fonction du risque immunologique du patient, *nephro*, pp.173-180.

Giaretta F.,Bussolino S.,Beltramo S.,Fop F.,Rossetti M.,Messina M., ..et Biancone L. 2012. Different regulatory and cytotoxic CD4⁺ T lymphocyte profiles in renal transplants with antibody-mediated chronic rejection or long-term good graft function. *Transplant immunology*.

Glitz D. 2008. Intérêt du monitoring du rejet aigu médié par anticorps post-transplantation, *Néphrologie & Thérapeutique.*, **4** :S8-S12.

Guild WR., Harrison JH, Merrill JP and Murray J. 1955. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 67:167-173.

Gunning ME.,Ingelfinger JR.,King AJ.,Brenner BM. 1995. Vasoactive peptides and the kidney. In : Brenner BM ed. *The Kidney*. Philadelphia : WB Saunders, 627-712.

Halloran PF.2004. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation.*New England Journal of Medicine.*, **351**(26), 2715-2729.

Hariharan S.,McBride MA.,Cherikh WS.,Tolleris CB.,Bresnahan BA.,Johnson CP. 2002. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. *Kidney Int.*,**62**:311-8.

Heisel O.,Heisel R.,Balshaw R.,Keown P. 2004. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant.*, **4**:583-95.

Hertig A et Rondeau E. 2006. Immunomodulation dans la greffe rénale: ce qui a changé en 20 ans. *Réanimation*, **15**(4), 253-258.

Henry N et Sèbe P. 2008 : Anatomie des reins et de la voie excrétrice supérieure. Elsevier Masson SAS, *Néphrologie*, 18-001-C-10.

Hoffmann T. 2009. Association entre polymorphisme de gènes de l'immunité et évènements cliniques post-transplantation rénale. Diss. Tours.

Intissar H., Skalli Z., Benamar L., Ezzaitouni F., Ouzeddoun N., Bayahia R.,

Rhou H. 2010. The Pan African Medical Journal - ISSN 1937-8688.

Jassal SV.,Opelz G.,Cole E. 1997: Transplantation in the elderly: a review. *Geriatr Nephrol Urol.*, 7 : 157-165

Jassal SV.,Roscoe JM.,Zaltzman JS.,Mazzulli T.,Krajden M.,Gadawski M., ... et Cole EH. 1998. Clinical practice guidelines: prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology.*, 9(9), 1697-1708.

Karie SV.,Launay-Vacher et al. 2007.Toxicité rénale des médicaments. Elsevier Masson Néphrologie SAS, 18-066-A-10 :1-13.

Kolopp-Sarda MN.,Malcus C et Kohler C. 2008. Immunologie de la transplantation: rejets et infections en transplantation d'organes solides. *Revue Francophone des Laboratoires* ., 403:23-30.

Koolman J., et Röehm KH. 2005. Color atlas of biochemistry. Thieme.

Kurokawa K, Fukagawa M, Hayashi M, Saruta T. 1992. Renal receptors and cellular mechanisms of hormone action in the kidney. In : Seldin DW, Giebisch G eds. The kidney : physiology and pathophysiology. New York : Raven Press, 1339-1372.

Lefaucheur C.,Loupy A.,Hill GS.,Andrade J.,Nochy D.,Antoine C.,Chantal Gautreau C.,Charron D.,Glantz D and Suberbielle-Boissel C. 2010: Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. *American Society of Nephrology.*, 21:1398-1406.

Legendre C.,Anglicheau D.,Loupy A.,Zuber J.,Noe'I LH.,Patey N., et al. 2007 : Transplantation rénale chez les patients à « haut risque immunologique ». *Actual Nephrol.*,21:225–35.

Legendre C., Zuber J., Anglicheau D., Le uintrec M., Martinez F., Mamzer-brunee IM-F., Thervet., E. 2007 . Immunosuppression en transplantation rénale, *Elsevier Masson*, 18:1-4.

Legendre C, Loupy A, Anglicheau D, Zuber J , Noël LH, Thervet É, Martinez F, Mamzer-Bruneel MF, Snanoudj R, Bererhi L, Nochy D, Suberbielle-Boissel C. 2010 : Rejets aigus humoraux, France 18-065-E-65, pp : 1-7

Maddox DA et Brenner BM. 1991. Glomerular ultrafiltration. In : Brenner BM, Rector FC eds. *The kidney*. Philadelphia : WB Saunders, 205-244.

Mariat C. 2009. Les nouvelles molécules en transplantation. *Néphrologie & Thérapeutique*, 5, S400-S404.

Moal MC. 2008. Tumeurs solides après transplantation rénale. *Néphrologie et Thérapeutique.*, 4 : S214-217.

Moalic V. cour de Cross match Luminex avec le kit Donor Specific Antibody (DSA) Tepnel Lifecodes.

Mourad G, Garrigue V, Bismuth J, Szwarc I, Delmas S, Iborra F. 2005 . Suivi et complications non immunologiques de la transplantation rénale, EMC, 18-065-D-10, pp : 61–82.

NIAUDET P. 2001. Transplantation rénale chez l'enfant. Elsevier masson, *Néphrologie-Urologie-Pédiatrie.*, 18-065-G-10-4-084-D-35.

Niaudet, P. 2004. Syndromes néphrotiques congénitaux et infantiles. EMC-*Pédiatrie*, 1(1), 89-96.

Oeconomos N., Hamburger J., Delinotte P., Vaysse J., Richet G., Antoine B., Elmelik E and Perrin C. 1953. Attempt at renal homograft (maternal kidney) after nephrectomy for traumatism of a lone kidney. *Mem Acad Chir (Paris).*, 79:642-652.

Opelz G., Wujciak T., Ritz E. 1998. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. *Kidney Int.*, 53:217-22.

Okazak H., Sato T., Miura S et Amada N. 1997. Donor-specific blood transfusion in living-related renal transplantation: Fourteen-year experience. In *Transplantation proceedings .*, 29(1-2): 200-202. Elsevier.

Pelletier R.,Hennessy P.,Adams P.,VanBuskirk A.,Ferguson R.,Orosz C. 2002. Clinical significance of MHC-reactive alloantibodies that develop after kidney or kidney-pancreas transplantation. *Am J Transplant.*,2:134–41.

Petitclerc T.1998. Hémodialyse ; principes généraux et modalités de traitement. *Médecine thérapeutique.*, 2 (7) : 557-66.

Petri B et Bixel MG. 2006 Oct. Molecular events during leukocyte diapedesis. 273(19):4399-407.

Proulx C. 2011 Organes excréteurs.
<http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/702/chapitre3.htm>.

Racusen LC.,Halloran PF et Solez K. 2004. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *American Journal of Transplantation.*,4(10), 1562-1566.

Rebibou JM. 2008. Sélection du donneur et du receveuren vue d'une transplantation rénale indications et résultats, Elsevier Masson SAS, 18-065-C-10.

Rocha P N.,Plumb TJ.,Crowley SD., et Coffman T M. 2003. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunological reviews*, 196(1), 51-64.

Sagedal S.,Hartmann A et Rollag H. 2005. The impact of early cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Clinical Microbiology and Infection.*, 11 (7), 518-530.

Salmela KT et Kyllönen LEJ. 2004, March. Two decades of experience with cyclosporine in renal transplantation in Helsinki. *In Transplantation proceedings.*, 36 (2) :S94-S98. Elsevier.

Sebe P.,Traxer O.,Lechevallier E., et Saussine C. 2008. Anatomie morphologique de la voie excrétrice supérieure intrarénale: considérations anatomiques appliquées à l'endo-urologie. *EMC Progrès en urologie*, 18(12), 837-840.

Streblow DN.,Orloff SL.,Nelson JA. 2007. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus, *Curr. Opin. Immunol.* 19 577-582.

Sumitran-Holgersson., S. 2008. Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. *Current opinion in immunology*, 20(5), 607-613.

Terasaki P, Mizutani K, Shih RNJ, Pei R, Ozawa M, Lee J. 2006. Frequency of MIC antibody in rejected renal transplant patients without HLA antibody, *Hum Immunol*, **67**:223–9.

Thaunat O.,Badet L.,El-Jaafari A.,Kanitakis J.,Dubernard JM.,Morelon E. 2006. Composite tissue allograft extends a helping hand to transplant immunologists. *Am J Transplant.* **6**:2238-42.

Tiercy J M.,Roosnek E. 1998. L'incompatibilité HLA en transplantation. *Médecine et hygiène*, **56**(2198), 432-437.

Tonelli M.,Wiebe N.,Knoll G.,Bello A.,Browne S., Jadhav D., ... et Gill J. 2011. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *American Journal of Transplantation*, **11**(10), 2093-2109.

United States Renal Data System. ExcerptsUSRDS 1999. annual data report. *Am J Kidney Dis* ; 34 (suppl)

Vincent B.,Pierre-Yves. 2006. Insuffisance rénale chronique: prise en charge. *Forum Med suisse* , curriculum., **6** : 794-803

Wolfe R A.,Ashby V B.,Milford E L.,Ojo A O.,Ettenger R E.,Agodoa L Y., .et Port F K. 1999. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *New England Journal of Medicine*, **341**(23), 1725-1730.

INTRODUCTION

La transplantation rénale est une forme de traitement qui consiste à remplacer un rein défectueux par un rein prélevé sur un cadavre ou un donneur vivant (Wolf et al., 1999). Elle représente actuellement la plus satisfaisante et la plus économique des méthodes de traitement de l'insuffisance rénale terminale, par rapport à la technique de suppléance classique qu'est la dialyse, elle est effectuée chez les deux sexes (60% chez les hommes et 40% chez les femmes). La transplantation rénale n'est pas sans conséquences car elle engendre une puissante réponse immunitaire spécifique menant aux phénomènes de rejet du greffon (Hoffmann, 2009).

Les réactions de rejets du greffon mettent en jeu des allo-antigènes du donneur tels que les antigènes leucocytaires humains (HLA) (Tiercy et Roosnek, 1998), les antigènes érythrocytaires, les gènes reliés à la chaîne α du complexe major d'histocompatibilité de classe I (MICA) (Sumitran-Holgersson, 2008). Ces allo-antigènes sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes du donneur ou du receveur aux lymphocytes T helper et cytotoxiques du receveur. Ce qui permet de développer des réponses immunitaires humorales et cellulaires délétères (Candon, 2007).

L'induction de ces réponses immunitaires entraîne des lésions au sein du tissu greffé qui sont présentées par des thromboses, des hémorragies, des nécroses corticale (Colvin, 2007) et tubulaire, des lésions glomérulaires et vasculaires (Anglicheau et al., 2007). Ces lésions ont des conséquences à court et à long terme sur la fonction du rein (Kolopp-Sarda et al., 2008).

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés dans notre travail sur :

L'Évaluation du statut immunologique du donneur et du receveur par différentes techniques, afin de sélectionner un donneur compatible.

L'influence de la présence des panels d'anticorps réactifs dans les sérums des receveurs et la survie des transplants.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La transplantation rénale constitue une véritable révolution pour les patients atteints d'une insuffisance rénale chronique terminale et qui n'avaient pour seul recours que la dialyse comme traitement palliatif à vie.

Au regard global de nos résultats, il apparaît que la transplantation rénale en Algérie est réalisée chez les deux sexes avec un pourcentage important chez les hommes.

Nos résultats indiquent également que la transplantation rénale n'a pas d'âge limite, vu l'amélioration de vie qu'elle apporte aux insuffisants rénaux.

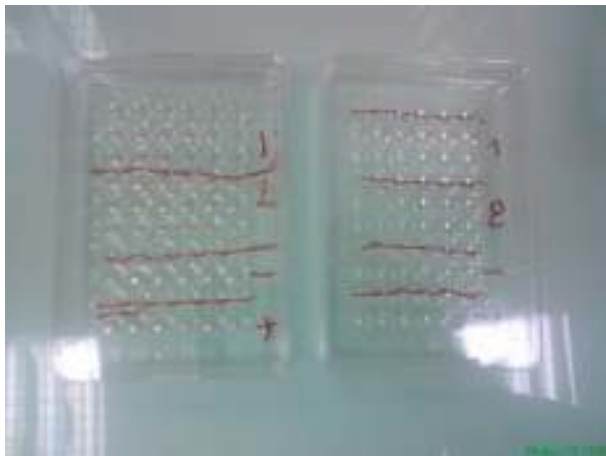
De plus, nos résultats indiquent que le taux d'identité entre le donneur et le receveur et les présences d'un panel d'anticorps réactifs non spécifique aux donneurs en pré-greffe n'ont pas d'influence sur la survie du transplant tant que le traitement immunosuppresseur est entretenu.

Malgré que la survie de nos patients soit estimée à 100%, le rejet rénal reste un risque redoutable et menaçant si le traitement immunosuppresseur n'est pas pris avec rigueur.

Il serait intéressant d'utiliser des techniques de recherche et d'identification sensibles tel que Luminex lors de la recherche des anticorps dirigés contre les antigènes des donneurs dans les sérums des patients transplantés afin de contrôler et de prévenir des épisodes de rejets.



Seringue multi branches



Plaque de Terasaki



Cellules de Malassez



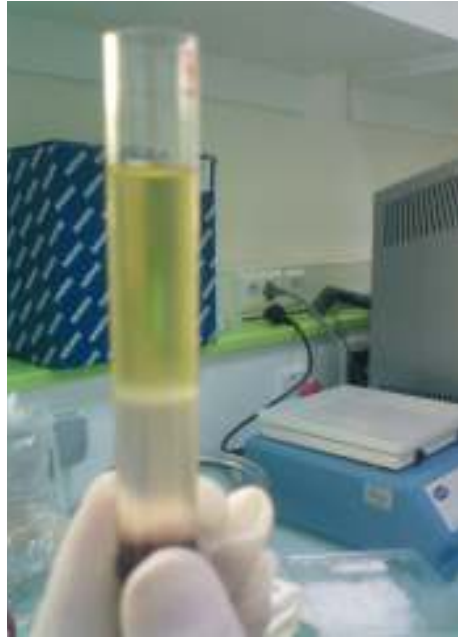
Ficoll + Hanks



Centrifugeuse



Spectrophotomètre



Anneaux de Buffy-cot



thermocycleur



Vortex



Buffer AE



Solution de lavage Buffer AW2



Solution de lavage Buffer AW1



Bain marie



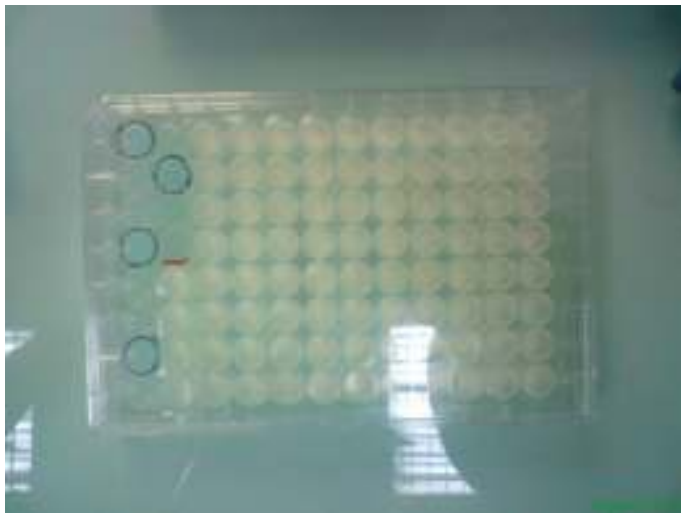
Master mixte



Qiaxel adveced system

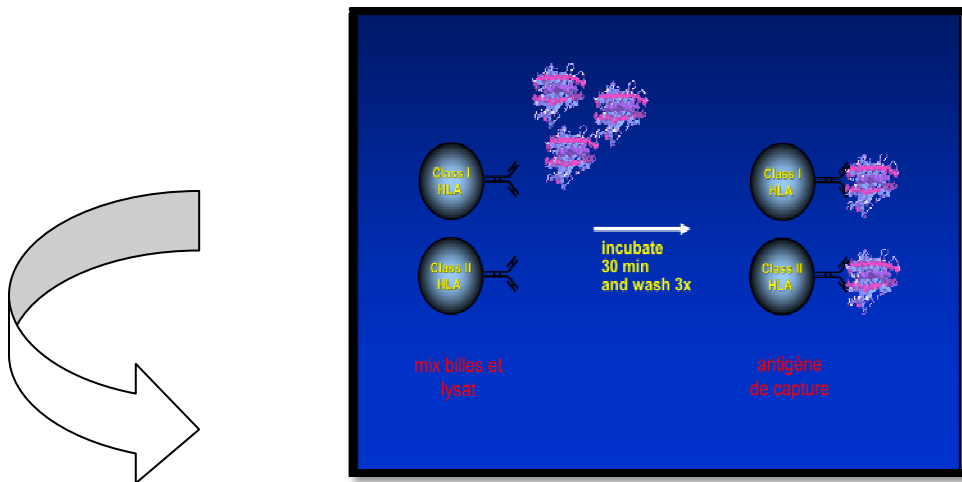


Luminex

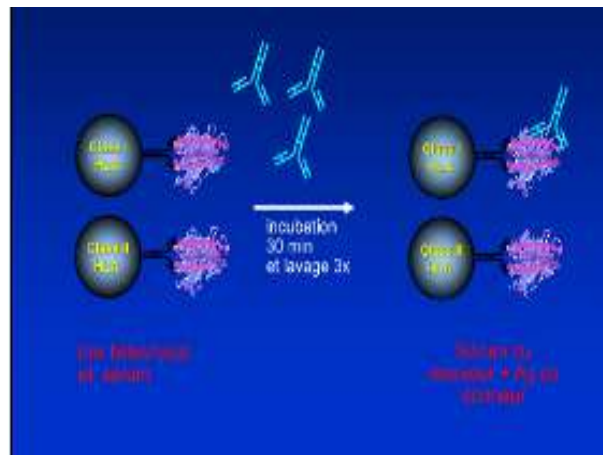
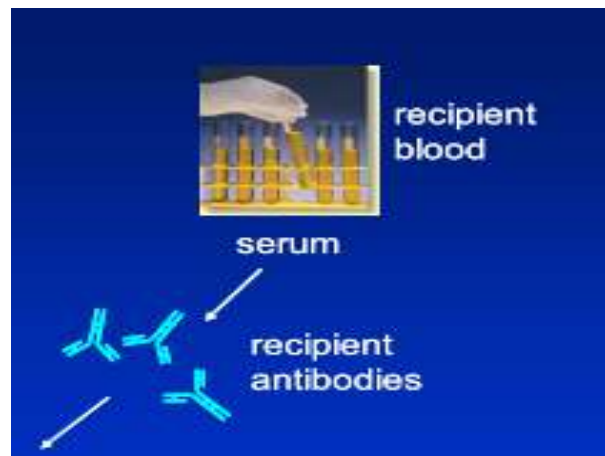


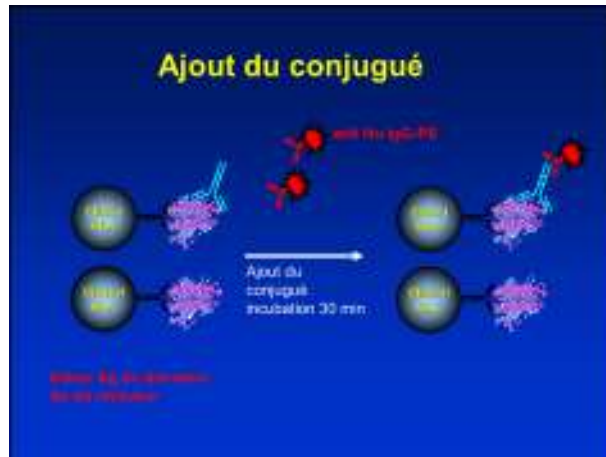
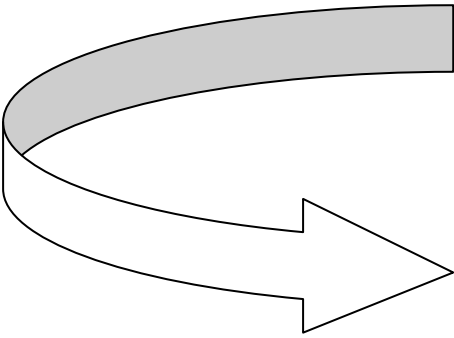
Exemple d'une plaque luminex

Principe luminex



Nous ajoutons le sérum du receveur aux lymphocytes du donneur





(Moalic V.)

Nous mettons le tous dans l'appareil luminex qui est couplé à un logiciel d'acquisition permettant l'interprétation des résultats.



Interprétation de la réaction de la chaîne de la polymérisation

Dans des conditions très précises de PCR, les couples d'amorces hybridées ou presque totalement hybridées permettent l'amplification (résultat positif), tandis que les paires d'amorces non hybridées ne donnent pas d'amplification (résultat négatif). Après la PCR, les fragments d'ADN amplifiés sont lus par le logiciel **QIAxcel Advanced System**, qui est une technique automatisée d'électrophorèse sur gel d'agarose. L'interprétation des résultats de PCR-SSP se fait par un logiciel d'acquisition, la lecture et la validation du test se base sur la présence ou l'absence de produit(s) spécifique(s) de PCR. De nombreux facteurs peuvent affecter l'efficacité de la PCR (par exemple erreurs de pipetage, concentration d'ADN trop faible, mauvais indice de pureté de l'ADN, présence d'inhibiteurs, précision du thermocycleur). Une paire d'amorces de contrôle interne positif est intégrée dans chaque puits. Celle-ci correspond à des régions conservées du gène d'hormone de croissance humaine, présent dans tous les échantillons d'ADN humain. En présence d'un produit de PCR spécifique de l'allèle/des allèles HLA, le produit de la bande de contrôle interne positif peut être faible ou absent. Les amplicons générés par les paires d'amorces HLA spécifiques ont une taille plus petite que celle du contrôle interne positif, mais plus importante que les amorces non incorporées.

- RÉACTIFS

Les kits de typage Olerup SSP contiennent des amorces de séquence spécifique lyophilisées et optimisées pour l'amplification par PCR des allèles HLA et du gène d'hormone de croissance humaine, du Master Mix avec Taq polymérase ("Master Mix"), des films adhésifs. Les solutions d'amorces sont pré-aliquotées et lyophilisées dans des barrettes de tubes PCR de 0,2 aux parois minces. Chaque tube contient une solution d'amorces lyophilisées spécifiques de groupe d'allèles, ainsi qu'une paire d'amorces de contrôle interne positif correspondant aux séquences non alléliques, prêt à recevoir l'échantillon d'ADN, le Master Mix et l'H₂O.

Préparation des réactifs luminex

Préparation du lysat des lymphocytes du donneur

Après avoir déterminé le volume de lysat requis pour le test et le volume du culot de cellules nécessaires pour préparer ce lysat (Chaque puits nécessite 8µL de lysat qui est généré à partir de 0,7µL de culot), mettre dans un tube le volume de suspension cellulaire correspondant au volume requis de culot cellulaire pour centrifugation à 1000-1500 tr/mn pendant 5 à 10 mn puis élimination du surnageant.

Enfin la récupération du lysat des lymphocytes du donneur (le surnageant) dans un tube, se fait après l'ajout du volume requis du tampon de lyse dilué (LMLLB).

- ❖ Tampon dilué : 10µL de tampon de lyse concentré (LMLLB) + 90 de reagent grader water (HANKS).

Puis mélanger, vortexer, et centrifuger à 1200 ref pendant 3-5 mn.

Préparation du lysat des lymphocytes contrôle (LMDLC)

La récupération du lysat des lymphocytes contrôle (le surnageant) dans un tube se fait après l'ajout de 500 µl de tampon de lyse dilué aux pastilles de lymphocytes contrôle réhydraté, vortexer, et centrifuger à 1200 ref pendant 3-5mn.

Sur la plaque on repère les puits correspondants aux lysats (LMDLC) et le lysat du donneur.

Préparation des billes de captures (LMDB) en les centrifugeant à 600-800 ref pendant 30 sec puis vortexer pendant 1 min.

Mise en contact des billes de captures et du lysat : en les mélangeant avec lysat donneurs dans un tube et dans un autre pour le lysat contrôle tout en respectant les volumes requis de chacun : 8 µl de lysat + 5 µl de billes par puits, puis incuber à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min en vortexant toutes les 5-10 min.

Préparation du volume requis de réactif de contrôle des lysats (LMLCR) : 5µl LMLCR concentré + 45µl de diluant échantillon pour un puits, tout en prévoyant un volume supplémentaire pour chaque 8 puits.

Préparation des puits de la plaque : couvrir à l'aide d'un adhésif en plastique les puits qui ne seront pas utilisés, puis mettre 100-300 µl d'eau distillée dans chaque puits prévu et aspirer l'eau après 2-5 min sans toucher la membrane.

Après les 30 min d'incubation, ajouter le volume adéquat du tampon de lavage : 42 µl de tampon de lavage par puits et vortexer 30 sec puis transférer 55 µl de chaque suspension (billes/lysats) aux puits correspondants, ajouter 100 µl de tampon de lavage dans chaque puits, taper légèrement les parois de la plaque pour mélanger puis aspirer, rajouter 250 µl de tampon de lavage dans chaque puits, puis aspirer (répéter l'opération 3 fois).

Déposé 50 µl du réactif de contrôle des lysats dilué (LMLCR dilué) dans les puits correspondant et 38 µl du diluant de l'échantillon dans les puits correspondants, puis 12 µl du sérum du receveur, tapoter légèrement.

Incuber la plaque à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min (sous agitation 200r/min).

Préparer le volume requis de Streptavidine couplé à la PE (SA-PE) : 5µl LMSA concentré + 45 µl de tampon de lavage pour un puits en prévoyant un volume supplémentaire pour chaque 8 puits, couvrir et laisser à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Préparer le volume requis du conjugué dilué (LMCJS) : LMCJS concentré + 45 µl de tampon de lavage pour un puits, en prévoyant un volume supplémentaire pour chaque 8 puits, couvrir et laisser à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Après les 30 min d'incubation : ajouter 100 µl de tampon de lavage à chaque puits, taper les parois de la plaque puis aspirer et rajouter 250 µl de tampon de lavage/ puits, mélanger et aspirer (répéter cette opération 3 fois).

Déposé 50 µl de SA-PE dilué aux puits qui contiennent le réactif de contrôle de lysat (LMLCR) et 50 µl du conjugué dilué aux puits contenant le sérum et les sérums contrôles.

Couvrir et incuber à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min et sous agitation.

Après l'incubation, enlever l'adhésif puis ajouter 150 µl de tampon de lavage/puits, mélanger.

Lire la plaque dans luminex

Résultats et critère de validité

- 3 billes de contrôle négatif dont la moyenne des MFI correspond à la fluorescence de bruit de fond. Teste non valide si > 500.
- 1 bille de contrôle positif qui permet de vérifier que la fixation du conjugué (anti-IgG-SA-PE) a bien marché. Test valide si MFI > 10000.

- LCR : billes recouvertes d'Ac anti classe I et II biotynilés. Permet de vérifier que la fixation des Ag HLA du donneur est correctement effectuée sur les billes, avec un conjugué différent (SA-PE). Test valide si MFI > 8000.
- Pour vérifier la technique, il existe dans le kit un sérum de contrôle positif et un négatif qui seront testés vis-à-vis des lymphocytes de contrôle qui auront été réhydratés. La MFI du puits du sérum contrôle positif testé vis-à-vis des lymphocytes contrôle réhydraté doit être supérieur à 10000.
- L'intensité moyenne de fluorescence de chaque bille est comparée à 3 valeurs de cut-offs (BAF pour Background Adjustment Factors). Ces 3 cut-offs sont calculés à partir de la fluorescence du bruit de fond des 3 billes consensus (CON), dont les valeurs sont lots dépendantes :

-Adjust MFI 1 = MFI bille capture –BAF CON 1

-Adjust MFI 2 = MFI bille capture –BAF CON 2

-Adjust MFI 3 = MFI bille capture –BAF CON 3

- ❖ Un échantillon est positif si au moins deux adjMFI sont positives.
- ❖ Un échantillon est négatif si au moins deux adjMFI sont négatives.
- ❖ Le cut-off est à 300.

Cross match LCT

Préparation des réactifs :

1-Hanks normal :

le mode d'emploi se trouve dans le kit

2-Hanks hypertonique :

Peser 2,55g de NaCL, le dissoudre dans 100ml Hanks normal.

3-Solution bleu Trypan mère :

1g de poudre à dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

4-solution bleu avant lecture :

3 volumes de bleu de Trypan + 1 volume de Hanks hyper.

5-le complément : le mode d'emploi se trouve dans le kit.

6-l'anti Kappa : dilution à 1/100 du polyclonal Rabbit anti Human K light chain (AGH).

GLOSSAIRE

Amylose : affection caractérisée par l'infiltration dans les tissus d'une matière appelée substance amyloïde.

Athérosclérose : maladie dégénérative de l'artère ayant pour origine la formation d'une plaque d'athérome (dépôt lipidique) sur sa paroi.

Hépatite : Inflammation du foie, aiguë ou chronique.

Hépatocarcinome : cancer du foie peut être primitif ou secondaire.

Glomérulonéphrite : une inflammation des glomérules du rein.

Lymphome : Prolifération maligne prenant naissance dans le tissu lymphoïde et, en particulier, dans les ganglions lymphatiques.

Néphrose : maladie atteignant les glomérules du rein et se traduisant par un syndrome néphrotique (chute du taux sanguin de protéines).

Ostéonécrose : mort d'un fragment de tissu osseux.

Syndrome hémolytique et urémique : affection associant une atteinte rénale aiguë, une anémie et une thrombopénie (diminution du nombre de plaquettes dans le sang).

Syndrome d'Alport : Syndrome associant une maladie rénale (néphropathie) héréditaire, une atteinte auditive et, parfois, des lésions oculaires.

Ulcère gastroduodéal : Destruction localisée de la muqueuse de l'estomac et du duodénum.

GLOSSAIR
