

لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة سعد دحلب البليدة (1)  
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Génétique

### Thème

**Apport du Typage HLA des locus DQ en transplantation rénale**

*Présenté par :*

**BOUCHENAFKA Kaouther**

**KALLA Asma**

*Soutenu le :*

**02/07/2023**

**Devant le jury :**

**Noms**

**Grade/Lieu**

**Qualité**

**Mr MOHAMED SAID.R**

**MAA/ USDB1**

**Président**

**Mme AMOKRANE.A**

**MCA/USDB1**

**Examinatrice**

**Mme BERKANI. L**

**MAA/CHU Beni Messous**

**Promotrice**

**Mme AISSANI-EL FERTAS. R**

**MCB/USDB1**

**Co-Promotrice**

**Année universitaire : 2022/2023**

# *Remerciements*

D'abord et avant tout, nous remercions le bon Dieu, le tôt puissant pour la force et la patience qui nous a donné durant tout notre parcours.

Nous adressons nos vifs remerciements à notre promotrice Docteur **BERKANI Lylia**, responsable de l'unité d'histocompatibilité et d'immunogénétique du service d'immunologie médicales de CHU ISSAD HASSANI pour la qualité de son encadrement exceptionnel, son aide précieuse, ses conseils avisés, sa supervision éclairée tout au long de la réalisation de ce PFE. Ce travail ne pourrait jamais être aussi enrichissant sans l'apport de sa touche professionnelle.

Nous voudrions également exprimer notre gratitude à Madame **AISSANI-EL FERTAS Radia** pour nous avoir encadré et pour le temps qu'elle a consacré à nous apporter les outils méthodologiques essentiels nécessaires à la réalisation de cette recherche, son suivi, ses conseils précieux. Son niveau d'exigence nous a grandement motivés.

On saisit cette occasion pour remercier les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer notre travail. Nous remercions Monsieur **MOHAMED SAID.R** d'avoir Accepté de présider le jury de notre Soutenance, ainsi Madame **AMOKRANE.A** d'avoir acceptée d'examiner notre travail, nous comptons sur vos remarques sans doute enrichissantes.

Nous exprimons notre gratitude envers tous les membres du personnel du service d'immunologie médicale de Béni Messous, En particulier, nous souhaitons remercier Docteur **SEBHI Faiza**, pharmacienne assistante en Pharmacologie au sein du service d'immunologie médicale du CHU Beni Messous, pour sa contribution précieuse.

Un remerciement spécial pour tous les enseignant et aussi à nos chers parents et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Asma et Kaouther*

# *Dédicace*

*J*e souhaite dédier cet humble travail

À mes chers parents pour leur sacrifice et leur soutien à mes côtés pendant le cursus universitaire **K. Mourad** et **M. Lamai**

À mes chères sœurs et mon frère.

À tous ceux qui ont travaillé dur avec moi pour mener à bien cette étude, sans oublier mes professeurs qui ont participé à ma formation durant mes Cinq ans.

À tous ceux que j'aime.

Merci !

*Asma*

# *Dédicace*

*J*e souhaite dédier cet humble travail

À toutes les personnes qui ont apporté leur contribution, afin de rendre ce projet réalisable, je  
vous dis merci

*Kaouther*

## Résumé

La transplantation rénale est une avancée majeure en médecine et en chirurgie. Elle est le traitement privilégié pour l'insuffisance rénale terminale, rétablissant les fonctions du rein et assurant la qualité de vie. Cependant, la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur reste un défi crucial pour assurer la survie à long terme de la greffe. Le typage HLA du locus DQ joue un rôle essentiel dans la transplantation rénale pour plusieurs raisons.

Nous avons réalisé une étude rétrospective, sur 120 couples donneurs/receveurs recrutés principalement dans le cadre de la transplantation rénale à l'unité d'immunogénétique du service d'immunologie médicale du CHU Issaad Hassani (CHU Beni Messous) entre 2009 et jusqu'en 2022 dans le but d'étudier l'intérêt du typage HLA DQ en transplantation rénale. A cet effet, nous avons utilisé la technologie de génotypage PSR (SSP et SSO) suivie d'une extraction automatisée de l'ADN du sang total des receveurs et des donneurs.

Nos résultats montrent que la transplantation a été réalisée aussi bien chez des hommes que chez des femmes avec un sex-ratio de 1,87. L'âge de nos patients variait de 3 à 67 ans, avec une moyenne d'âge de  $35,27 \pm 12,52$  ans et  $35,26 \pm 12,51$  ans. Selon le typage de nos patients, 35% des couples présentaient un (1/4) ou deux (2/4) mésappariements HLA-DQ c'est le plus répondu dans notre étude. Comme l'ont montré la recherche d'anticorps anti-HLA spécifique du donneur 'DSA' par les techniques sérologiques dans le sérum du receveur a montré que 45,45 % ont développé des DSA de novo (dnDSA), dont 81 % étaient de spécificité HLA DQ. Les patients qui ont développé des dnDSA DQ présentaient un risque important de rejet humoral ( $P < 0,0001$ ). De plus, une association significative a été observée en analysant les mésappariements HLA DQ et le développement de dnDSA DQ ( $P < 0,0001$ ). Cependant, les mésappariements HLA DQ n'étaient pas associés à un risque plus élevé de développement d'un rejet humoral.

Cette étude montre l'importance d'établir le HLA DQ (au moins HLA DQB) matching entre le donneur et le receveur avant la transplantation rénale afin de définir le risque immunologique qui conditionne le développement des dnDSA associés à un risque élevé de rejet humoral et une perte du greffon au long cours.

Les mots clés : transplantation rénale, PSR-SSP, HLA DQ, Typage HLA, DSA, mésappariements HLA DQ

## Abstract

Kidney transplantation is a major advance in medicine and surgery. It is the preferred treatment for end-stage renal failure, restoring kidney function and improving quality of life. However, immunological compatibility between donor and recipient remains a crucial challenge to ensure long-term graft survival. HLA typing of the DQ locus plays an essential role in kidney transplantation for several reasons.

We carried out a retrospective study on 120 donor/recipient couples recruited mainly in the context of kidney transplantation within the immunogenetics unit of the medical immunology department of the Issaad Hassani University Hospital (Beni Messous University Hospital) between 2009 and to 2022 with the aim of studying the benefit of HLA DQ typing in kidney transplantation. For this purpose, we used PSR genotyping technology (SSP and SSO) followed by automated DNA extraction from recipient and donor whole blood

Our results show that transplantation was carried out in both men and women with a sex ratio of 1.87. The ages of our patients ranged from 3 to 67 years, with a mean age of  $35.27 \pm 12.52$  years and  $35.26 \pm 12.51$  years. According to the typing of our patients, 35% of couples presented one (1/4) or two (2/4) HLA-DQ mismatches, this is the most common in our study. As shown by the search for anti-HLA antibodies specific to the donor "DSA " by serology techniques in the recipient's serum showed that 45.45% developed de novo DSA (dnDSA), of which 81% were of HLA DQ specificity. Patients who developed DQ dnDSAs had a significant risk of humoral rejection ( $P < 0.0001$ ). Additionally, a significant association was observed when analyzing HLA DQ mismatches and the development of dnDSA DQ ( $P < 0.0001$ ). However, HLA DQ mismatches were not associated with a higher risk of developing humoral rejection.

This study shows the importance of establishing the HLA DQ (at least HLA DQB) matching between the donor and the recipient before kidney transplantation in order to define the immunological risk which conditions the development of dnDSA associated with a high risk of humoral rejection and long-term graft loss.

Key words: kidney transplantation, PSR-SSP, HLA DQ, HLA typing, DSA, HLA DQ mismatches

## المخلص

يعتبر زرع الكلى تقدماً كبيراً في الطب والجراحة. وهو العلاج المفضل للفشل الكلوي في المرحلة النهائية، واستعادة وظائف الكلى وتحسين نوعية الحياة. ومع ذلك، يظل التوافق المناعي بين المتبرع والمتلقي يمثل تحدياً حاسماً لضمان بقاء الكسب غير المشروع على المدى الطويل. تلعب كتابة HLA لموضع DQ دوراً أساسياً في زراعة الكلى لعدة أسباب.

أجرينا دراسة بأثر رجعي على 120 من الأزواج المتبرعين/المتلقين الذين تم توظيفهم بشكل رئيسي في سياق زرع الكلى داخل وحدة الوراثة المناعية بقسم المناعة الطبية بالمستشفى الجامعي إسعد حساني (المستشفى الجامعي بني مسوس) بين عامي 2009 و2022 بهدف: دراسة فائدة كتابة HLA DQ في زراعة الكلى. ولهذا الغرض، استخدمنا تقنية التتميط الجيني PSR (SSP وSSO) متبوعة باستخراج الآلي للحمض النووي من الدم الكامل للمتلقي والمتبرع.

تظهر نتائجنا أنه تم إجراء عملية زرع الأعضاء في كل من الرجال والنساء بنسبة جنس تبلغ 1,87. تراوحت أعمار مرضانا من 3 إلى 67 عاماً، بمتوسط عمر  $35,27 \pm 12,52$  عاماً و  $35,26 \pm 12,51$  عاماً. وفقاً لنوع مرضانا، أظهر 35 % من الأزواج عدم تطابق واحد (4/1) أو اثنين (4/2) من HLA-DQ، وهذا هو الأكثر شيوعاً في دراستنا. كما أظهر البحث عن الأجسام المضادة لـ HLA الخاصة بالمتبرع "DSA" بواسطة التقنيات المصلية في مصل المتلقي أن 45,45 % طوروا DSA جديد (dnDSA)، منهم 81% كانوا من نوعية HLA DQ. كان لدى المرضى الذين طوروا dnDSAs DQ خطر كبير للرفض الخلطي ( $P < 0,0001$ ). بالإضافة إلى ذلك، لوحظ وجود ارتباط كبير عند تحليل عدم تطابق HLA DQ وتطور dnDSA DQ ( $P < 0,0001$ ). ومع ذلك، لم ترتبط حالات عدم تطابق HLA DQ بزيادة خطر الإصابة بالرفض الخلطي.

توضح هذه الدراسة أهمية إنشاء مطابقة HLA DQ (على الأقل HLA DQB) بين المتبرع والمتلقي قبل زراعة الكلى من أجل تحديد المخاطر المناعية التي تحدد تطور dnDSA المرتبط بارتفاع خطر الرفض الخلطي والإصابة طويلة الأمد بفقدان الكسب غير المشروع.

الكلمات المفتاحية: زرع الكلى، PSR-SSP، HLA DQ، كتابة HLA، DSA، عدم تطابق HLA DQ

## Liste des abréviations

**AC** : Anticorps

**AG** : Antigène

**CHU** : Centre Hospitalo Universitaire

**CMH** : Complexe Majeur Histocompatibilité

**CPA** : Cellule Présentatrice Antigène

**dnDSA** : de novo Donor Specific Antibodies

**DSA** : Donor-Specific Antibodies

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

**HLA** : Human Leukocyte Antigen

**IRCT** : Insuffisance Rénale Chronique Terminale

**LCT** : Microlymphocytotoxicité

**MM** : Mésappariement

**NGS** : Next Generation Sequencing

**NK** : Natural Killer

**NL** : Néphropathie lupique

**PCR-SSO** : Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucléotide

**PCR-SSP** : Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer

**PKR** : Polykystique rénale

**PR** : Purpura Rhumatoïde

**QSP** : Quantité Suffisante Pour

**RM** : Rein multikystique

**TBE** : Tris et Borate et EDTA

**TCR:** T-Cell Receptor

**TGF:** Taux de Filtration Glomérulaire

**TR :** Transplantation Rénale

**UM :** Uropathie malformation

# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Structures schématiques des molécules (HLA) de classe I et de classe II indiquant les zones polymorphes de variabilité et la localisation du peptide présenté.....	2
<b>Figure 2 :</b> Gènes et protéines HLA. Localisation et organisation chromosomique description des gènes et des protéines. Un court exon supplémentaire existe pour certains loci.....	4
<b>Figure 3 :</b> La nomenclature de système HLA.....	6
<b>Figure 4 :</b> Exemple de résultat de typage HLA DQ sur le logiciel SCORE®.....	18
<b>Figure 5 :</b> Répartition des donneurs selon le sexe. ....	20
<b>Figure 6 :</b> Répartition des receveurs selon le sexe.....	20
<b>Figure 7 :</b> Répartition des donneurs et des receveurs selon les tranches d'âge.....	21
<b>Figure 8:</b> Répartition des donneurs selon leur lien de parenté avec le receveur.....	21
<b>Figure 9 :</b> Étiologie de l'insuffisance rénale. ....	22
<b>Figure 10 :</b> Distribution de la population selon le délai de la transplantation rénale. ....	22
<b>Figure 11 :</b> Compatibilité ABO entre les donneurs et les receveur.....	23
<b>Figure 12 :</b> Evènements immunisants chez les receveurs.....	24
<b>Figure 13 :</b> Répartition des patients selon le développement d'anticorps anti HLA en pré-transplantation.....	24
<b>Figure 14 :</b> Répartition des patients selon la classe des anticorps anti HLA en pré-transplantation.....	25
<b>Figure 15 :</b> Répartition des patients selon le typage HLA-DQ.....	25
<b>Figure 16 :</b> Répartition des patients selon les mésappariement HLA-DQ entre les donneurs et les receveurs.....	26

<b>Figure 17</b> : Répartition des patients selon le développement des DSA de novo après transplantation.....	<b>27</b>
<b>Figure 18</b> : Répartition des DSA selon leur spécificité antigénique.....	<b>27</b>
<b>Figure 19</b> : Répartition selon la spécificité des DSA HLA DQ.....	<b>28</b>
<b>Figure 20</b> : Répartition des transplantés selon le devenir du greffon.....	<b>28</b>
<b>Figure 21</b> : Répartition des patients selon l'association des DSA HLA DQ et le rejet humoral.....	<b>29</b>
<b>Figure 22</b> : Répartition des patients selon l'association des mésappariements HLA DQ et développement de DSA HLA DQ. ....	<b>29</b>
<b>Figure 23</b> : Répartition des patients selon l'association des mésappariements HLA DQ et le développement du rejet humoral.....	<b>30</b>

## **Liste des tableaux**

**Tableau I** : Programme d'amplification de la PCR-SSP OLERUP SSP® CareDX®.....17

**Tableau II** : Evènements immunisants chez les receveurs.....23

## **Liste des annexes**

**Annexe N° 01** : Fiche de renseignements

**Annexe N° 02** : Matériel non biologique au laboratoire

**Annexe N° 03** : Protocole opératoire d'électrophorèse sous forme diagramme

**Annexe N° 04** : Protocole opératoire utilisée de la PCR-SSO Luminex®

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Généralité</b>	
I. Système HLA.....	<b>2</b>
I.1 Structure et caractéristiques biochimiques des molécules HLA.....	<b>2</b>
I.1.1. Molécules de classe I.....	<b>2</b>
I.1.2. Molécule de classe II.....	<b>3</b>
I.2. Génétique du HLA.....	<b>3</b>
I.2.1. Organisation du cluster des gènes codant les molécules HLA.....	<b>3</b>
I.2.2. Caractéristique génétique majeure du système HLA.....	<b>4</b>
Transmission haplotypique des allèles HLA.....	<b>4</b>
Polymorphisme.....	<b>5</b>
Codominance.....	<b>5</b>
I.2.5. Nomenclature HLA.....	<b>5</b>
I.3. Fonction des molécules HLA.....	<b>6</b>
II. Typage HLA.....	<b>7</b>
II.1. Méthodes sérologiques.....	<b>7</b>
II.2. Méthodes de biologie moléculaire.....	<b>7</b>
III. Insuffisance rénale et transplantation.....	<b>7</b>
III.1. Traitement de l'insuffisance rénale par transplantation.....	<b>8</b>
III.2. Prérequis immunologiques pour la transplantation rénale.....	<b>8</b>
III.2.1. Compatibilité HLA.....	<b>9</b>
III.2.2. Anticorps anti-HLA.....	<b>9</b>
III.3. Rejet rénale.....	<b>9</b>
III.3.1. Mécanisme de rejet.....	<b>10</b>
III. 3. 1. 1. Reconnaissance allogénique.....	<b>10</b>
III. 3. 1. 2. Activation des lymphocytes T CD4+ .....	<b>10</b>
III. 3. 1. 3. La réaction médiée par les lymphocytes T CD8+.....	<b>11</b>
III. 3. 1. 5. Hypersensibilité retardée (DTH : delayed type hypersensitivity) .....	<b>11</b>
III. 3. 1. 6. Réaction médiée par des lymphocytes B.....	<b>11</b>

III. 3. 1. 7. Cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC) .....	11
--	----

## **Matériel et Méthodes**

Contexte de l'étude .....	13
I. Matériel.....	14
I.1. Matériel biologique.....	14
I.2. Matériel non biologique.....	14
II. Méthodes.....	14
II.1. Typage génétique HLA DQ.....	14
II.1.1. Extraction automatique d'ADN.....	14
II.1.2. Quantification de la concentration de l'ADN et mesure du degré de pureté.....	15
II.1.3. Typage HLA Locus HLA DQB par PCR-SSP.....	15
II.1.4. Révélation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose.....	17
II.1.5. Typage HLA du Locus HLA DQA et DQB par PCR-SSO .....	18
III. Etude statistique.....	19

## **Résultats**

I. Résultats de l'étude des caractéristiques démographiques et biologiques de la population..	20
I. 1. Répartition des donneurs selon le sexe.....	20
I.2. Répartition des receveurs selon le sexe.....	20
I.3. Répartition des receveurs et des donneurs selon l'âge.....	21
I.4. Lien de parenté.....	21
I.5. Etiologie de l'insuffisance rénale.....	22
I.6. Délai de la transplantation rénale.....	22
I.7. Groupage sanguin ABO.....	23
I.8. Antécédents d'immunisation.....	23
I.9. Anticorps anti HLA avant transplantation.....	24
II. Résultats du typage moléculaire du locus HLA-DQ.....	25
II.1. Compatibilité HLA-DQ entre le donneur et le receveur.....	25
III. Etude du suivi immunologique en post-transplantation.....	26

III. 1. Anticorps anti HLA spécifiques du donneur (DSA) .....	26
III. 2. Rejet humoral.....	28
III. 3. Etude de l'association entre les DSA HLA DQ et rejet humoral.....	28
III. 4. Etude de l'association des mésappariements HLA DQ et le développement de DSA	29
III. 5. Etude de l'association entre les mésappariements HLA DQ et le rejet humoral.....	30
<b>Discussion.....</b>	<b>31</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>35</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

# **Introduction**

La transplantation rénale est un traitement de choix pour les patients atteints d'insuffisance rénale terminale. Cependant, la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur reste un défi majeur pour assurer la survie à long terme du greffon. Le système HLA (Human Leukocyte Antigen), qui est responsable de la reconnaissance et de la présentation des antigènes aux cellules immunitaires, joue un rôle crucial dans cette compatibilité. Le locus HLA-DQ est une région génétique clé du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) située sur le bras court du chromosome 6. Il est composé de deux gènes, *DQA1* et *DQB1* qui codent, respectivement, pour les sous-unités alpha et bêta de la molécule HLA-DQ. Ces molécules HLA-DQ sont exprimées principalement sur les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B.

L'apport du typage HLA du locus DQ en transplantation rénale revêt une grande importance pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les molécules HLA-DQ jouent un rôle crucial dans la reconnaissance des antigènes et dans l'activation des lymphocytes T, qui sont les acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative. Ainsi, une incompatibilité au niveau du locus DQ peut entraîner une réponse immunitaire contre le greffon, conduisant à un rejet aigu ou chronique. De plus, des études ont démontré que certaines combinaisons alléliques spécifiques au locus DQ sont associées à un risque accru de rejet et à une diminution de la survie du greffon chez les patients transplantés rénaux. Par conséquent, le typage HLA du locus DQ permet d'identifier ces incompatibilités potentielles et d'adapter les stratégies d'immunosuppression pour minimiser les risques de rejet. En outre, le typage HLA du locus DQ peut également être utilisé dans le processus de sélection des donneurs. En évaluant la compatibilité HLA-DQ entre le donneur et le receveur, il est possible d'identifier les paires de donneurs et de receveurs qui présentent une meilleure compatibilité, ce qui peut améliorer les résultats à long terme de la transplantation rénale.

Dans le cadre de réalisation d'un projet de fin d'études option en Génétique, nous avons réalisé un projet de fin d'études portant sur l'apport du typage HLA du locus HLA-DQ en transplantation rénale. Les objectifs de ce travail sont :

- Evaluer l'intérêt du typage HLA DQ en transplantation rénale
- Analyser l'association des mésappariements HLA DQ entre donneur et receveur avec le développement des anticorps anti HLA DQ spécifiques du donneur (DSA) et le rejet humoral en post transplantation.
- Evaluer la fréquence des DSA HLA DQ ainsi que leur association au développement du rejet humoral en post transplantation.

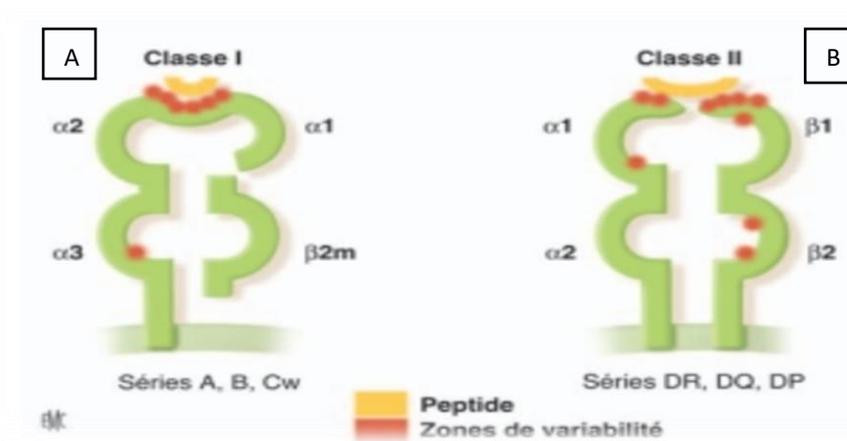
# **Généralités**

## I. Système HLA

Depuis sa découverte, le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme, ou Human Leukocyte Antigen (HLA), représente l'un des domaines les plus explorés de la recherche scientifique et médicale. La région HLA, située sur le chromosome 6, a totalement été séquencée en 1999 (Beck et al., 1999). Plus de 200 gènes ont été identifiés, dont les principaux sont les gènes d'histocompatibilité HLA de classe I (A, B, C essentiellement) et de classe II (DR, DP, DQ)(Brick et al., 2016), contenant chacune de nombreux gènes avec ou sans fonction immunologique. Ces molécules jouent un rôle crucial dans l'acceptation du greffon par son receveur (Delbos et al., 2018).

### I.1. Structure et caractéristiques biochimiques des molécules HLA

Les molécules exprimées à la surface cellulaire sont regroupées en deux classes principales dites classe I et classe II (Cesbron Gautier et al., 2007)



**Figure 1.** Structures schématiques des molécules human leukocyte antigen (HLA) de classe I et de classe II indiquant les zones polymorphes de variabilité et la localisation du peptide présenté. (Cesbron Gautier et al., 2007)

#### I. 1. 1. Molécules de classe I

Les molécules du CMH de classe I dits classiques « A, B, C » sont des glycoprotéines de surface cellulaire exprimées sur presque tous les types de cellules nucléées de mammifères. Composée d'une chaîne lourde polymorphe de 44 à 49 kDa associée de manière non covalente à une chaîne légère soluble de 12 kDa (b2 microglobuline) (Dausset et al., 1993)

Les molécules HLA de classes I dites non classiques, HLA-E, F et G, ont une structure très proche des molécules HLA de classe I classiques. Elles sont également liées de façon non

covalente à la  $\beta$ 2-microglobuline (Delbos et al., 2018). Les différences structurales se situent au niveau des liaisons à l'antigène pour les molécules HLA-E et-G (Dausset et al., s. d.). Contrairement aux autres molécules HLA, la molécule HLA-F est exprimée à la surface cellulaire non associée à un peptide. (Cesbron Gautier et al., 2007) (**Figure 1. A**)

### I. 1. 2. Molécule de classe II

Les molécules HLA de classes II « DQ, DP, DR » sont des hétérodimères constitués d'une chaîne légère  $\alpha$  de 29 kDa et d'une chaîne lourde  $\beta$  de 34 kDa. (Cesbron Gautier et al., 2007) molécules HLA de classe II sont exprimées uniquement à la surface des cellules présentatrices d'antigène (Delbos et al., 2018). (**Figure 1. B**)

## I. 2. Génétique du HLA

### I. 2. 1. Organisation du cluster des gènes codant les molécules HLA

Le système HLA est localisé sur le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3) (**Figure 2**). Ce système immunogénétique, s'étend sur approximativement 3 700 kb, compte 224 gènes identifiés dont 128 seraient exprimés (Beck et al 1999). Le complexe CMH compte 3 régions géniques (Dausset et al, 1958)

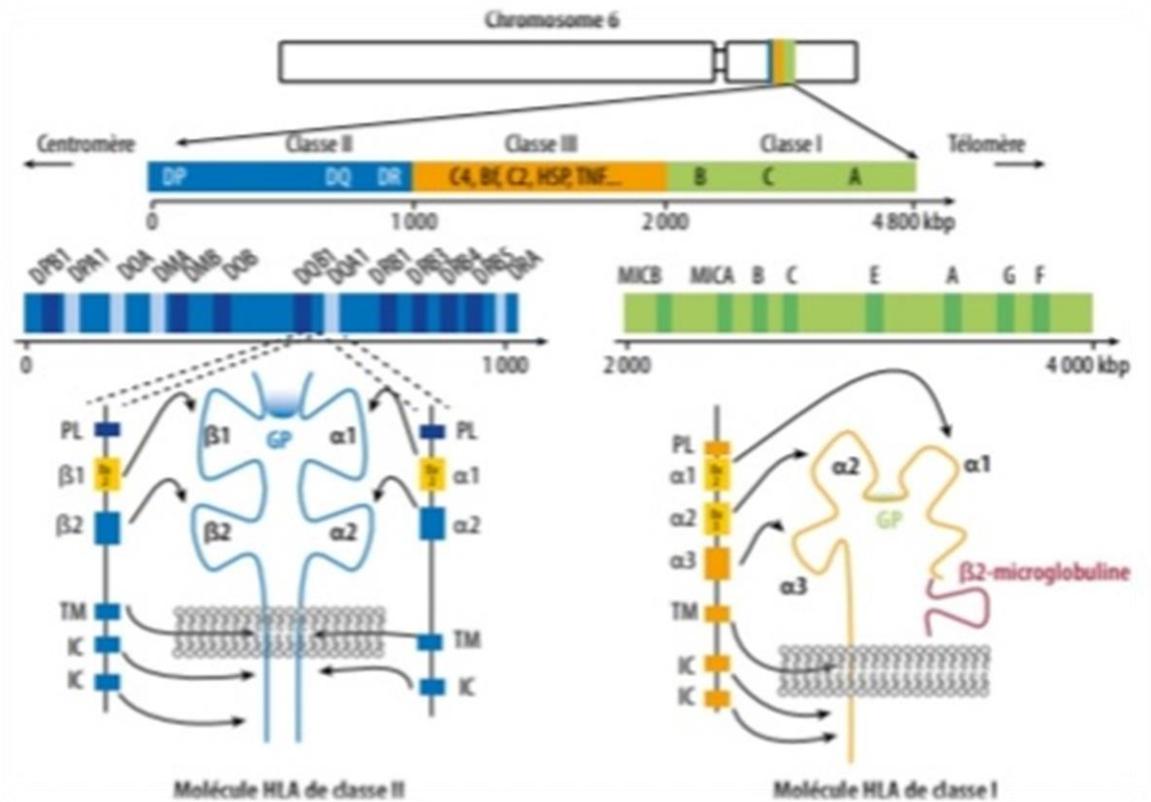
- La région de classe I, proche du télomère, est constituée de gènes HLA dits classiques (HLA-A, B et C) et non classiques (HLA-E, F, G) et s'étend sur 2000 kb.
- La région de classe III, qui s'étend sur 700 kb, contient des gènes impliqués dans la réponse immune dont certains codant pour des protéines du complément (C2, C4, facteur B).
- Enfin, proche du centromère, la région de classe II est constituée de gènes HLA dits classiques (HLA-DR, DQ et DP) et non classiques (HLA-DO et DM) sur 1000 kb

Les gènes HLA de classe I classiques, HLA-A, B et C, sont composés de 8 exons séparés par 7 introns. Ces gènes codent une chaîne lourde  $\alpha$  transmembranaire de 44 kDa associée de manière non covalente à la  $\beta$ 2-microglobuline (protéine de 12 kDa monomorphe, codée par un gène du chromosome 15)]. (Delbos et al., 2018) (**Figure 2**).

On distingue les molécules DR, DQ et DP constituées de deux chaînes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) codées par les gènes correspondants notés DRA et DRB, DQA et DQB, DPA et DPB. (Cesbron Gautier et al., 2007)

- ✓ Une chaîne lourde  $\alpha$  codée par un gène A (DRA1, DQA1 et DPA1)
- ✓ Une chaîne lourde  $\beta$  codée par un gène B (DRB1, DQB1 et DPB1). (Delbos et al., 2018)

De nombreux gènes de classe II ont été séquencés revue des séquences dans (Klein & Figueroa, 1986) chacun est divisé en 5 ou 6 exons, corrélant bien avec la structure de la molécule (Hood et al., 1983).



**Figure 2.** Gènes et protéines HLA. Localisation et organisation chromosomique description des gènes et des protéines. Un court exon supplémentaire existe pour certains loci (Delbos et al., 2018)

### I. 2. 2. Caractéristiques génétiques majeures du système HLA

Les gènes HLA présentent 3 caractéristiques génétiques fondamentales (Delbos et al., 2018)

➤ **Transmission haplotypique des allèles HLA**

L'ensemble des gènes HLA est transmis en bloc selon un mode mendélien. Chaque individu hérite donc d'un haplotype de chacun de ses parents. Il peut cependant exister des événements

de recombinaison entre 2 haplotypes (ou crossing over) durant la méiose, dans environ 1% des cas, principalement entre les loci HLA-B et DRB1, et les loci HLA-DQB1 et DPB1

### ➤ Polymorphisme

Le polymorphisme est situé principalement pour les gènes de classe I au niveau des exons 2 et 3 qui codent pour les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de la protéine HLA, et sur l'exon 2 pour les gènes de classe II qui codent pour le domaine  $\beta 1$ , c'est-à-dire pour les 2 classes au niveau du site de fixation du peptide et de la zone en contact avec le récepteur à l'antigène du lymphocyte T (T-Cell antigen Receptor [TCR]).

Les domaines  $\alpha$  des molécules HLA-DQ et HLA-DP sont également polymorphes, la chaîne  $\alpha$  de HLA-DR étant presque monomorphe. À l'échelle d'une population, l'extrême polymorphisme du système HLA constitue un avantage pour la défense vis-à-vis des agents pathogènes.

### ➤ Codominance

Chaque individu exprime, à la surface de ses cellules, les protéines codées par les gènes des 2 haplotypes parentaux transmis. Ainsi, les cellules expriment à leur surface 6 molécules HLA de classe I différentes, et le cas échéant, entre 10 et 12 molécules HLA de classe II différentes provenant pour moitié d'allèles maternels et paternels, sauf en cas d'homozygotie pour un ou plusieurs gènes.

## I. 2. 3. Nomenclature HLA

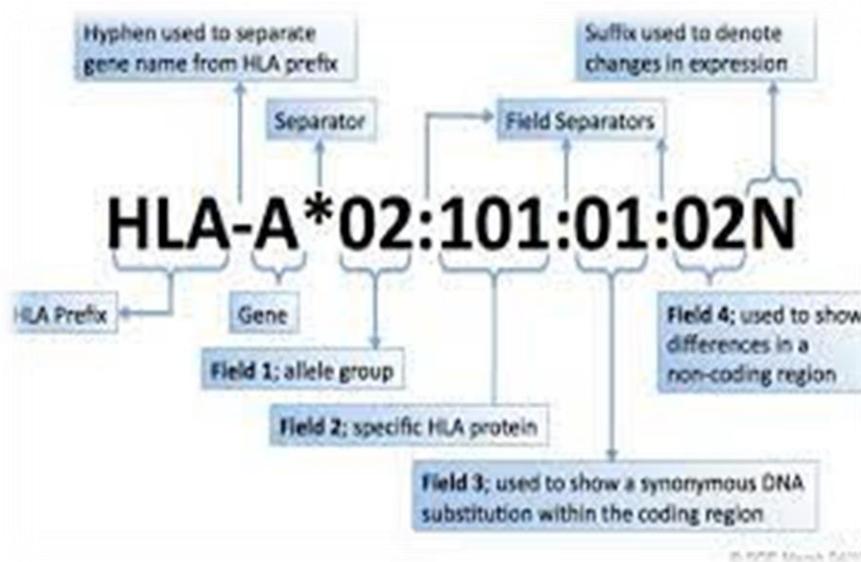
Elle est précédée par le préfixe (HLA-), suivi du nom du locus (A, B, C, DR, DQ ou DP). Concernant la nomenclature sérologique, les antigènes HLA sont désignés par le nom du locus suivi d'un chiffre désignant le groupe d'allèles reconnus par le même anticorps d'où le nom « sérologique » (par exemple HLA-A32) (Moalic et al., 2005)

Concernant la nomenclature de biologie moléculaire, le nom du gène étudié est suivi d'un astérisque (\*) puis d'un numéro unique correspondant à maximum de quatre ensembles de chiffres (champs) séparés par deux points « : » (Marsh., 2018)

Le premier champ représente un ensemble d'allèles, codant pour des antigènes sérologiques reconnus par les mêmes anticorps. Le deuxième champ représentant un ensemble d'allèles codant pour la même protéine. Le troisième champ permet de différencier les allèles présentant des mutations synonymes qui n'entraînent pas de modification au niveau de la protéine. Le

quatrième champ différencie les allèles avec mutations dans les introns ou dans les régions 5' ou 3' non traduits qui flaquent les exons et les introns.

Enfin, l'ajout d'un suffixe pour apporter une meilleure précision comme dans le cas d'expression moins forte (L pour « Low »), une expression douteuse (Q pour « Questionnable ») ou A pour « Aberrant ») ou une non-expression (N pour « Null »). Pour désigner un allèle spécifiant une protéine qui est exprimée sous la forme d'une molécule soluble, on utilise le suffixe (S pour « Secreted ») et (C pour « Cytoplasm ») quand il s'agit d'une protéine cytoplasmique (**Figure 3**)



**Figure 3.** la nomenclature de système HLA (*HLA Nomenclature @ hla.alleles.org.*)

### I.3. Fonction des molécules HLA

La fonction principale des 2 classes de molécules HLA est la présentation des antigènes peptidiques aux acteurs du système immunitaire adaptatif que sont les lymphocytes (Delbos et al., 2018)

Généralement, les Ag endogènes (peptides à une longueur d'environ 8-10 AA) sont chargés les CMH- I (Bevan, 1976) et seuls les TCR des lymphocytes T CD8+ sont en mesure de reconnaître les peptides présentés dans un environnement de molécules HLA de classe I (Cesbron Gautier et al., 2007)

Les Ag exogènes sont chargés sur les molécules du CMH-II (Bevan, 1976) et Seuls les TCR des lymphocytes T CD4+ sont en mesure de les reconnaître (Fleckenstein et al., 1999)

## **II. Typage HLA**

Le typage HLA trouve sa principale application dans la transplantation d'organe. on a recours au typage HLA afin de mesurer le degré de compatibilité entre le receveur de la greffe et le donneur et d'adapter l'immunosuppression (Semana et al., 2002).

En prenant en considération le risque du rejet contre le greffon et surtout le risque de la réaction du greffon contre l'hôte, une compatibilité stricte au niveau de la protéine HLA pour les loci A, B, C, DR, DQ est indispensable (Semana & Quelvennec, 2002)

Plusieurs techniques de laboratoire ont été développés afin de déterminer le typage HLA d'un individu, en utilisant des méthodes sérologiques ou de biologie moléculaire ( Corinne Miceli et al .,2007)

### **II.1. Méthodes sérologiques**

Les méthodes sérologiques appliquées à l'étude du HLA reposent sur l'aptitude des anticorps à reconnaître des déterminants allo-typiques sur ces molécules, le plus souvent à la membrane cellulaire. (Dausset et al., 1993). On distingue la Microlymphocytotoxicité (LCT)

### **II.2. Méthodes moléculaires**

La biologie moléculaire a permis d'approfondir et d'améliorer la précision des typages HLA grâce à une meilleure discrimination entre et à l'intérieur des groupes antigéniques (on parle de résolution). Parmi les techniques de biologie moléculaire utilisées pour le typage HLA nous retrouvons : PCR-SSO (sequence specific oligonucléotide), PCR-SSP (sequence specific primer), PCR-SRT (sequence based typing), RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction) et NGS.

## **III. Insuffisance rénale et transplantation**

La prévalence des maladies rénales est en augmentation constante dans le monde, principalement du fait du vieillissement de la population. La classification des néphropathies repose généralement sur les données histologiques de la biopsie rénale (Johanna Rabiller et al ., 2019)

L'insuffisance rénale traduit une diminution de la fonction rénale caractérisée par une diminution du taux de filtration glomérulaire (TFG), qui ne filtre plus correctement le sang. Elle peut être aigue en étant le plus souvent réversible, soit chronique. Elle correspond à des lésions anatomiques irréversibles du parenchyme rénal.(Boubchir et al .,2004).

La prévalence de l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) étant de l'ordre de 1 pour 1000 malades. Les personnes atteintes d'insuffisance rénale chronique sont traitées par l'hémodialyse en attendant une transplantation rénale (Tortora et al ., 1994)

### **III. 1. Traitement de l'insuffisance rénale par transplantation**

La transplantation rénale est l'acte chirurgical qui consiste à prélever un rein fonctionnel d'un donneur vivant ou mort et l'implanter chez un receveur possédant des reins défectueux, tout en rétablissant la continuité vasculaire. Cette dernière s'installe au monde comme étant le traitement de choix et définitif pour l'insuffisance rénale

La greffe rénale peut être Xéno greffe, Allogreffe ou Greffe synergique selon la relation entre le donneur et le receveur ( Dausset et al .,1958)

La recherche de l'étiologie de l'insuffisance rénal est une étape vitale afin d'instituer précocement un traitement efficace et ralentir la progression de la maladie. Les causes principales actuelles de l'insuffisance rénale sont le diabète et l'hypertension. Les autres néphropathies peuvent impliquer différents mécanismes, inflammatoire, dégénératif ou génétique.

### **III. 2. Prérequis immunologiques pour la transplantation rénale**

Dans le but de minimiser les risques de rejet, le receveur ainsi que le donneur subissent une série de tests immunologiques indispensables et dont la chronologie doit absolument être respectée au risque d'induire un rejet. Ces tests sont : Groupage sanguins ; la recherche des anticorps anti-HLA chez le receveur, le typage HLA chez receveur et donneur.

Le bilan de pré- transplantation permet de s'assurer que la transplantation est techniquement possible et que les chances de survie du patient et sa qualité de vie ne sont pas compromises par la transplantation. Il permet aussi d'adapter le traitement anti-rejet convenable à chaque situation.(Anglicheau et al., 2006)

### **III. 2. 1. Compatibilité HLA**

Le typage HLA est un test essentiel à réaliser chez le receveur et le donneur dans le cadre du bilan de pré-transplantation. En effet, le degré de compatibilité conditionne la durée de vie du greffon puisque plus il est élevé, meilleure sera la survie du greffon.

Le typage concerne les loci HLA-A, HLA-B et HLA-DR et peut être réalisé soit par la technique sérologique. La situation idéale à laquelle on pourrait être confronté serait celle d'un couple donneur/receveur HLA identiques, mais celle-ci se présentant rarement, les mésappariements ou mismatches (différence d'allèle au niveau d'un ou de plusieurs loci) sont tolérés tant les antigènes HLA en cause du mésappariement ne sont pas considérés comme des antigènes interdits.

Le typage HLA en amont de la transplantation a un double intérêt. Premièrement, le typage HLA du receveur et des donneurs candidats permet de sélectionner le donneur optimal avec le moins de mismatches (MM). Deuxièmement, la connaissance du typage HLA du donneur permet de détecter les DSA parmi les anticorps anti HLA ce qui évitera un rejet hyperaigu ou accéléré. (Mellal et al,2017.).

### **III. 2. 2. Anticorps anti-HLA**

Les anticorps anti-HLA sont classiquement des allo-anticorps d'immunisation développés fréquemment dans les trois situations suivantes : Les transfusions sanguines, les grossesses et les transplantations d'organes (Loupy.,2014)

### **III. 3. Rejet rénale**

Le rejet de la greffe rénale est un phénomène entièrement naturel dû à l'introduction, chez un receveur, d'un greffon génétiquement différent qui sera inévitablement refusé par l'immunité de ce dernier. Les mécanismes de l'immunité innée et adaptative (humorale et cellulaire) sont tous les deux impliqués dans ce phénomène, et cette attaque immunitaire induit des lésions au sein des tissus du greffon qui vont produire une altération à court et/ou à moyen terme de la fonction rénale pouvant aller jusqu'à la mort de l'organe (Brick et al., 2011). On classe les différents rejets de greffe rénale en trois types principaux : Le rejet hyper-aigu humoral, aigu et chronique.

### III. 3. 1. Mécanisme de rejet

Durant les premières semaines ou premiers mois après l'opération, le greffon peut subir un rejet. L'immunité cellulaire met en scène certains lymphocytes T, des cellules « tueuses » qui s'infiltrent dans le greffon et finissent par le détruire.

#### III. 3. 1. 1. Reconnaissance allogénique

La réaction immunologique de rejet est liée à la reconnaissance d'Ag étrangers par le receveur. Trois voies de reconnaissance sont actuellement connues (Jiang et al., 2004)

- Dans la présentation directe, les cellules dendritiques activées du donneur migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur et présentent les allo-antigènes du donneur aux lymphocytes T du receveur. Ces antigènes sont reconnus sous forme de molécules membranaires intactes, non manipulées par les cellules présentatrices. Cette voie d'allo reconnaissance directe serait un puissant stimulus pour l'induction de réponses d'hypersensibilité retardée et cytotoxique, surtout dans la phase précoce qui suit la transplantation.
- Présentation indirecte : Progressivement, les cellules dendritiques du receveur colonisent le greffon et remplacent celles du donneur. Elles captent localement les allo antigènes du donneur et les appréhendent. Elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les peptides issus du donneur, *via* les molécules HLA de classe II du receveur. Elle peut être responsable de rejets aigus mais elle est surtout impliquée dans le rejet chronique (réaction allogénique persistante à bas bruit). (Jiang et al., 2004)
- Une troisième voie de présentation, dite semi-directe, découverte plus tardivement, stipule que les cellules dendritiques du receveur sont capables de capturer et de présenter sous forme non manipulée les molécules du CMH du donneur, à partir des cellules endothéliales du greffon. (Herrera et al., 2004)

#### III. 3. 1. 2. Activation des lymphocytes T CD4+

L'activation de ces lymphocytes conduit à leur prolifération clonale et à la synthèse de cytokines qui agissent directement ou indirectement sur les cellules effectrices (lymphocytes B, lymphocytes T CD8+, macrophages, cellules NK...) intervenant dans la destruction du tissu cible.

Les cellules activées migrent par voie sanguine des ganglions vers le greffon, traversent la barrière endothéliale et infiltrent le greffon. Les interactions entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire se font grâce aux chimiokines et aux molécules d'adhésion cellulaire, les « cell-adhesion molécules » (CAM). Les premiers attirent et activent les lymphocytes, alors que les deuxièmes permettent l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium vasculaire (Brick et al., 2011)

### **III. 3. 1. 3. La réaction médiée par les lymphocytes T CD8+**

L'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) est similaire à celle des T CD4+ et utilise les mêmes signaux. Elle peut se faire de façon directe par la cellule cible ou indirecte par l'intermédiaire des lymphocytes T CD4+ activés. La destruction des cellules parenchymateuses médiée par les CTL se fait par au moins deux mécanismes complémentaires :

- L'un impliquant la libération de granules cytoplasmiques, les perforines (protéines capables de former des pores) et les granzymes (enzymes protéolytiques) dans l'espace de jonction intercellulaire.
- L'autre impliquant la liaison de la protéine Fas de la cellule cible avec son ligand Fas L situé sur le lymphocyte T CD8+ (Brick et al., 2011)

### **III. 3. 1. 4. Hypersensibilité retardée (DTH : delayed type hypersensitivity)**

C'est une réaction inflammatoire localisée induite par des cytokines produites par certaines sous-populations de lymphocytes T, les TDTH activés par les T CD4+. Ces cytokines sont responsables du recrutement et de l'activation des macrophages en cellules plus destructrices. Certaines cytokines, comme le TNF $\alpha$ , ont un effet cytotoxique direct sur les cellules du greffon. (Brick et al., 2011)

### **III. 3. 1. 5. Réaction médiée par des lymphocytes B**

Après leur activation, ils se différencient en plasmocytes producteurs d'anticorps, dont la fixation sur l'endothélium vasculaire du greffon active la cascade du complément (voie classique), aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire susceptible d'endommager l'endothélium (Brick et al., 2011)

### **III. 3. 1. 6. Cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC)**

Certaines cellules à potentiel cytotoxique (cellules NK, macrophages) possèdent un récepteur du fragment Fc des IgG qui leur permet de capter les complexes IgG–cellule cible.

La libération d'enzymes lytiques au niveau des zones de contact induit une lésion de la cellule cible. (Brick et al., 2011)

### III.4. Prévention

Elle repose essentiellement sur la réalisation d'un bilan immunologique prégreffe et l'utilisation de traitements des immunosuppresseurs.

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 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)

### III. 5. Surveillance

La surveillance du transplanté est capitale pour sa survie et celle du greffon. Plusieurs complications (rejets, infections, problèmes cardiovasculaires et cancers principalement) guettent le patient à tout moment, aussi bien dans les heures ou les jours suivant la greffe que plusieurs années après. C'est pourquoi une surveillance régulière est maintenue même après l'hospitalisation, tant que le greffon est en place. La stratégie de surveillance du rejet immunologique, universellement utilisée, consiste à rechercher régulièrement une allo immunisation dirigée contre les cellules du donneur et/ou à pratiquer une biopsie. (Brick et al., 2011).

# **Matériel et Méthodes**

### Contexte de l'étude

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master 2 en Génétique, nous avons réalisé un projet de fin d'étude portant sur l'apport du typage HLA du locus HLA-DQ en transplantation rénale.

Nous avons réalisé notre étude rétrospective à l'unité d'immunogénétique du service d'immunologie médicale du CHU Issad Hassani (CHU Beni Messous), durant une période 5 mois, de Février à juin 2023.

Nous avons mené une étude rétrospective descriptive d'une collection de cas, 120 donneurs ont bénéficié d'une transplantation rénale dans laquelle 118 receveurs d'une greffe rénale, à partir d'un donneur vivant, ont été inclus et dont l'objectif principal est d'évaluer l'intérêt du typage HLA DQ en transplantation rénale.

Nous avons étudié l'association des mésappariements HLA DQ (entre le donneur et le receveur), avec le développement des anticorps anti HLA DQ spécifiques du donneur (DSA) d'une part, et le rejet humoral d'autre part en post transplantation. Par ailleurs, nous avons étudié la fréquence des DSA HLA DQ ainsi que leur association au développement du rejet humoral, en post transplantation.

La collecte des données concernant les transplantés rénaux suivis par le service de néphrologie du CHU Issaad Hassani de Beni Messous s'est déroulée entre le mois de Février 2023 au mois d'Avril 2023.

La source de notre collecte de données était les dossiers des greffés rénaux (service néphrologie du CHU Beni Messous) suivis, sur le plan immunologique, avant et après la transplantation au niveau du service d'immunologie du même hôpital. Les données comprennent :

- La recherche et l'identification des anticorps anti HLA en pré et post greffe chez le receveur,
- Le typage HLA DQ du donneur et du receveur et le pourcentage d'identité ou d'incompatibilité HLA DQ,
- La présence des DSA *de novo* et le développement d'un rejet humoral chez le receveur ainsi que des informations spécifiques aux patients qui ont été intégrées à l'étude comme des co variables.

Les Co variables suivies chez ces patients sont :

- **Démographiques** : âge, sexe, groupage sanguin ABO, lien de parenté entre le donneur et le receveur.
- **Relatives à la greffe** : âge de la greffe, étiologie de la transplantation et les antécédents d'immunisation chez le receveur.

Après avoir regroupé toutes les données dans un fichier Excel, les codes des dossiers ont été choisis comme code des patients. Les données démographiques et les données spécifiques à la greffe ainsi que les informations en post greffe y ont été notées. Par convention, les données des Co variables manquantes étaient remplacées par « / ».

### I. Matériel

#### I. 1. Matériel biologique

Le sang total des receveurs et des donneurs a été prélevé dans des tubes contenant un anticoagulant de type EDTA sur lesquels sont mentionnés les noms et les prénoms des patients, accompagné d'une fiche contient un questionnaire détaillé. (**Annexe N° 01**).

#### I.2. Matériel non biologique

Afin de réaliser l'étude, une gamme de réactifs et d'appareillages ont été utilisés (**Annexe N° 02**).

### II. Méthodes

#### II. 1. Typage génétique HLA DQ

##### II. 1. 1. Extraction automatique d'ADN

Nous avons effectué une extraction automatisée de l'ADN avec le kit « Blood DNA extraction kit Maxwell® 16 LEV (Promega®) basé sur le principe d'utilisation de billes magnétiques recouverte de silice. L'instrument peut traiter jusqu'à 16 échantillons en 40 minutes. Dans ce qui suit le mode opératoire de l'extraction automatique :

- Déposer 300 µl du sang sur un tube EDTA dans un Eppendorf.
- Ajouter 30 µl de protéinase K ainsi que 300 µl de solution de Lyse.
- Vortex pendant 10 secondes.
- Incuber au bain-marie à 56°C pendant 20 minutes.
- Placer le lysat dans le premier puit de la cartouche et les plongeurs à la position numéro8.
- Ajouter 110 µl du d'élution buffer dans les petits embouts

- Mettre les cartouches dans l'automate pendant 40 min.
- Récupérer l'éluât d'ADN correspondant à chaque patient.

### **II. 1. 2. Quantification de la concentration de l'ADN et mesure du degré de pureté**

Le spectrophotomètre Nanodrop a été utilisé pour la mesure de la concentration de l'ADN extrait en mesurant l'absorbance des acides nucléiques à 260DO, ainsi que le degré de pureté (contamination par les protéines) en calculant le rapport d'absorbance : DO260/DO280 qui doit être compris entre 1,8 et 2. La concentration d'ADN doit être ajustée à 30 ng/μl pour l'étape suivante d'amplification. L'évaluation a été faite comme suit :

- Déposer 10 μl du blanc pour le nettoyage à la surface optique abaissé le bras pour permettre le contact.
- Relever le bras en essuyant les deux pieds optiques.
- Dans le même pied optique déposer 2 μl de l'ADN.
- Lire la concentration et le rapport DO260/DO280.

### **II. 1. 3. Typage HLA Locus HLA DQB par PCR-SSP**

La technique de PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction, Sequence Specific Primers) est basée sur le principe d'utilisation des amorces spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles lors de la réaction d'amplification. Seules les amorces dont les séquences d'ADN sont complémentaires de la séquences cible donnent un produit d'amplification grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase type thermostable sans activité correctrice. L'ADN amplifié est détecté à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose ; dans le cas d'une amplification positive, des fragments d'ADN de longueur définie sont obtenus, qui peuvent être identifiés comme des bandes sur le gel. Le kit utilisé dans notre étude pour le typage HLA DQ est le : DQ low OLERUP SSP® CareDX® dans lequel la plaque contient 16 puits. Dans ce qui suit le mode opératoire :

#### **a. Pré amplification**

- Une plaque d'amplification HLA DQB comporte 16 puits dont chacun contient une solution d'amorces lyophilisées composée d'un mélange d'amorces spécifiques, ainsi qu'une paire d'amorces de contrôle interne positif. Le Même Master Mix est utilisé pour tous les kits Olerup SSP®.
- Préparation de la solution mère contenant 3 μl master mix et 5 μl d'eau H<sub>2</sub>O (sans nucléases) quantité suffisante pour 16 puits d'une plaque de typage HLA DQB.

- Vortex la solution mère pendant 15 s.
- Déposer le contrôle négatif dans la première position
- Ajouter 2 µl d'ADN des patients à la solution mère dans QSP pour 16 puits de la plaque de typage HLA DQ.
- Agiter dans le vortex le mélange pendant 20 secondes.
- Déposer le mélange dans le reste des puits.
- Recouvrir les plaques à l'aide de la feuille adhésive fournie pour éviter l'évaporation pendant l'amplification.

### b. Amplification

- Mettre la plaque dans un thermocycleur (C1000 touch, Biorad®) qui modifie très précisément la température de l'échantillon selon un programme d'amplification en 3 étapes constituant un cycle de PCR avec une durée de 1 heure et 35 minutes (**Tableau I**)
- Dénaturation : Cette étape permet de dénaturer l'ADN double brin en brins simples, prêts à être amplifiés.
- Hybridation : Les amorces spécifiques sont conçues pour se lier de manière sélective aux séquences d'ADN cibles. Chaque paire d'amorces est conçue pour détecter un variant génétique spécifique.
- Élongation : La polymérase ADN utilise les amorces spécifiques comme point de départ pour synthétiser de nouveaux brins d'ADN complémentaires à partir de l'ADN cible.
- A la fin de l'amplification, une étape de refroidissement à 4 °C permet la complétion de la synthèse de l'ADN et assure que tous les brins d'ADN cible ont été amplifiés.

**Tableau I** : Programme d'amplification de la PCR-SSP OLERUP SSP® CareDX®

<b>1 CYCLE</b>	94 °C	2 minutes	Dénaturation initial
<b>10 CYCLE</b>	94 °C	10 secondes	Dénaturation
	65 °C	1 minutes	Hybridation-Élongation
<b>20 CYCLE</b>	94 °C	10 secondes	Dénaturation
	61 °C	50 secondes	Hybridation
	72 °C	30 secondes	Élongation
<b>FIN-CONÇERVATION</b>	4 °C	∞	Élongation final

## II. 1. 4. Révélation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

### a. Préparation d'un gel d'agarose à 1,5%

- Dans un Bécher on dépose 200 ml de tampon TBE et on ajoute 3g d'agarose.
- Chauffer le mélange pendant 5 min.
- Ajouter deux gouttes d'agent intercalant GelRed®.
- Agiter le mélange
- Déposer dans le porte gel et placer les épingles pour creuser les puits.

### b. Electrophorèse

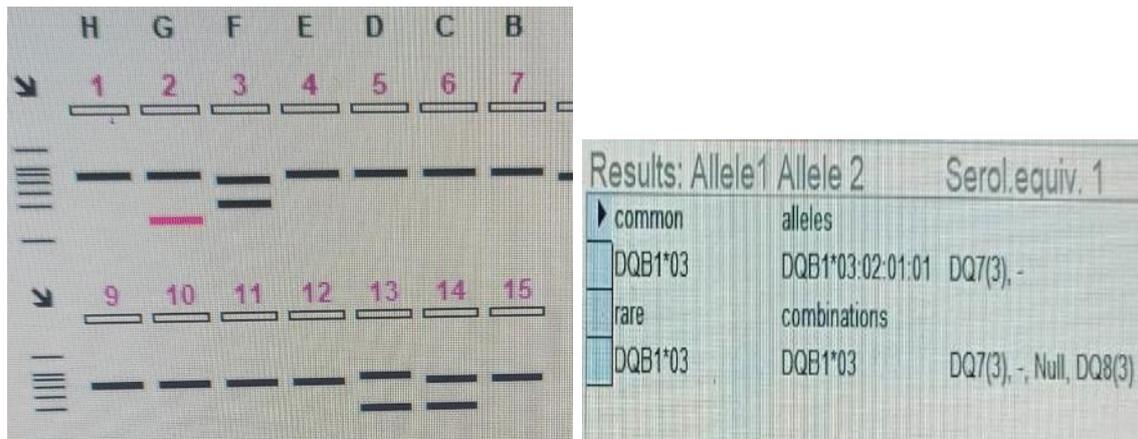
- Retirer les épingles après la solidification du gel et le déposer dans la cuve d'électrophorèse préalablement remplie du tampon TBE.
- Déposer 10 µl du contenu des puits de la plaque d'amplification au fond des puits creusés dans le gel, en respectant l'ordre du dépôt.
- L'électrophorèse se fait pendant 15 à 20 minutes à 8-10 V/cm.

### c. Lecture du gel

Les bandes d'amplification d'ADN formées sont révélées et visualisées à l'aide d'un Transilluminateur (GelDoc® Biorad®) après excitation de l'agent intercalant par des rayons ultraviolets.

### d. Interprétation des résultats

- Le puits du contrôle négatif ne doit contenir aucune amplification.
- Les bandes HLA DQB se situent entre les bandes du contrôle interne et l'excès des nucléotides (plus légères).
- La bande du contrôle interne doit être positive dans tous les puits négatifs (absence d'amplicons HLA DQ) et peut être présente ou non dans les puits positifs (absence d'amplicons HLA DQ).
- L'interprétation du gel après migration électrophorétique se fait en se référant à la position des bandes HLA positives. Le logiciel SCORE ® permet d'obtenir le typage HLA DQB des patients après introduction des bandes positives (**Figure 4**).



**Figure 4.** Exemple de résultat de typage HLA DQ sur le logiciel SCORE®  
(photos originales)

Le mode opératoire de cette technique est détaillé sous forme diagramme en **annexe N° 03**.

### II.1.5. Typage HLA du Locus HLA DQA et DQB par PCR-SSO

La PCR SSO (Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Oligoprobes) a pour principe de fixer, dans des puits d'une plaque ou sur des bandelettes, les sondes spécifiques HLA et de rajouter l'ADN amplifié de l'individu à typer (M.M. Tongio et al., 1998).

Dans notre étude, la technique PCR-SSO HLA DQ utilisée est de type Luminex (Immucor®, Lifecodes®) où les sondes spécifiques d'allèles HLA DQA et B ont été fixées sur des billes de polystyrène. L'ADN amplifié biotinylé s'hybride à la sonde qui lui est spécifique. La révélation de cette réaction se fait à l'aide de la streptavidine marquée avec un fluorochrome : la phycoérythrine (SA-PE). Le mode opératoire est détaillé en **annexe N° 04**.

### III. Etude statistique

Nous avons utilisé le logiciel **Microsoft EXCEL 2019** pour la réalisation des graphes et le calcul des moyennes et des médianes.

Logiciel **SCORE version 5.00** a été utilisé pour l'interprétation des résultats du typage HLA DQ.

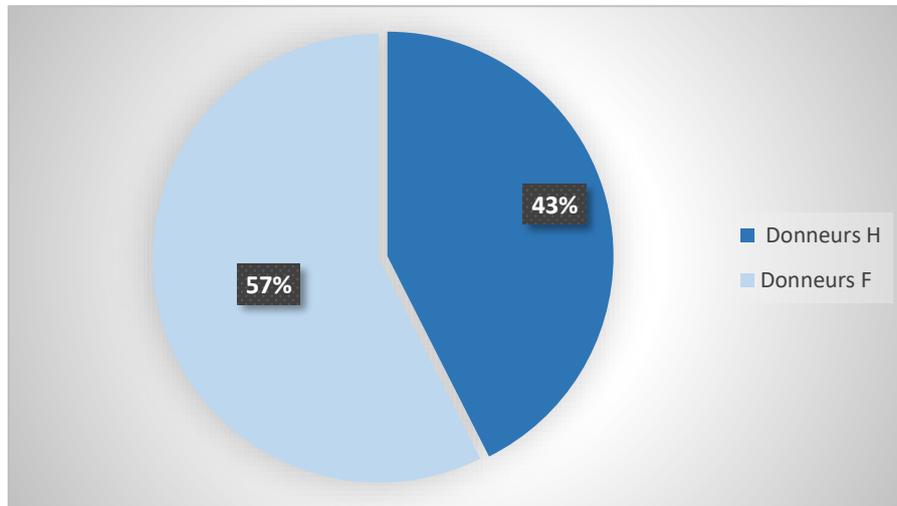
Nous avons aussi utilisé le **Logiciel Graphpad prism 9.5.1** pour la réalisation des tests statistiques (comparaison des pourcentages par le test de Chi2 de Pearson ou le test exact de Fisher). Un résultat était considéré comme étant significatif pour toute valeur de  $p < 0,05$ .

# Résultats

## I. Résultats de l'étude des caractéristiques démographiques et biologiques de la cohorte

### I. 1. Répartition des donneurs selon le sexe

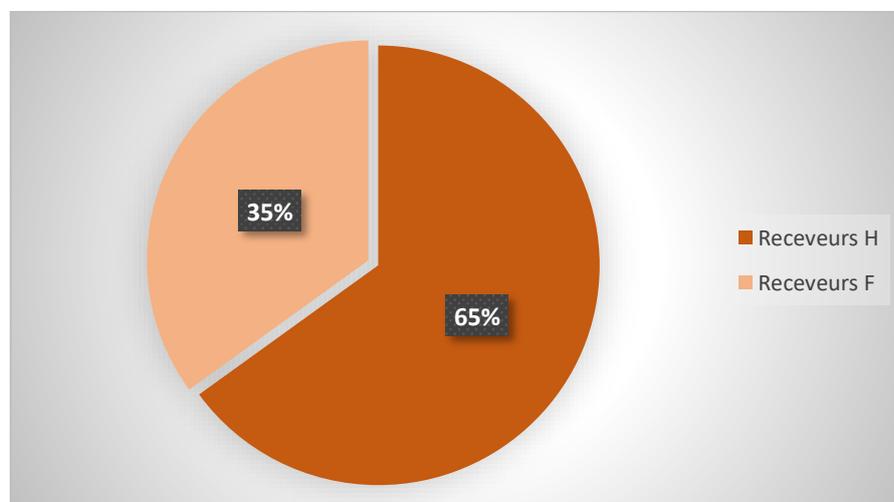
Les donneurs étaient, majoritairement, de sexe féminin avec un pourcentage de 58% contre 43% pour les hommes, le sex-ratio étant de 0,73 (**Figure 5**).



**Figure 5.** Répartition des donneurs selon le sexe.

### I.2. Répartition des receveurs selon le sexe

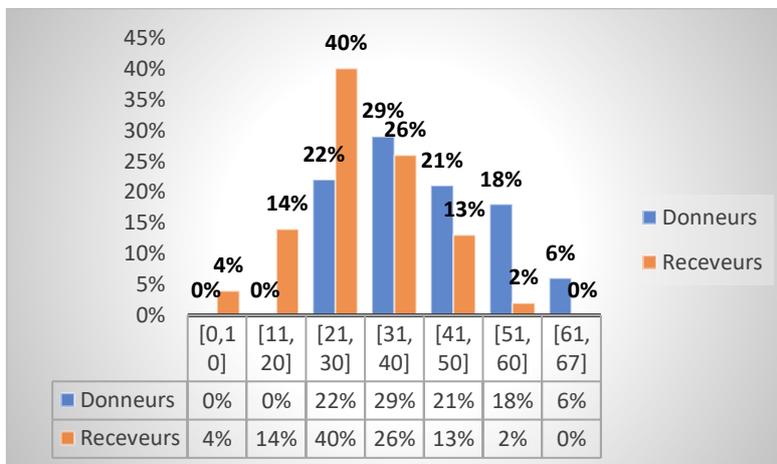
Les receveurs étaient, majoritairement des hommes avec un pourcentage de 65% contre 35% pour les femmes, le sex-ratio étant de de 1,87 (**Figure 6**).



**Figure 6.** Répartition des receveurs selon le sexe.

### I.3. Répartition des receveurs et des donneurs selon l'âge

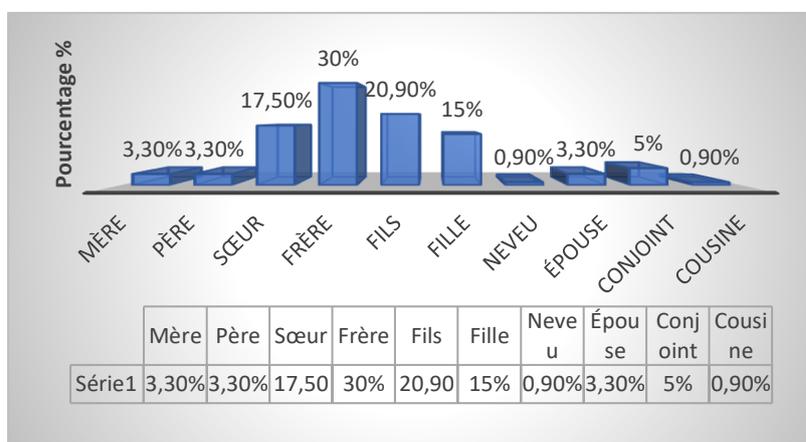
120 couples Donneur/Receveur ont été inclus dans notre étude. Leurs âges moyens respectifs étaient de  $35,27 \pm 12,52$  ans et  $35,26 \pm 12,51$  ans. L'âge des receveurs et des donneurs se situait en majorité dans la tranche de 21 à 40 ans (**Figure 7**).



**Figure 7.** Répartition des donneurs et des receveurs selon les tranches d'âge.

### I.4. Lien de parenté

La population de greffés rénaux était répartie selon le lien de parenté du donneur avec le receveur. Les frères (30%), les fils (20,9%), les sœurs (17,5%) et les filles (15%) représentent les donneurs les plus fréquents dans notre étude (**Figure 8**). Tous les donneurs étaient vivants (100%).



**Figure 8.** Répartition des donneurs selon leur lien de parenté avec le receveur.

### I. 5. Etiologie de l'insuffisance rénale

La répartition des principales étiologies de l'insuffisance rénale chez les patients est représentée dans la (Figure 9). Plus des trois quarts des patients (80,8%) avaient une néphropathie indéterminée.

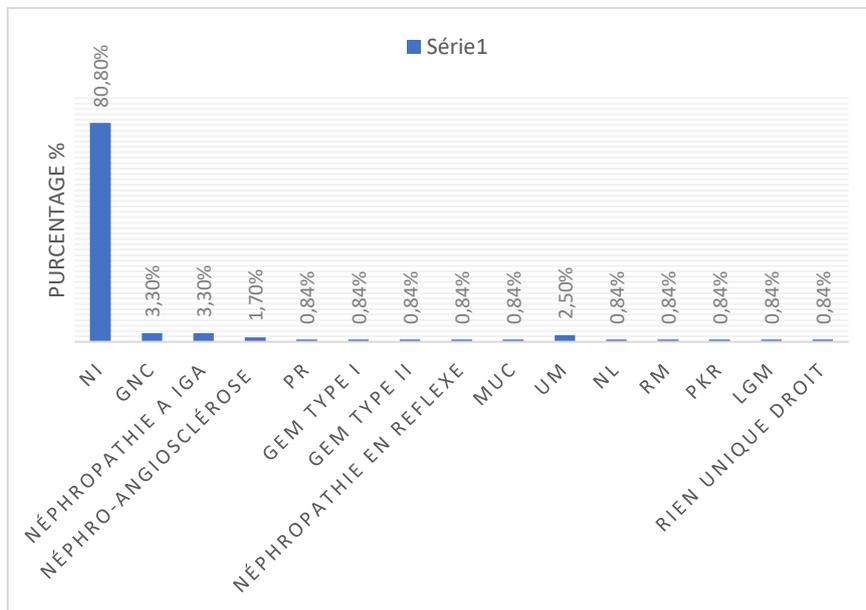


Figure 9. Étiologie de l'insuffisance rénale.

### I.6. Délai de la transplantation rénale

Les 118 transplantés rénaux ont été suivis pendant une durée médiane de 11 ans (Q1= 6.25 ans, Q3=13 ans). La fourchette de suivi la plus prévalente est de ]12,15] ans (40%) (Figure 10).

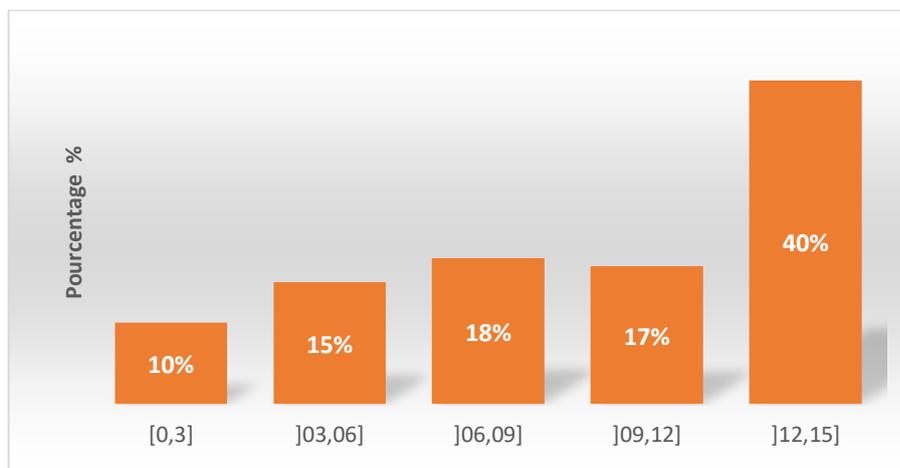
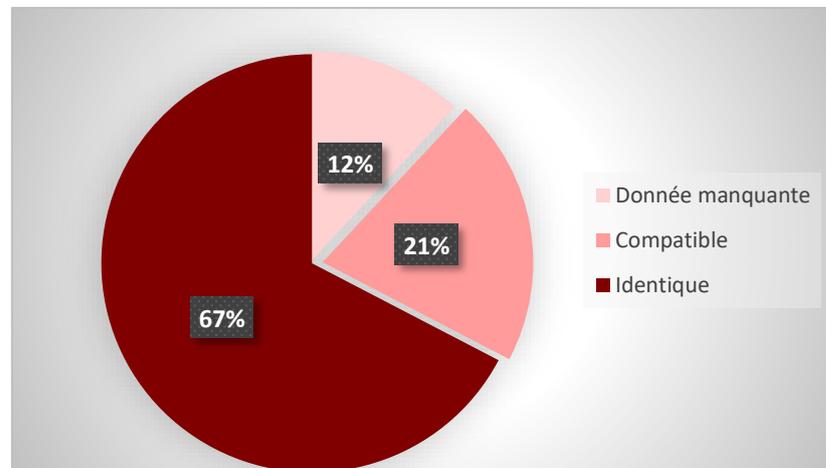


Figure 10. Distribution de la population selon le délai de transplantation rénale à partir de la date de la transplantation jusqu'au 2022

### I. 7. Groupage sanguin ABO

Concernant la compatibilité ABO, la transplantation a été réalisée entre des couples avec un groupage sanguin identique dans 67% des cas, alors que dans 21% des cas, les couples donneurs/receveurs étaient ABO compatibles. Pour 14 patients, le groupe sanguin n'a pas été renseigné (**Figure 11**). Aucune greffe ABO incompatible n'a été effectuée.



**Figure 11.** Compatibilité ABO entre les donneurs et les receveurs.

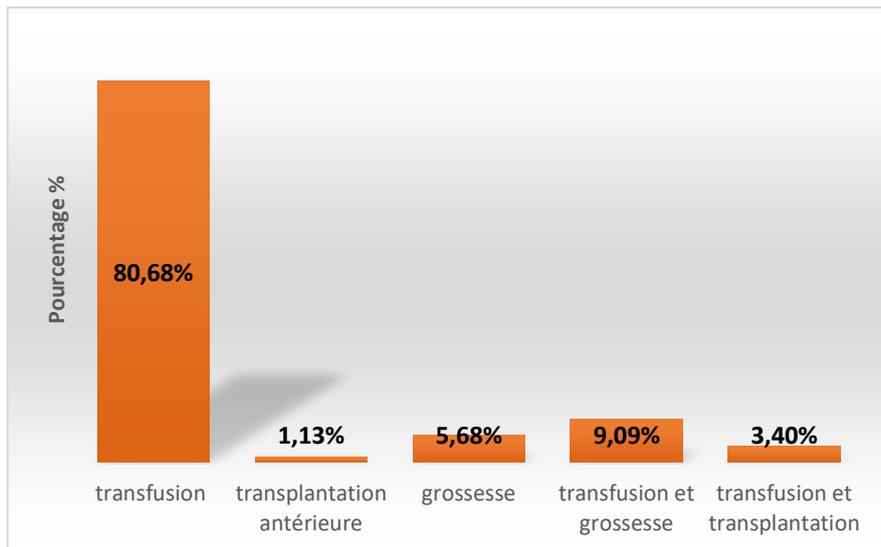
### I.8. Antécédents d'immunisation

75% des receveurs avaient déjà eu au moins un évènement immunisant avant la transplantation rénale (transfusion sanguine, grossesse ou transplantation antérieure), en revanche 25% de la population n'ont pas eu d'antécédents d'immunisation (**Tableau II**).

**Tableau II :** Evènements immunisants chez les receveurs

Evènement immunisant	Nombre	Pourcentage %
Absence	30	25
Présence	88	75

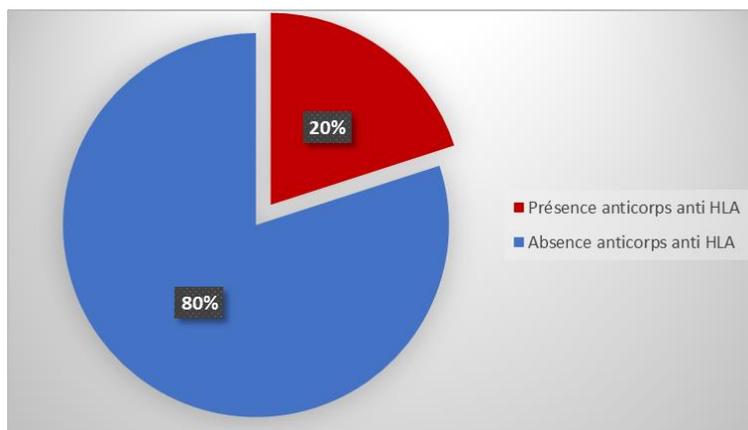
Parmi les patients aux antécédents d'immunisation, 80,68% ont été transfusés avant la greffe rénale ; 9,09% étaient des femmes déjà transfusés et ayant des grossesses, 3,40% ont été déjà transfusés et ont eu une transplantation antérieure et 1,13% ont eu une transplantation antérieure (**Figure 12**).



**Figure 12.** Evènements immunisants chez les receveurs.

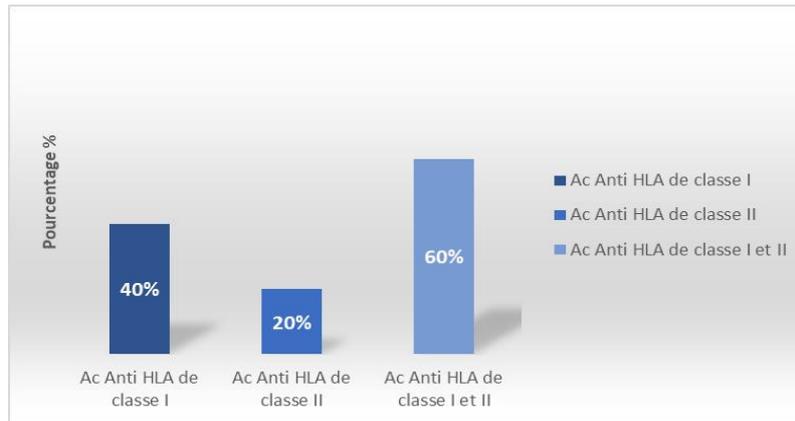
### I. 9. Anticorps anti HLA avant transplantation

Concernant l'allo-immunisation HLA en pré transplantation, 20% des patients transplantés ont développé des allo anticorps anti-HLA avant la greffe, le reste (80%) étaient non immunisés (**Figure 13**).



**Figure 13.** Répartition des patients selon le développement d'anticorps anti HLA en pré-transplantation.

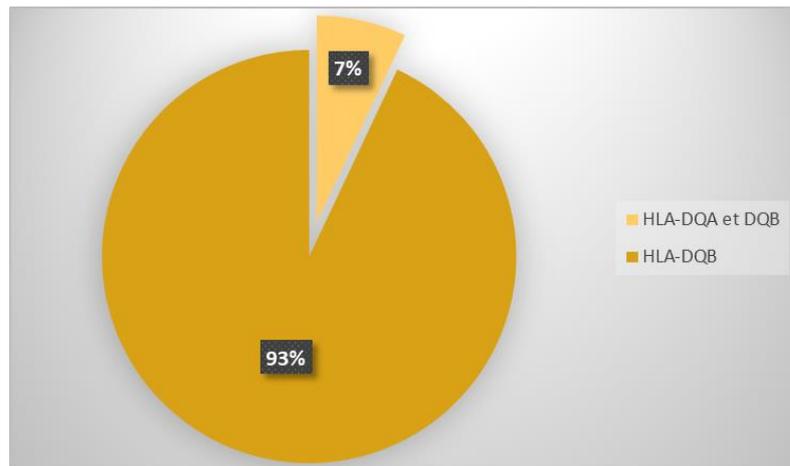
Pour les patients ayant développé des anticorps anti-HLA, seuls 40% ont développé des allo anticorps anti HLA de classe I et 20% ont développé des allo anticorps anti HLA de classe II alors que 60% ont développé des allo anticorps anti HLA classe I et II à la fois (**Figure 14**).



**Figure 14.** Répartition des patients selon la classe des anticorps anti HLA en pré-transplantation.

## II. Résultats du typage moléculaire du locus HLA-DQ

Dans notre étude, la majorité des patients avaient un typage du locus HLA DQB dans leurs dossiers avec une fréquence égale à 93%, par contre seuls 7% des patients avaient un typage HLA-DQA et DQB (**Figure 15**).

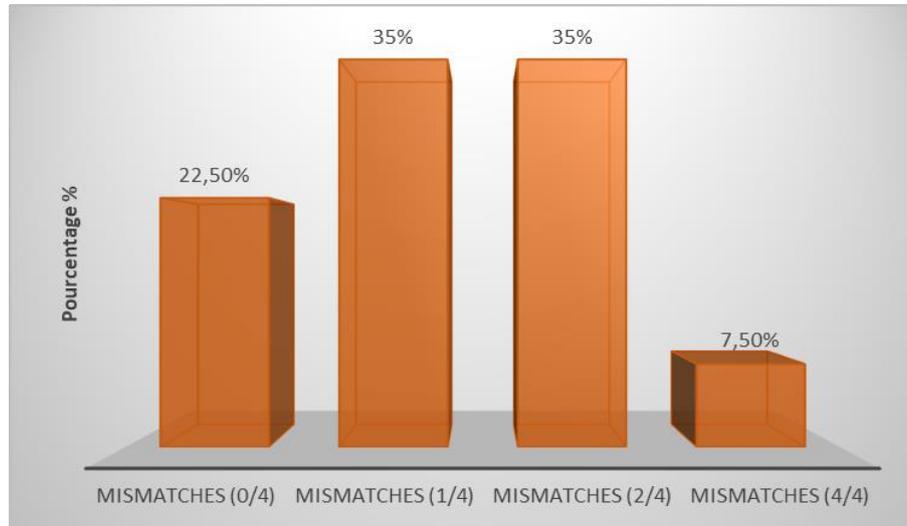


**Figure 15.** Répartition des patients selon le typage HLA-DQ.

### II.1. Compatibilité HLA-DQ entre le donneur et le receveur

À propos des mésappariements ou mismatches HLA-DQ entre les donneurs et les receveurs, 35 % des couples présentaient un mésappariement HLA (1/4) et (2/4), 22,50% des

couples ne présentaient aucun mésappariement HLA (0/4) et 7,50% avaient un mésappariement total (4/4) (**Figure 16**).



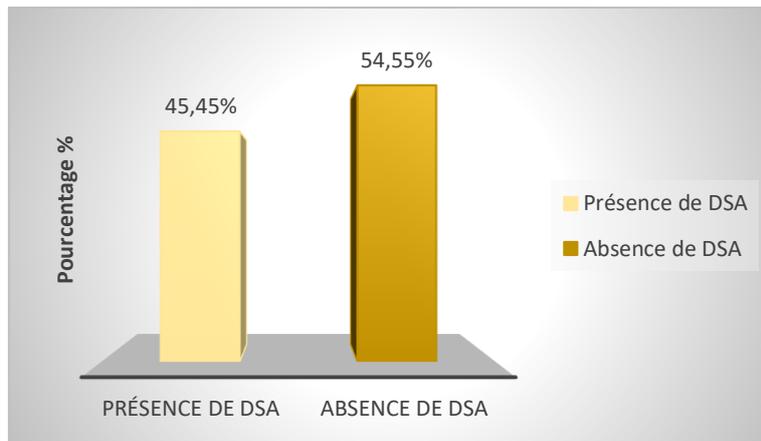
**Figure 16.** Répartition des patients selon les mésappariement HLA-DQ entre les donneurs et les receveurs

### III. Etude du suivi immunologique en post-transplantation

Sur les 118 patients ayant été greffés, seuls 88 ont été suivis par l'équipe d'immunologie médicale. Le reste, à savoir 32 patients, n'ont plus donné signe de vie après la greffe.

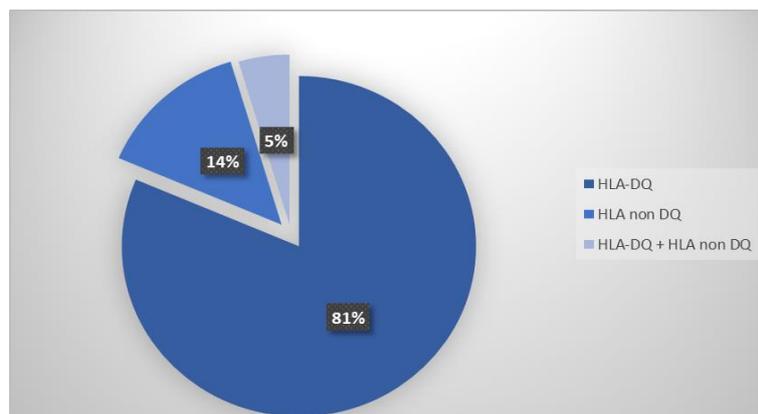
#### III. 1. Anticorps anti HLA spécifiques du donneur (DSA)

L'analyse du suivi immunologique chez les 88 patients, en fonction du devenir des greffons, montre que 40 patients (45,45%) ont développés des DSA *de novo*, parmi lesquelles trois transplantés ont développés deux types de DSA en même temps. Tandis que 48 patients (54,55%) n'ont développé aucun DSA (**Figure 17**).



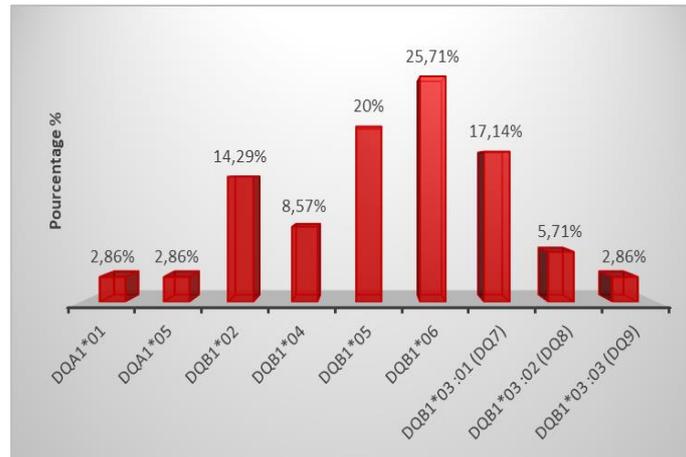
**Figure 17.** Répartition des patients selon le développement des DSA *de novo* après transplantation.

En effet, dans le groupe des 40 patients ayant développé des DSA *de novo* : 81% des DSA avaient une spécificité HLA-DQ seule, 14% étaient dirigés contre d'autres molécules HLA (HLA non DQ), le reste (5%) étaient dirigés contre les molécules HLA-DQ+ HLA non DQ (**Figure 18**).



**Figure 18.** Répartition des DSA selon leur spécificité antigénique.

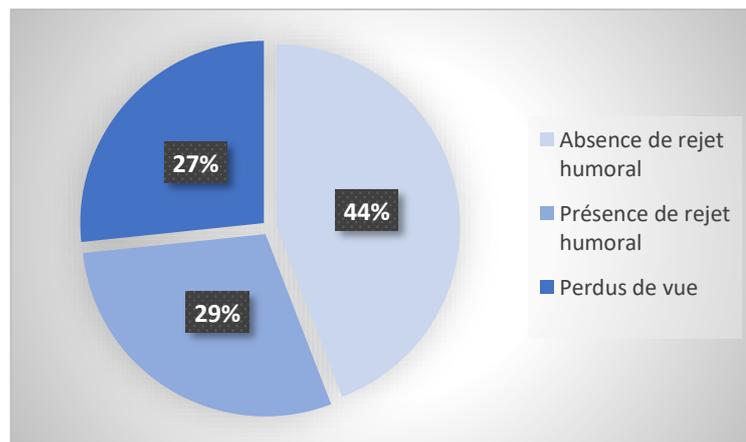
La distribution en fonction de la spécificité des DSA HLA DQ est représentée dans la (**Figure 19**). Les spécificités les plus répandues dans notre étude sont : HLA DQ6 (25,71 %), HLA DQ5 (20%), HLA DQ7 (17,14%) et HLA DQ2 (14,29%).



**Figure 19.** Répartition selon la spécificité des DSA HLA DQ.

### III. 2. Rejet humoral :

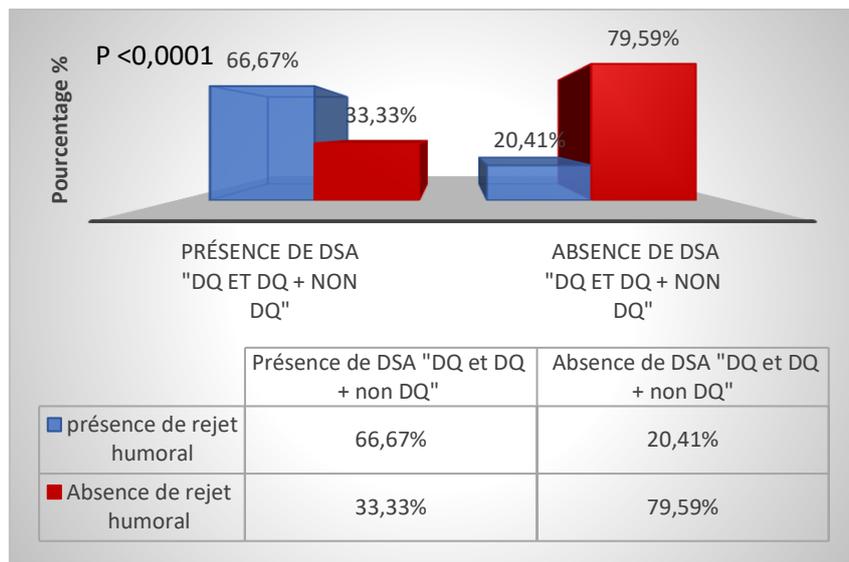
Dans notre série d'étude, 29% des transplantés ont développé un rejet humoral alors que 44% n'ont jamais eu d'épisode de rejet. 27% des patients n'ont pas été suivis en post transplantation (**Figure 20**).



**Figure 20.** Répartition des transplantés selon le devenir du greffon.

### III. 3. Etude de l'association entre les DSA HLA DQ et rejet humoral

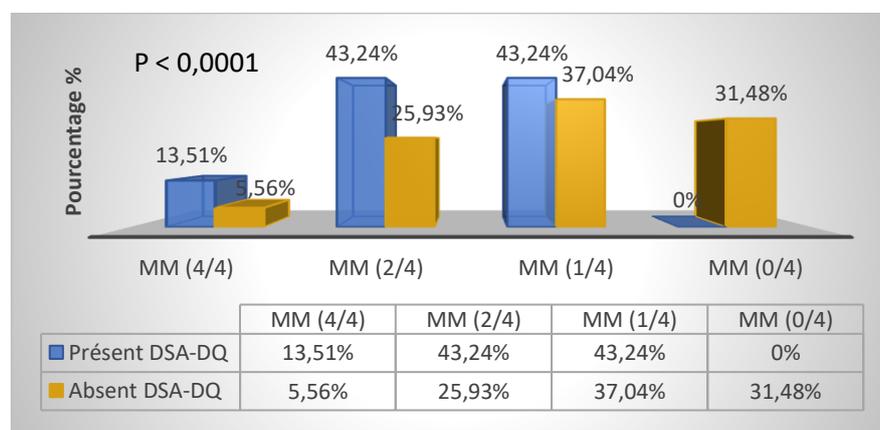
Les receveurs ayant développé des DSA *de novo* de spécificité HLA DQ et HLA DQ associés à des DSA HLA non DQ, ont présenté une fréquence significativement plus élevée de rejet humoral, comparé aux receveurs qui n'ont pas développé de DSA ou ayant développé des DSA HLA non DQ ( $P < 0,0001$ ) (**Figure 21**).



**Figure 21.** Répartition des patients selon l'association des DSA HLA DQ et le rejet humoral

### III. 4. Etude de l'association des mésappariements HLA DQ et le développement de DSA HLA DQ

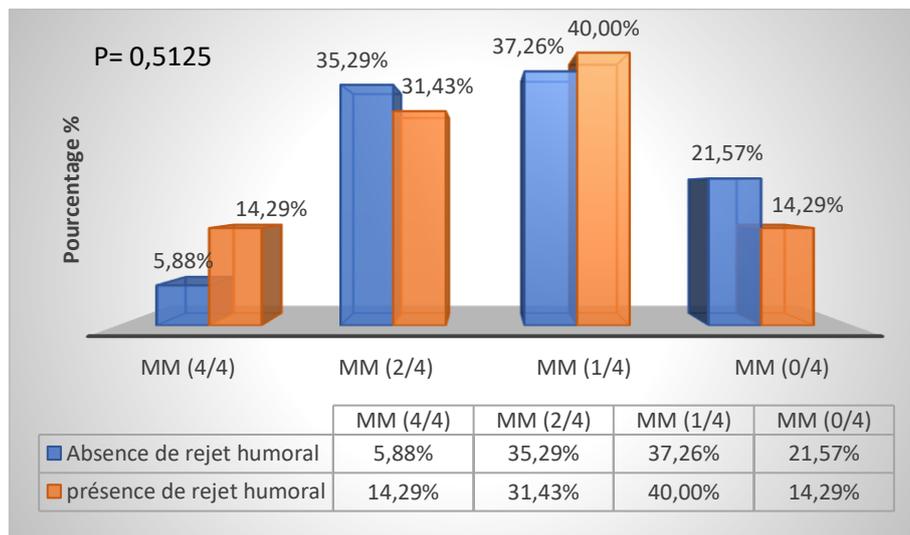
Nous avons réparti les patients pour lesquels le devenir est connu après la transplantation en deux groupes « Présence de DSA-DQ /Absence de DSA-DQ » en 4 catégories selon le nombre de mésappariements HLA DQ (**Figure 22**). Les receveurs qui ont développé des DSA-DQ avec 1 ou 2 mésappariements avec le donneur étaient les plus fréquents. En revanche, une absence des DSA-DQ a été observée chez la majorité des receveurs avec un mésappariement HLA-DQ 1/4. Une association significative a été notée en comparant le nombre de mésappariements HLA DQ et le développement des DSA HLA DQ ( $P < 0,0001$ ).



**Figure 22.** Répartition des patients selon l'association des mésappariements HLA DQ et développement de DSA HLA DQ.

### III. 5. Etude de l'association entre les mésappariements HLA DQ et le rejet humoral

Nous avons regroupé les patients avec un suivi immunologique connu après la transplantation en 2 groupes « Présence de rejet humoral / absence de rejet humoral » en 4 catégories en fonction du nombre de mésappariements HLA DQ entre le donneur et le receveur (**Figure 23**). Aucune association significative a été notée en comparant le nombre de mésappariements HLA DQ au risque de développement du rejet humoral ( $p = 0,5125$ ).



**Figure 23.** Répartition des patients selon l'association des mésappariements HLA DQ et le développement du rejet humoral

# **Discussion**

Bien qu'il y ait eu 2 000 greffes de rein réalisées depuis le début de la technique en 1986 en Algérie, ce nombre est très faible par rapport aux chiffres internationaux (Larbi, 2004). En effet, en moyenne plus de 3000 greffes de rein sont réalisées en France chaque année (*Agence de la biomedecine 2016*). Il existe peu de données concernant le suivi immunologique des patients en Algérie. Au niveau du Laboratoire « Service d'immunologie médicale CHU ISSAAD HASSANI », 118 patients ont bénéficié d'une transplantation rénale entre 2008 et 2022.

Dans notre population, toutes les transplantations ont été réalisées avec des donneurs vivants (120 donneurs) dans la majorité était apparentés. Malgré l'existence d'une politique sanitaire et d'un plan national de promotion du don et de la greffe en Algérie, on ne réalise pas encore de transplantations rénales à partir de donneurs cadavériques (Rekhif, 2021).

La population des receveurs était répartie en fonction du sexe comme suit : 65% d'hommes et 35% de femmes. La majorité des sujets ayant présenté une insuffisance rénale nécessitant une transplantation était des hommes. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés dans l'étude de Ramilitiana et al. (2016), où la sex-ratio était de 1,46 et aussi dans l'étude de Hidaya et al (2010) (Ramilitiana et al., 2016, Haddiya et al., 2010). Quant aux donneurs, le sexe féminin est majoritaire dans notre série d'étude avec un pourcentage de 57% contre 43% pour les hommes.

L'analyse des caractéristiques des couples greffés montre que la population des receveurs est majoritairement jeune dans notre échantillon. 40% de la population appartient à la tranche d'Age [21,30] ans. En contrepartie, les donneurs sont un peu plus âgés, 35% appartiennent à la tranche d'âge [31,40] ans. Il est bien connu que les greffes à partir des donneurs vivants ont de meilleurs résultats mais pas à un âge avancé >65 ans. Nos résultats sont similaires à ceux de Kok et al (2006) et Ramilitiana et al (2016) et David O. Walls et al (2020).

Dans notre série d'étude le lien de parenté le plus fréquent est la fratrie (47,50%), ensuite les descendants (35,9%). La majorité des séries de transplantation rénale retrouvent une prédominance du don de rein entre la fratrie (47%) comme le décrivent (Atik et al., 2017) (Barrou et al., 1996)

La première cause de la perte de la fonction rénale dans notre population est indéterminée (Environ 80%), ce qui maintient un certain mystère quant à la principale origine de cette pathologie. Une minorité était atteinte soit d'un syndrome néphrotique ou bien des maladies génétiques rares comme la polykystose rénale ou Purpura rhumatoïde « PR ».

Dans l'étude de Batouche et al.,(2014) a montré que 29% des cas avaient une cause indéterminée. Nos résultats reflètent le manque de moyens diagnostiques de l'insuffisance rénale chronique.

La compatibilité ABO est le premier facteur pris en compte dans l'appariement des receveurs et des donneurs en transplantation rénale. La majorité des transplantations étaient ABO identiques (67%) et aucune transplantation ABO incompatible n'a été réalisée. Bien que la transplantation rénale en ABO incompatible soit possible, sous certaines conditions, mais la survie du greffon est meilleure dans les greffes ABO compatibles. (Neuzillet et al., 2006)

75% de nos patients ont des antécédents d'immunisation avant la transplantation. Cette proportion élevée s'explique par le taux élevé de transfusions sanguines (80,68%). Étant donné la difficulté d'accès au traitement par érythropoïétine et les délais d'attente pour une transplantation, les patients finissent par être transfusés. (Brick et al., 2016).

L'analyse du statut immunitaire des patients a montré que 20 % des patients avaient développé des anticorps anti-HLA avant la transplantation, tandis que 80 % n'ont pas développé d'anticorps anti-HLA. Ces résultats sont similaires avec les études de Brick et al (2015), Barroci et al (2007). En revanche, le dépistage de ces patients positifs a révélé la présence d'anticorps anti-HLA de classe 1 et/ou de classe 2. Ceci est cohérents avec l'étude de S. Amoura et al .,(2012). Par conséquent, ce résultat n'est pas surprenant étant donné que ces patients positifs avaient des antécédents d'immunisation tel que les transfusions sanguines, les grossesses, les transplantations antérieures.

Bien que le bénéfice de la compatibilité au niveau des locus HLA-A, -B, -DR dans les greffes de rein soit reconnu depuis plus de 30 ans, l'impact de l'incompatibilité HLA-DQ est encore discutable.

Entre 2008 et 2022, 118 receveurs de greffe de rein ont été suivis pendant une durée médiane de 11 ans. Parmi ceux-ci, 22,50% patients ont reçu un rein 100% compatible en HLA-DQ et 35% des receveurs avaient 1/4 mésappariement HLA-DQ avec leurs donneurs. 35% des couples donneurs/receveurs avaient 2/4 mésappariements HLA-DQ et 7,5% ont reçu un rein 100% incompatible en HLA DQ. Nos pourcentages sont similaires à l'étude américaine de Leeaphorn de 2018. Il en est de même pour les études de Lim et al. (2016) et Khongjaroensakun et al. (2018).

Dans notre étude, 45,45% des transplantés avaient développé des DSA *de novo* (dnDSA), tandis que 54,55 % des patients n'ont pas développé de DSA après la transplantation. En outre, 81,40% des DSA positifs apparus dans le sérum des patients testés après transplantation étaient dirigés contre la molécule HLA-DQ, 13,95% contre une molécule HLA non DQ et 4,65% contre des molécules HLA-DQ + HLA non DQ. Nos résultats vont de même que ceux rapportés par l'étude de Willicombe et al. (2012).

Les conclusions de Barocci et al (2007) sur l'analyse des trois groupes de DSA « HLA-DQ seul / HLA non-DQ / HLA-DQ + HLA non-DQ », indique que le groupe de DSA dirigés contre les molécules HLA-DQ était essentiellement de spécificité : DQ5, DQ7, DQ2 et DQ6, ces données est similaires aux nôtres. Nous n'avons pas analysé les groupes de DSA dirigé contre les molécules HLA non-DQ et HLA-DQ + HLA non-DQ en raison du faible effectif présent dans ces groupes.

L'analyse de l'évolution du greffon n'a pas pu être réalisée pour 32 patients en raison d'une absence de suivi immunologique après la transplantation. Nous avons noté que 44 % des patients avaient conservé un greffon viable, tandis que 29,17 % avaient développé un rejet humoral. Ces résultats sont similaires à l'étude française de Szwarc et al (2015)

Les anticorps anti-HLA-DQ spécifiques du donneur sont parmi les DSA les plus fréquents qui se développent après la transplantation rénale et sont associés au rejet médié par les anticorps et à la perte d'allogreffe. (Duangtawan 2020 et al., 2020)

Il existe maintenant des preuves substantielles que le développement de DSA HLA DQ *de novo* est associé à une survie inférieure de l'allogreffe (Willicombe et al., 2012).

L'un des objectifs de notre étude était d'étudier le risque de développement du rejet humoral chez les patients ayant développé des dnDSA HLA DQ. Nos résultats indiquent que les receveurs qui ont développé des dnDSA DQ et des dnDSA DQ associés à des DSA DR avaient développé dans 67,66% des cas un rejet humoral. Nos résultats sont cohérents avec les données de la littérature. Une étude récente de Parajuli et al (2017) a rapporté un taux élevé de rejet humoral associé aux DSA HLA DQ *de novo* (53%) (Sandesh Parajuli, 2017). Ainsi DeVos et al de 2012 ont également rapporté que les DSA HLA-DQ étaient significativement associés à une augmentation de la perte d'allogreffe.(DeVos et al., 2012)

Des recherches menées à grande échelle aux Etats Unis d'Amérique ont montré que l'augmentation des mésappariements HLA DQ était associée à la formation de DSA HLA DQ

de novo (Ladowski et al., 2021, Wiebe et al., 2013). En conséquence, A. Senev et al (2020) ont démontré qu'un seul mésappariement était suffisant pour induire le développement de DSA de novo. Cela corrobore avec nos résultats selon lesquels (1/4) et (2/4) des incompatibilités HLA étaient présentes chez la grande majorité des receveurs qui ont développé des DSA-DQ par rapport aux receveurs n'ayant aucun mésappariement HLA DQ (43,24% vs 0%). Une association significative a été retrouvée en comparant le nombre de mésappariements HLA DQ et le développement des DSA HLA DQ ( $P < 0,0001$ ). De plus, nous avons noté que la fréquence des DSA chez les couples présentant 1 ou 2 incompatibilités HLA DQ était supérieure à celle des couples présentant 100% d'incompatibilité HLA DQ, ceci pourrait être attribué au faible effectif de ce groupe dans notre série.

Dans notre étude, nous avons étudié l'association des mésappariements HLA DQ avec le risque de développement du rejet humoral. Les receveurs avec une ou deux incompatibilités HLA-DQ avaient une incidence plus élevée de rejet humoral que ceux avec une allogreffe rénale compatible HLA-DQ mais sans résultat significatif (respectivement 40% et 31,43% versus 14,29%). Cependant, nous n'avons retrouvé aucune association significative entre les incompatibilités HLA-DQ et le risque de rejet humoral ( $p=0,5$ ). Ceci est en concordance avec les résultats de l'étude de Lim et al (2016) qui n'ont pas trouvé d'effet de l'incompatibilité HLA-DQ sur la survie du greffon ainsi que l'étude thaïlandaise de Khongjaroensakun et al., (2018). De plus, nos résultats sont en concordance avec ceux d'une autre étude rétrospective portant sur 12 050 transplantations rénales (Freedman et al., 1997). L'absence de cette association dans notre étude est probablement due aux limites de la surveillance en série post-transplantation et des biopsies de surveillance des allogreffes rénales ainsi que le nombre réduit des patients.

Bien que notre étude n'ait montré aucune association entre les incompatibilités HLA-DQ et le rejet humoral, d'autres études ont rapporté que les greffés rénaux porteurs d'allogreffes HLA-DQ incompatibles sont à risque de développer des dnDSA dirigés contre les antigènes HLA DQ incompatibles et, qui par la suite, engendrent des dommages sur l'allogreffe. C'est le cas de l'étude de Leeaphorn et al (2018) qui a rapporté une association significative entre l'incompatibilité HLA-DQ entre le donneur et le receveur et le risque de développement du rejet aigu et ainsi que la perte du greffon.

# **Conclusion**

L'apport du typage HLA-DQ en transplantation rénale est essentiel pour garantir la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur. Notre étude visait à évaluer comment l'incompatibilité HLA DQ entre le donneur et le receveur pourrait affecter le devenir du greffon. Les résultats de notre étude montrent que :

- L'incompatibilité HLA DQ entre le donneur et le receveur ne constitue pas une contre-indication à la transplantation rénale.
- Le taux de l'identité HLA DQ présente entre le donneur et le receveur est associée au développement de DSA de novo mais n'affecte pas le rejet rénal.
- Le risque de développement de DSA de novo qui sont associés à un risque accru de développement d'un rejet humoral.

Les techniques de typage HLA par biologie moléculaire telles que la PCR-SSP et la PCR-SSO, permettent une analyse des variations génétiques dans les allèles HLA chez le donneur et le receveur ce qui permet de détecter les incompatibilités génétiques potentielles. De plus ; il est nécessaire de disposer au laboratoire de techniques très sensibles comme le LUMINEX afin d'identifier chez le receveur les anticorps anti HLA spécifiques des molécules HLA DQ du donneur qui peuvent déclencher une réaction immunitaire excessive (rejet humoral).

L'incompatibilité HLA-DQ entre le donneur et le receveur peut avoir un impact sur le devenir du greffon en augmentant le risque de rejet humoral. L'identification précise des incompatibilités HLA-DQ et la sélection des donneurs compatibles sur le plan immunologique peuvent contribuer à améliorer les résultats cliniques et la survie à long terme des greffons rénaux. Ainsi, en plus du typage HLA des loci A, B et DRB, le typage HLA DQ (au moins DQB) devrait systématiquement être inclus dans le bilan pré-greffe pour le donneur et le receveur, conformément aux nouvelles recommandations des sociétés savantes. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour approfondir notre compréhension sur l'impact de l'incompatibilité HLA-DQ et celui d'autres facteurs sur les résultats de la transplantation rénale.

# **Références bibliographiques**

- Amoura, S., Dubois, V., & Bouali-Benhalima, M. (2012). La technologie de phase solide pour la détection des anticorps HLA ELISA versus Luminex® : Les défis de l'interprétation. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2012(444), 79-84. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(12\)71620-9](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(12)71620-9)
- Anglicheau, D., Zuber, J., Martinez, F., Méjean, A., Patey, N., Correas, J.-M., Le Quintrec, M., Timsit, M.-O., Mamzer-Bruneel, M.-F., Noël, L.-H., Thiounn, N., Thervet, E., Legendre, C., & Hélénon, O. (2006). Transplantation rénale : Réalisation et complications. *EMC - Néphrologie*, 1(1), 1-19. [https://doi.org/10.1016/S1762-0945\(07\)25192-7](https://doi.org/10.1016/S1762-0945(07)25192-7)
- Atik, A., Tehir, M., Khemri, D., Bougroura, A., Ramdani, B., Bayahia, R., Abderrahim, E., Zouaghi, M. K., Rayane, T., Kara-Hadj Safi, L., Seba, A., & Benziane, A. (2017). Transplantation rénale au Maghreb : État des lieux et perspectives. *Néphrologie & Thérapeutique*, 13(5), 291. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2017.08.091>
- Barocci, S., Valente, U., & Nocera, A. (2007). Detection and analysis of HLA class I and class II specific alloantibodies in the sera of dialysis recipients waiting for a renal retransplantation. *Clinical Transplantation*, 21(1), 47-56. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2006.00578.x>
- Barrou, B., Bitker, M.-O., Mouquet, C., Benalia, H., Ourahma, S., Sylla, C., Luciani, J., Rottembourg, J., Jacobs, C., & Chatelain, C. (s. d.). Transplantation rénale à partir de donneurs vivants apparentés (DVA) : Expérience d'un centre.
- Batouche, D. D., Sadaoui, L., Khemliche, B., Negadi, A., & Mentouri, Z. (2014). Aspects cliniques et évolutifs de l'enfant insuffisant rénal chronique au CHU Oran : Réalités et perspectives. *Néphrologie & Thérapeutique*, 10(5), 392-393. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2014.07.111>
- Beck et al 1999. (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756), 921-923. <https://doi.org/10.1038/44853>
- Bevan, M. J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 117(6), 2233-2238.
- Boubchir, M. A., & Benabadji, M. (2004). Monographie sur l'insuffisance rénale chronique. O.P.U.

- Brick, C., Atouf, O., & Essakalli, M. (2016). Suivi immunologique en transplantation rénale : 13 ans d'expérience d'un laboratoire d'histocompatibilité marocain. *Transfusion Clinique et Biologique*, 23(2), 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2015.12.009>
- Brick, C., Atouf, O., & Essakalli, M. (2016). Suivi immunologique en transplantation rénale : 13 ans d'expérience d'un laboratoire d'histocompatibilité marocain. *Transfusion Clinique et Biologique*, 23(2), 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2015.12.009>
- Brick, C., Atouf, O., Benseffaj, N., & Essakalli, M. (2011). Rejet de la greffe rénale : Mécanisme et prévention. *Néphrologie & Thérapeutique*, 7(1), 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2010.10.002>
- Cesbron Gautier, A., Gagne, K., Retière, C., Devys, A., & Bignon, J.-D. (2007). Système HLA. *EMC - Hématologie*, 2(2), 1-20. [https://doi.org/10.1016/S1155-1984\(07\)47158-8](https://doi.org/10.1016/S1155-1984(07)47158-8)
- Dausset et al. (s. d.). Amazon.fr—HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme—Dausset, Jean, Pla, Marika—Livres. Consulté 21 juin 2023, à l'adresse <https://www.amazon.fr/HLA-complexe-majeur-dhistocompatibilit%C3%A9-lhomme/dp/2257124448>
- David O. Walls, D. O., Lee-Riddle, G. S., Bover Manderski, M., Sawinski, D. L., & Abt, P. L. (2020). Kidney transplant outcomes from donation after circulatory death donors of advanced age. *Clinical Transplantation*, 34(7). <https://doi.org/10.1111/ctr.13881>
- Delbos, F., Malard, S., & Congy, N. (2018). Le système HLA : génétique, structure et fonctions.
- DeVos, J. M., Gaber, A. O., Knight, R. J., Land, G. A., Suki, W. N., Gaber, L. W., & Patel, S. J. (2012). Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney International*, 82(5), 598-604. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.190>
- Duangtawan 2020, D., Tammakorn, C., Worawichawong, S., & Kantachuvesiri, S. (2020). Antibody-Mediated Rejection Due to Donor-Specific HLA-DQB1 and DQA1 Antibodies After Kidney Transplantation : A Case Report. *Transplantation Proceedings*, 52(6), 1931-1936. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2020.02.127>
- Euvrard, S., Morelon, E., Rostaing, L., Goffin, E., Brocard, A., Tromme, I., Broeders, N., Del Marmol, V., Chatelet, V., Domp Martin, A., Kessler, M., Serra, A. L., Hofbauer, G. F. L., Pouteil-Noble, C., Campistol, J. M., Kanitakis, J., Roux, A. S., Decullier, E., & Dantal, J.

(2012). Sirolimus and Secondary Skin-Cancer Prevention in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 367(4), 329-339. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1204166>

Fleckenstein, B., & Wiesmüller, K.-H. (1999). Quantitative analysis of peptide–MHC class II interaction. *Seminars in Immunology*, 11(6), 405-416. <https://doi.org/10.1006/smim.1999.0198>

Freedman, B. I., Thacker, L. R., Heise, E. R., & Adams, P. L. (1997). HLA-DQ matching in cadaveric renal transplantation. *Clinical Transplantation*, 11(5 Pt 2), 480-484.

Haddiya, I., Zoubeir, S., Loubna, B., Ezzaitouni, F., Ouzeddoun, N., Rabia, B., & Hakima, R. (2010). Surgical complications of renal transplantation from living donors : Experience of the CHU Ibn Sina Rabat. *The Pan African medical journal*, 6, 20.

Herrera, O. B., Golshayan, D., Tibbott, R., Ochoa, F. S., James, M. J., Marelli-Berg, F. M., & Lechler, R. I. (2004). A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 173(8), 4828-4837. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.8.4828>

HLA Nomenclature @ [hla.alleles.org](http://hla.alleles.org). (s. d.). Consulté 21 juin 2023, à l'adresse <https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>

Hood, L., Steinmetz, M., & Malissen, B. (1983). Genes of the Major Histocompatibility Complex of the Mouse. *Annual Review of Immunology*, 1(1), 529-568. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.01.040183.002525>

Jiang, S., Herrera, O., & Lechler, R. I. (2004). New spectrum of allorecognition pathways : Implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Current Opinion in Immunology*, 16(5), 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.07.011>

Johanna Rabiller, J., & Faure, S. (2019). De la maladie rénale chronique à la transplantation rénale. *Actualités Pharmaceutiques*, 58(584), 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2019.01.014>

Khongjaroensakun, N., Kitpoka, P., Wiwattanathum, P., Sakulchairungrueng, B., & Thammanichanond, D. (2018). Influence of HLA-DQ Matching on Allograft Outcomes in Deceased Donor Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 50(8), 2371-2376. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.02.187>

Klein, J., & Figueroa, F. (1986). Evolution of the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology*, 6(4), 295-386.

- Kok, N. F. M., Alwayn, I. P. J., Lind, M. Y., Tran, K. T. C., Weimar, W., & IJzermans, J. N. M. (2006). Donor Nephrectomy : Mini-Incision Muscle-Splitting Open Approach versus Laparoscopy. *Transplantation*, 81(6), 881-887. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000203320.74256.fd>
- Ladowski, J. M., Mullins, H., Romine, M., Kloda, D., Young, C., Hauptfeld-Dolejsek, V., Houp, J., & Locke, J. (2021). Eplet mismatch scores and de novo donor-specific antibody development in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Human Immunology*, 82(3), 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.12.009>
- Leeaphorn, N., Pena, J. R. A., Thamcharoen, N., Khankin, E. V., Pavlakis, M., & Cardarelli, F. (2018). HLA-DQ Mismatching and Kidney Transplant Outcomes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 13(5), 763-771. <https://doi.org/10.2215/CJN.10860917>
- Lim, W. H., Chapman, J. R., Coates, P. T., Lewis, J. R., Russ, G. R., Watson, N., Holdsworth, R., & Wong, G. (2016). HLA-DQ Mismatches and Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 11(5), 875-883. <https://doi.org/10.2215/CJN.11641115>
- Loupy, A. (s. d.). Rôle pronostic des anticorps anti-HLA en transplantation rénale : Approches en population.
- Marsh, S. G. E. (2018). Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2018. *Human Immunology*, 79(6), 516-525. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.04.007>
- Mellal, Y., & Lounici, Y. (s. d.). Bilan immunologique en pré- et en post-transplantation rénale.
- Moalic, V., & Ferec, C. (2005). Typage HLA, méthodes d'analyses et applications cliniques. *La Presse Médicale*, 34(15), 1101-1108. [https://doi.org/10.1016/S0755-4982\(05\)84126-0](https://doi.org/10.1016/S0755-4982(05)84126-0)
- Neuzillet, Y., & Lechevallier, E. (2006). Transplantation rénale ABO incompatible. *Progrès en Urologie*.
- Professeur Larbi Abid. (s. d.). La transplantation rénale en Algérie |Professeur Larbi Abid. Consulté 22 mai 2023, à l'adresse <http://www.santemaghreb.com/algerie/abid0104.htm>
- Ramilitiana, B., Ranivoharisoa, E. M., Dodo, M., Razafimandimby, E., & Randriamarotia, W. F. (2016). Une étude rétrospective sur l'incidence de l'insuffisance rénale chronique dans le service de Médecine Interne et Néphrologie du Centre Hospitalier Universitaire

d'Antananarivo. *The Pan African Medical Journal*, 23, 141. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.23.141.8874>

Rekhif, Y. (2021). Le don d'organes en Algérie : Limites et perspectives. *The Pan African Medical Journal*, 39, 232. <https://doi.org/10.11604/pamj.2021.39.232.30716>

Sandesh Parajuli. (2017). Utility of protocol kidney biopsies for de novo donor-specific antibodies. *American Journal of Transplantation*, 17(12), 3210-3218. <https://doi.org/10.1111/ajt.14466>

Semana, G., & Quelvennec, E. (2002). Exploration du SYSTÈME HLA : Pratiques et indications. *Revue Française des Laboratoires*, 2002(341), 53-62. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(02\)80181-0](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(02)80181-0)

Senev, A., Coemans, M., Lerut, E., Van Sandt, V., Kerkhofs, J., Daniëls, L., Driessche, M. V., Compennolle, V., Sprangers, B., Van Loon, E., Callemeyn, J., Claas, F., Tambur, A. R., Verbeke, G., Kuypers, D., Emonds, M.-P., & Naesens, M. (2020). Eplet Mismatch Load and De Novo Occurrence of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies, Rejection, and Graft Failure after Kidney Transplantation : An Observational Cohort Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 31(9), 2193-2204. <https://doi.org/10.1681/ASN.2020010019>

Szwarc, I., Garrigue, V., Delmas, S., Deleuze, S., Chong, G., & Mourad, G. (2005). La reprise retardée de fonction : Une complication fréquente, non résolue, en transplantation rénale. *Néphrologie & Thérapeutique*, 1(6), 325-334. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2005.08.003>

The MHC sequencing consortium. (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756), 921-923. <https://doi.org/10.1038/44853>

Tortora, G. J., & Grabowski, S. R. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie* (1er édition). DE BOECK SUP.

Urofrance | Chapitre 13—Transplantation d'organes—Urofrance. (s. d.). Consulté 7 mai 2023, à l'adresse <https://www.urofrance.org/lafu-academie/formation-du-college/referentiel-du-college-durologie-5eme-edition/chapitre-13-transplantation-dorganes/>

Wiebe, C., Pochinco, D., Blydt-Hansen, T. D., Ho, J., Birk, P. E., Karpinski, M., Goldberg, A., Storsley, L. J., Gibson, I. W., Rush, D. N., & Nickerson, P. W. (2013). Class II HLA Epitope Matching—A Strategy to Minimize De Novo Donor-Specific Antibody Development and

Improve Outcomes. *American Journal of Transplantation*, 13(12), 3114-3122.  
<https://doi.org/10.1111/ajt.12478>

Willicombe, M., Brookes, P., Sergeant, R., Santos-Nunez, E., Steggar, C., Galliford, J., Mclean, A., Cook, T. H., Cairns, T., Roufousse, C., & Taube, D. (2012). De Novo DQ Donor-Specific Antibodies Are Associated With a Significant Risk of Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy. *Transplantation*, 94(2), 172-177.  
<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182543950>

# **Annexes**

## Annexe N° 01 : Fiche de renseignements

CHU BENI-MESSOUS/ Hôpital Isaad Hassani  
Service d'immunologie médicale  
Chef de service : Prof. R. DIIDJIK  
Unité d'histocompatibilité et d'immunogénétique. Dr BERKANI L

### **Fiche de renseignements transplantation rénale**

#### **Partie réservée au receveur :**

Nom : Prénom : Age : Sexe :

Groupe sanguin : Adresse : Numéro de téléphone :

Lien de parenté avec le donneur : Médecin traitant :

Etiologie initiale de la maladie :

Date de début de la maladie :

Centre de dialyse :

**Si patient transplanté :** Date de la transplantation rénale : Lieu :

Reprise de la Diurèse :

**Bilan rénal actuel :** Créatininémie : DFG : Protéinurie :

**Traitement actuel :**

**FBR :** Date(s) :

Résultat(s) :

Retour en dialyse  Délai par rapport à la transplantation :

**Evènement(s) immunisant(s) :**

Transfusion sanguine (s) : Date(s) :

Grossesse(s) : Date(s) d'accouchement:

Transplantation antérieure : Date :

**Episodes Infectieux:** Date(s) :

**Sérologies infectieuses :**

**Examen(s) demandé(s) :**

Recherche des anticorps anti-HLA  Cross match  Typage HLA

Charge virale :  CMV  BKV  EBV Autres :

**Motif de la demande:**

CHU BENI-MESSOUS/ Hôpital Isaad Hassani  
Service d'immunologie médicale  
Chef de service : Prof. R. DJIDJIK  
Unité d'histocompatibilité et d'immunogénétique. Dr BERKANI L

**Partie réservée au donneur :**

Nom : Prénom : Age : Sexe :

Groupe sanguin : Lien de parenté avec le receveur :

Antécédents pathologiques :

Typage HLA (si déjà réalisé):

**Examen (s) demandé (s) :**

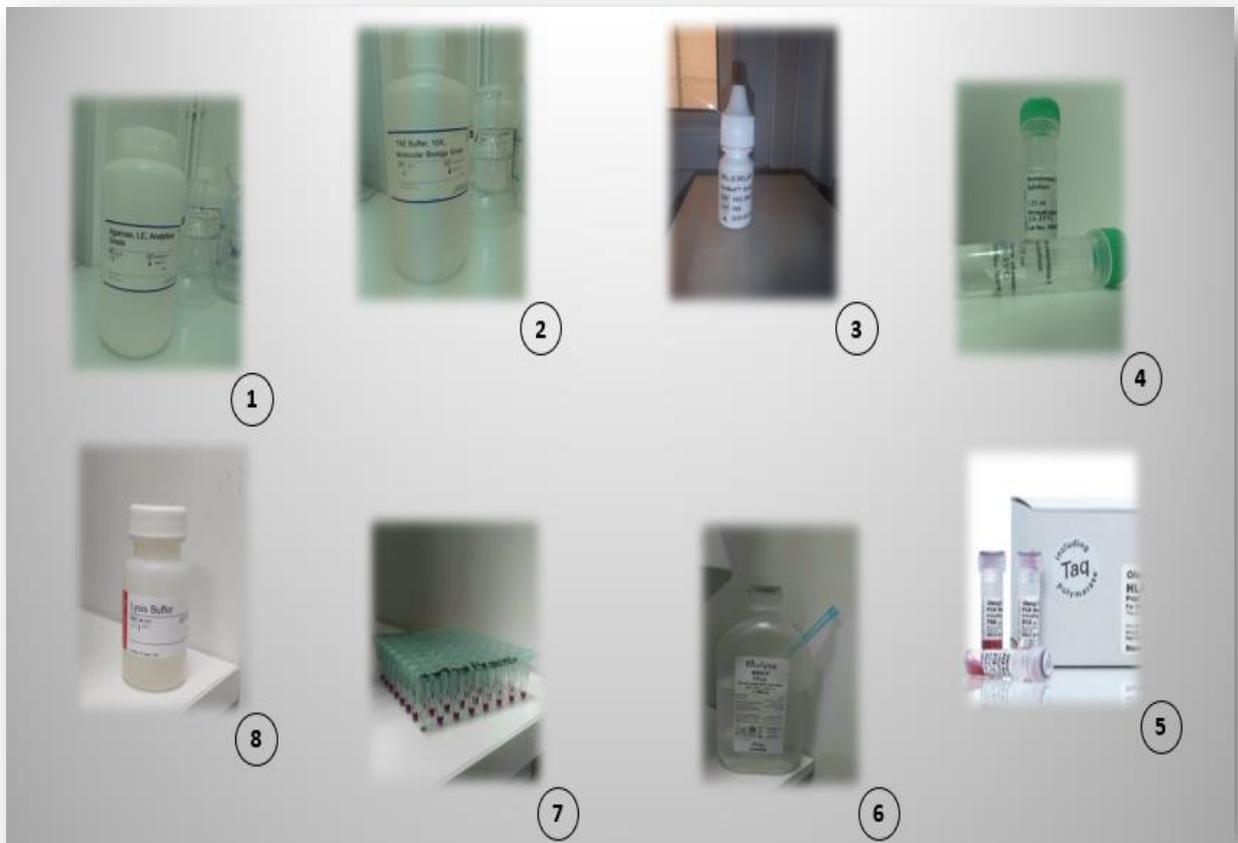
Cross match

Typage HLA

Autres :

## Annexe N° 02 : Matériel non biologique utilisé au laboratoire

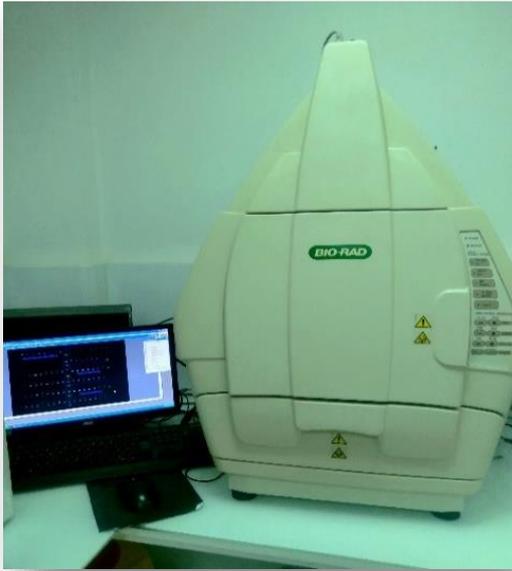
### Les réactifs pour l'extraction et le typage HLA par PCR-SSP



- 1- Agarose
- 2- Tampon TBE
- 3- Agent intercalant « GelRed® »
- 4- Tampon d'élution

- 5- Master Mix
- 6- Eau distillée sans nucléases
- 7- Plaque PCR
- 8- Solution de lyse

## Les appareillages



1- Capture de photo « Gel Doc XR Bio rad »

2- Thermocycleur





3- Micro-ondes

4- Bain marie





5- Vortex

6- Extracteur automatique d'acides nucléiques





7- Système d'électrophorèse des acides nucléiques (cuve + générateur électrique)

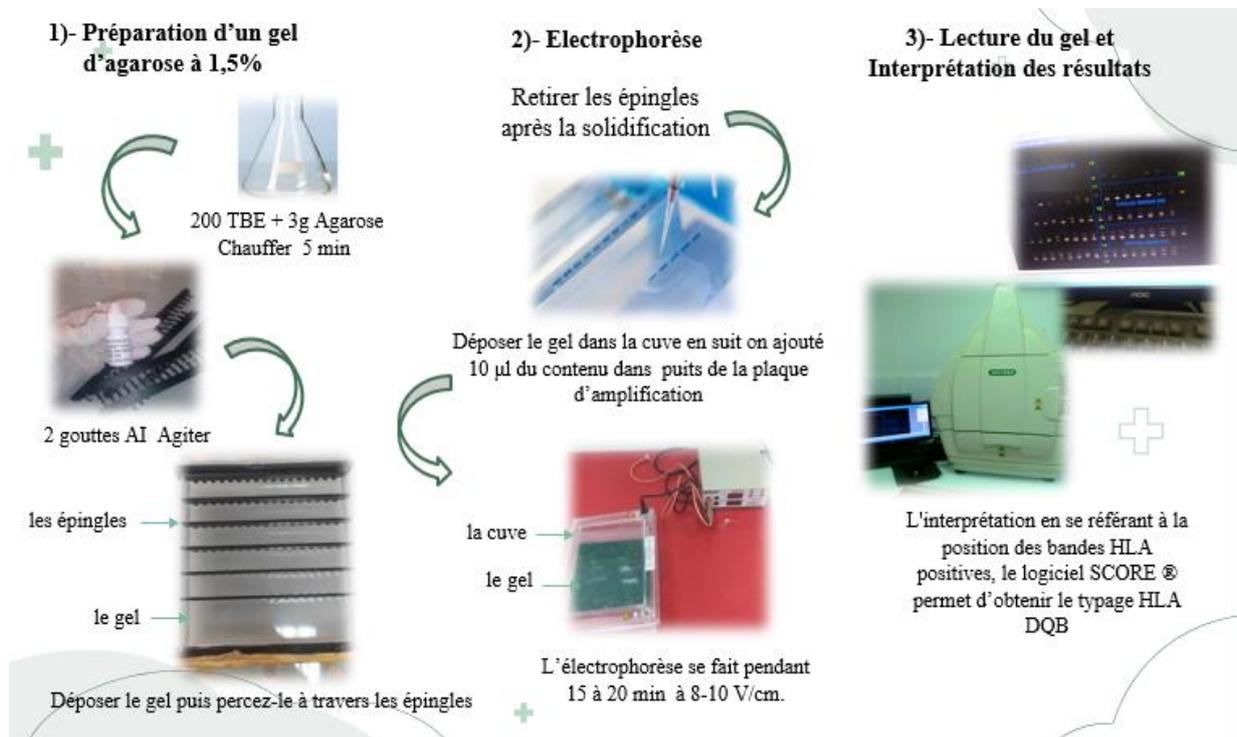
8- Micro centrifugeuse





9- Spectrophotomètre Nano Drop®

### Annexe N° 03 : Protocole opératoire d'électrophorèse sous forme diagramme



### Annexe N° 04 : Protocole opératoire de la PCR-SSO Luminex®

#### Amplification :

-Sortir le Master Mix du kit et laisser et revenir à T° ambiante (18°C- 30°C) .

-Préparer le nombre de tubes PCR requis (TUBE CORNING Immucor).

#### 1. Préparation de l'ADN

VORTEXER les ADN 10 à 20 s et déposer environ 40-100 ng dans chaque puits.

#### 2. Préparation d'un Mix par locus

➤ Mélange réactionnel :

- { Master Mix du locus 6 µl
- { Eau sans nucléase en fonction du volume ADN

« Préparation le mélange réactionnel en excès (N+1) à T° ambiante »

- Sortir la Taq du congélateur, Vortexer 10 s et déposer dans le Mix (0,2 µl/ 1U par puit)
  - Vortexer les Mix complet
  - Déposer le Mix complet dans les tubes contenant l'ADN (volume final de 20 µl)
3. Bien fermer les tubes pour éviter tout risque d'évaporation Mettre au thermocycleur immédiatement et s'assurer que les tubes PCR touchent le couvercle du thermocycleur, sinon placer un ou deux pressure pad(s).
4. Placer les échantillons dans le thermocycleur puis lancer le programme d'amplification (s'assurer que le ram speed est à 3,9 C/S pour toutes les étapes et que le LID est à 97°C).

<b>1 CYCLE</b>	<b>3 min à 95°C</b>
<b>12 CYCLES</b>	<b>15 sec à 95°C</b>
	<b>30 sec à 60°C</b>
	<b>30 sec à 72°C</b>
<b>28 CYCLES</b>	<b>10 sec à 95°C</b>
	<b>30 sec à 63°C</b>
	<b>30 sec à 72°C</b>
<b>1 CYCLE</b>	<b>2 min à 72°C</b>
	<b>Infini à 4°C</b>

### **Hybridation :**

Activer les tampons de dilution avant leur première utilisation : 5 minutes à 45°C au bain-marie. Puis stockez-les à température ambiante (18°-20°C)

- Démarrer le Luminex ou relancer le Warm Up

- Préchauffer les tubes de billes au bain marie entre 55 et 60°C pendant 5 à 10 minutes
- Vortexer les billes 30 sec
- Distribuer 5 µl du produit de PCR par puits dans une plaque costar
- Ajouter 15 µl de billes dans chaque puit. Vortexer les billes tous les 8 puits.
- Recouvrir la plaque avec un film thermorésistant (Costra/Immucor), placez la dans le thermocycleur  
Ajouter deux ou trois pressure pad (s).
- Lancer le programme d'hybridation  
S'assurer que le Ramp Speed est 3,9C/S pour toutes les étapes LID à 97°C



Pendant thermocycleur :

Préparation la dilution de la SA-PE (n+1) :

Par puits 170 µl de tampon de dilution + 0,85 µl de streptavidin-pe

Après thermocycleur :

Laisser la plaque dans le thermocycleur à 56°C et distribuer la SA-PE dilue dans les 5 minutes suivant la fin du cycle

### **Lecture et interprétation :**

1. Retirer la plaque du thermocycleur, et placer la dans le Luminex
2. Lancer la lecture
3. Interprétation des résultats à l'aide du logiciel Match it DNA®