



UNIVERSITE MOHAMMED V, RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE



CENTRE D'ETUDES DOCTORALES DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

ANNEE : 2017

N° de thèse : 15/17 CSVS

Thèse de Doctorat

Présentée par

Asmae ZERROUKI

Formation doctorale : biologie médicale, pathologie humaine et expérimentale et environnement

**Greffe rénale : évaluation des traitements des sérums pour
baisser la valeur de la bille contrôle négatif au cours du
screening des anticorps anti-HLA**

Présentée et soutenue publiquement le 23/11/2017, devant le Jury composé de

Pr BAYAHIA Rabia	Université Mohammed V de Rabat, FMPR	Président
Pr ESSAKALLI Malika	Université Mohammed V de Rabat, FMPR	Directeur de thèse
Pr NAYA Abdellah	Université Hassan II de Casablanca, FSC	Rapporteur
Pr HADEF Rachid	Université Mohammed V de Rabat, FMPR	Rapporteur
Pr ZRARA Abdelhamid	Université Mohammed V de Rabat, FMPR	Rapporteur
Pr EL KABBAJ Driss	Université Mohammed V de Rabat, FMPR	Examineur
Pr BENSEFFAJ Nadia	Université Mohammed V de Rabat, FMPR	Examineur

Dédicace

A mes parents

Aucune dédicace, aucun acte, ne saurait exprimer le dévouement et l'amour que je vous porte. Puisse Dieu vous accorder la santé, le bonheur et une longue vie.

Rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et mon bien être.

Veillez trouver en ce travail, qui est aussi le vôtre, l'expression de ma profonde reconnaissance, mon respect et mon estime.

A mon cher frère

J'admire en toi ta générosité, ta sympathie et ton esprit de famille. Je te souhaite un grand succès et du bonheur dans ta vie. Merci d'être à mes côtés.

A mes amies et mes collègues

Vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Remerciement

En premier lieu, je tiens à remercier notre Dieu qui nous a donné la force, la santé et la volonté pour accomplir ce travail.

Mes sincères remerciements Professeur Malika ESSAKALLI, vous avez accepté d'encadrer ce travail malgré vos obligations professionnelles. Pour m'avoir fait entrer dans le monde du HLA, transmis votre passion et votre savoir. Pour m'avoir fait confiance durant ces quatre années. Vos conseils et votre gentillesse m'ont été considérablement précieux. Vous m'avez toujours réservé un accueil chaleureux. Je suis très heureuse de pouvoir exprimer mes profondes gratitude pour tous les efforts que vous avez déployés afin que ce travail puisse aboutir. Merci Madame pour votre grande disponibilité, sincère reconnaissance.

Je remercie infiniment Dr Sanae OUADGHIRI, pour les discussions scientifiques enrichissantes et ses encouragements, ses précieuses connaissances dans le domaine, la rigueur de son raisonnement, ses conseils et orientation m'ont été d'une grand aide pour mener à bien ce travail. Merci Madame, sincère reconnaissance.

Je remercie Dr Nadia BENSEFFAJ pour ses encouragements, ses conseils et orientation, Merci Madame, sincère reconnaissance.

Je remercie les techniciennes du laboratoire HLA pour leur engagement, leur aide et leurs encouragements. Sans vous, ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Je remercie le Professeur BAYAHIA Rabia, professeur de néphrologie, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, hommage respectueux.

Je remercie mon maitre le Professeur Essakalli Malika, Professeur d'immunologie et Chef de servie de transfusion sanguine, immunologie et banque de tissus du CHU Ibn SINA de Rabat, qui m'a fait un grand honneur d'accepter d'encadrer la thèse.

Je souhaite remercier les rapporteurs qui ont accepté de juger ce travail. Merci aux Professeur Zrara Abdelhamid, professeur NAYA Abdellah et le professeur HADEF Rachid. Je suis très reconnaissante de votre implication pour évaluer le travail et je vous remercie de vos commentaires et de l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Je remercie infiniment le professeur EL KABBAJ Driss et le professeur BENSEFFAJ Nadia qui m'ont fait l'honneur d'examiner mon travail. Je suis très reconnaissante de votre implication et de l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Cette thèse a fait l'Objet de plusieurs articles :

Articles:

Zerrouki A, Ouadghiri S, Benseffaj N, Razine R, Essakalli M. Reason and Resolution of High Negative Control Beads in Solid-Phase Immunoassay. *Exp Clin Transplant*. 2017; 0239

Zerrouki A, Ouadghiri S, Benseffaj N, Razine R, Essakalli M. High background in Luminex® assay for HLA antibody screening: Interest of Adsorb Out™. *Transpl Immunol*. 2016; 36:20-24

Benseffaj N, Ouadghiri S, Bourhanbour AD, **Zerrouki A**, Essakalli M. Cytotoxicity of natural anti-HLA antibodies in Moroccan patients awaiting for kidney transplantation. *Nephrol Ther*. 2017; 13(1):26-29

Sommaire

I-Introduction.....	1
II-Les anticorps anti-HLA	2
II-1- Rôle des anticorps anti-HLA dans la greffe rénale	2
II-1-1- Les anticorps préformés	3
II-1-2- Les anticorps néoformés.....	4
II-2- Techniques de recherche des anticorps anti-HLA.....	5
II-2-1- Lymphocytotoxicité complément dépendante (LCT)	5
II-2-2- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	6
II-2-3- Technologie luminex.....	7
II-3- Traitement des sérums avant la recherche d'anticorps.....	9
II-3-1-Adsorb-Out	9
II-3-2- Dithiothreitol	9
II-3-3- Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA).....	11
II-3-4- Dilution	12
II-3-5- Dialyse Hypotonique.....	12
III-Les objectifs de notre étude.....	13
IV- Matériels et méthodes	14
IV-1- Sérums	14
IV-2- Recherche des anticorps anti HLA	14
IV-3- Traitements des sérums avec une MFI élevée de la BCN	21
IV-3-1- Traitement par Adsorb-Out	22
IV-3-2- Traitement par DTT	22
IV-3-3- Traitement par EDTA	22
IV-4- Données pathologiques et médicamenteuses des patients	22
IV-5- Analyse statistique.....	23
V- Résultats	24
V-1- Traitement des sérums par le réactif Adsorb-Out	24
V-1-1- Médiane de MFI de la BCN avant traitement par l'Adsorb-Out.....	24

V-1-2- Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCN	25
V-1-3- Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCP	27
V-2- Traitement des sérums par le réactif Adsorb-Out, DTT et EDTA.....	28
V-2-1- Effet de l'Adsorb-Out, DTT et EDTA sur la valeur de MFI de la BCN	28
V-2-2- Association entre la valeur de MFI de la BCN et les caractéristiques des patients.....	30
V-2-3- Effet de l'Adsorb-Out, DTT et l'EDTA sur la valeur de MFI de la BCP	32
VI- Discussion.....	34
VII- Conclusion et perspective.....	37
VIII- Références	41
IX- Annexes	50

Liste des figures

Figure 1 : Carte de la région chromosomique du CMH

Figure 2 : Technique de Lymphocytotoxicité complément dépendante

Figure 3 : Principe de la technique ELISA

Figure 4 : Principe de screening des anticorps anti-HLA par la technologie Luminex

Figure 5 : Compétition entre les immunoglobulines IgG et IgM au cours du screening des anticorps anti-HLA.

Figure 6 : Structure de la molécule C1

Figure 7 : Mécanisme d'action du C1 au cours du screening des anticorps anti-HLA

Figure 8 : Screening des anticorps anti-HLA par le kit LaBScreen Mixed

Figure 9 : Plateforme Luminex x MAP 200

Figure 10 : Les lasers qui excitent les fluorochromes incorporés dans les billes et la phycoérythrine couplées à l'anti-IgG de détection

Figure 11 : Combinaison de 10 niveaux de concentrations de fluorochrome rouge et de 10 niveaux de fluorochrome infra-rouge

Figure 12 : Les détecteurs photodiodes de la technologie Luminex

Figure 13 : Le nuage de billes observé lors de l'acquisition par la technologie Luminex

Figure 14 : Procédure adoptée devant une valeur élevée de MFI de la BCN au cours du LaBScreen Mixed

Figure 15 : Principe de la recherche des ANA par Immunofluorescence indirecte

Figure 16 : Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCN (N=98)

Figure 17 : Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCP

Figure 18 : Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCN (N=104)

Figure 19 : Effet du DTT sur la valeur de MFI de la BCN

Figure 20 : Effet de l'EDTA sur la valeur de MFI de la BCN

Figure 21 : Effet de l'Adsorb-Out, du DTT et de l'EDTA sur la valeur de MFI de la BCP

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des patients (N=166) dont les sérums présentent une valeur élevée de MFI de la BCN sur LaBScreen mixed

Tableau 2 : Valeur de MFI de la BCN des sérums non traités en fonction du sexe, des événements d'immunisation et de la durée de stockage

Tableau 3 : Valeur de MFI de la BCN des sérums traités par l'Adsorb-Out en fonction du sexe et des événements d'immunisation

Tableau 4 : Corrélation logistique des sérums traités par l'Adsorb-Out au cours du LaBScreen Mixed

Tableau 5 : Valeur de MFI de la BCN des sérums non traités et de ceux traités au cours du LaBScreen Mixed

Tableau 6 : La comparaison entre les sérums des patients et des témoins en fonction de la néphropathie, des ANA et du traitement reçu

Tableau 7 : Valeur de MFI de la BCP des sérums non traités et des sérums traités sur LaBScreen Mixed

Liste des abréviations

ANA : anticorps anti-nucléaire

BCN : bille contrôle négatif

BCP : bille contrôle positif

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellules présentatrices d'antigène

DSA : donor specific antibody

DTT: dithiothreitol

EBV: virus Epstein-Barr

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EFI : fédération européenne d'immunogénétique

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

HLA : human Leucocyte Antigen

IFI : immunofluorescence indirecte

IgG : immunoglobulines G

IgM : immunoglobulines M

IRCT : insuffisance rénale chronique terminale

LCT : lymphocytotoxicité complément dépendante

MFI : intensité moyenne de fluorescence

I-Introduction

La transplantation rénale est le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) du côté médical et économique [1-4]. Elle a comme principe l'introduction chez l'insuffisant rénal d'un rein génétiquement différent entraînant une réaction immunitaire qui peut être à l'origine de l'altération de la fonction du greffon et par la suite sa destruction [5]. Le défi dans la transplantation rénale est d'éviter le rejet de greffe en mettant en œuvre tous les moyens qui permettent de traiter mais surtout de prévenir ce rejet.

La stratégie de prévention du rejet de greffe repose essentiellement sur la recherche de la meilleure compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur, sur le suivi immunologique pré et post greffe et sur l'utilisation des immunosuppresseurs. Le laboratoire d'histocompatibilité réalise un bilan immunologique de façon systématique permettant de préparer les patients à la greffe rénale et de les surveiller en post greffe. Ce bilan comprend le typage HLA (Human Leucocyte Antigen), la recherche régulière des anticorps anti-HLA et le cross match lymphocytaire [6,7]. Le typage HLA se fait chez le donneur et le receveur afin d'établir ou non une compatibilité tissulaire [8]. Il peut être réalisé soit par une méthode sérologique, qui permet d'identifier les antigènes HLA exprimés à la surface des cellules, soit par une méthode de biologie moléculaire, qui recherche les allèles qui codent pour ces antigènes [10]. La recherche des anticorps anti-HLA comprend deux étapes : une première étape de dépistage qui permet de détecter la présence ou l'absence des anticorps anti-HLA, suivie d'une identification en cas de positivité pour déterminer la spécificité des anticorps [11, 12, 13]. La recherche de ces anticorps a permis d'améliorer la qualité de vie des transplantés rénaux vu l'impact des anticorps anti-HLA sur la survie du greffon. La recherche des anticorps anti HLA peut être réalisée par plusieurs techniques de sensibilités et de spécificités différentes [13]. Au laboratoire d'immunologie du Centre Hospitalier Ibn Sina de Rabat, la technologie Luminex a été adoptée pour le dépistage et l'identification de ces anticorps.

Le but de ce travail est d'essayer de résoudre la problématique posée par une recherche d'anticorps anti HLA par Luminex invalide à cause de la valeur élevée de la bille négatif contrôle. En effet, dans cette technique, pour chaque sérum à tester, il y a une bille négatif contrôle et une bille positif contrôle. Les valeurs seuils de ces billes sont déterminées par le fournisseur. Lorsque ces seuils ne sont pas respectés l'analyse n'est pas valide et aucun

résultat ne peut être donné. Ce travail consiste à étudier l'effet du traitement, par différents produits, des sérums qui ont présenté une recherche d'anticorps anti HLA invalide, car la valeur de la bille négatif contrôle est élevée.

II-Les anticorps anti-HLA

II-1- Rôle des anticorps anti-HLA dans la greffe rénale

Les anticorps anti-HLA sont des anticorps qui apparaissent suite à un événement immunisant tel qu'une grossesse, une transfusion, un avortement ou une transplantation antérieure [14]. Ces anticorps sont dirigés contre les antigènes HLA de classe I et/ou de classe II qui sont des glycoprotéines de la surface cellulaire. Les antigènes HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) sont présents sur l'ensemble des cellules nucléées. Les antigènes HLA de classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) sont restreints aux cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B), aux lymphocytes T activés, aux précurseurs hématopoïétiques, aux cellules épithéliales thymiques et aux cellules endothéliales [15]. Les antigènes HLA sont codés par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui sont localisés sur le bras court du chromosome 6. Le CMH comprend trois régions. Deux régions codantes pour les molécules HLA, régions I et II, et une troisième région comprenant un ensemble de gènes codant pour un certain nombre de molécules de régulation de l'immunité (figure 1).

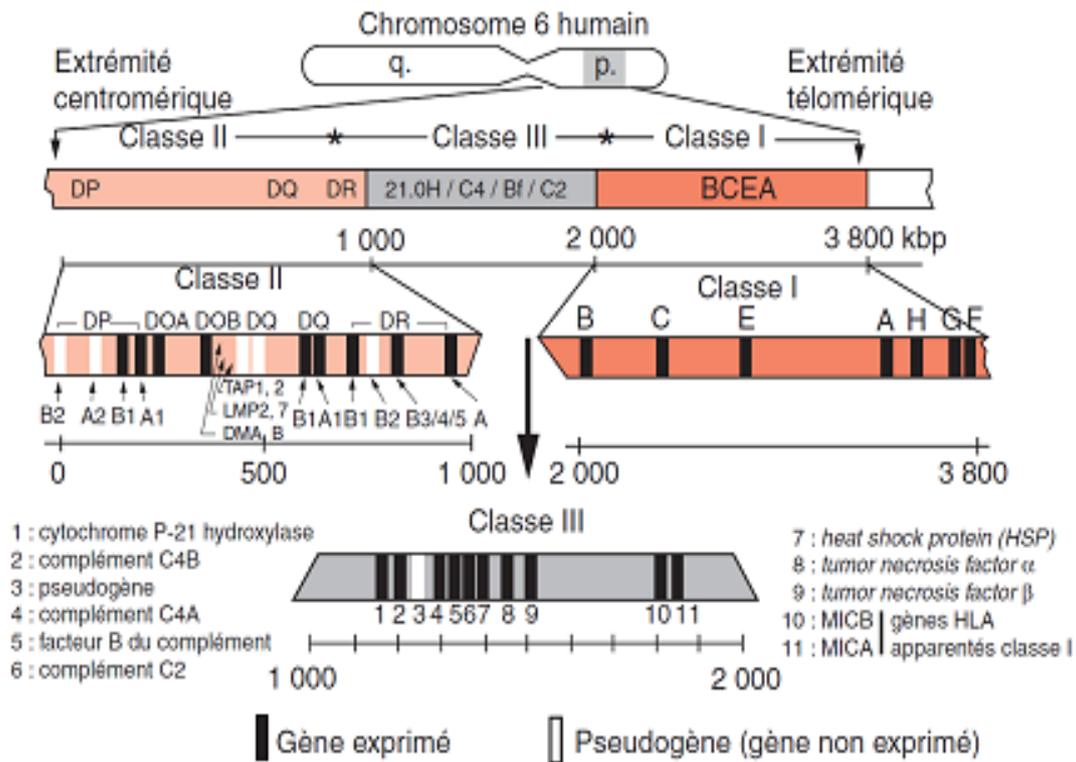


Figure 1 : Carte de la région chromosomique du CMH [16].

Les gènes du CMH sont les plus polymorphes du génome humain : 16933 allèles ont été décrits jusqu'en mars 2017 [17]. Ce polymorphisme suggère qu'il a été soumis à une pression évolutive intense et un taux de mutations supérieur à n'importe quelle autre région du génome [18, 19]. Le polymorphisme du système HLA implique que les antigènes HLA exposent des acides aminés différents au niveau de certaines positions de leur surface. Ces sites de variabilité constituent la cible des anticorps anti-HLA. Il existe des antigènes HLA qui possèdent des épitopes partagés entre eux. Ces épitopes partagés sont à l'origine de la synthèse d'anticorps réactifs vis-à-vis d'autres antigènes que le receveur n'aura pas rencontrés [20-22].

Les anticorps anti-HLA sont de deux types : les anticorps préformés et les anticorps néoformés.

II-1-1- Les anticorps préformés

Ce sont des anticorps extrêmement puissants et qui sont à l'origine du rejet hyper-aigu [23]. Ce type de rejet survient dans les minutes ou les heures qui suivent la transplantation. Lors de la revascularisation du greffon, les anticorps préformés se fixent sur le greffon et induisent

une thrombose des artères avec une nécrose hémorragique du greffon nécessitant la dé-transplantation en urgence [24, 25]. Le rejet hyper-aigu est devenu rare depuis la réalisation systématique de la recherche des anticorps anti-HLA et le cross-match lymphocytaire. Plus le patient est immunisé plus difficile est la recherche du donneur compatible ne possédant pas les antigènes HLA correspondants à ces anticorps. Chez certains patients hyperimmunisés, le nombre d'anticorps est tellement élevé qu'il est plus simple de résonner en antigènes acceptables. Ce sont les antigènes contre lesquelles le receveur n'est pas immunisé. Plus le taux des anticorps anti-HLA est élevé avant la greffe plus la survie du greffon est courte [26]. Lefaucheur et al ont montré que chez 400 patients transplantés rénaux, la survie des greffons à 8 ans était significativement inférieure en présence d'anticorps anti-HLA spécifique du donneur (DSA) comparée à celle des patients non immunisés et des patients porteurs d'anticorps anti-HLA non dirigés contre le greffon [27]. Une méta-analyse, incluant sept études de cohortes rétrospectives totalisant plus de 1100 patients, a montré que la présence de DSA préformés isolés doublait le risque de rejet humoral et augmentait le risque de perte du greffon [28]. Ces travaux ont été confirmés par de nombreuses autres études [29-31].

II-1-2- Les anticorps néoformés

Ce sont des anticorps anti-HLA qui apparaissent après la transplantation. Ils sont essentiellement des DSA. La présence de DSA est souvent associée à un rejet humoral aigu [32]. Le rejet humoral aigu survient dans les trois ou quatre premiers mois après la greffe, avec un pic de fréquence le premier mois. Son mécanisme relève d'une cytotoxicité principalement humorale. Les lymphocytes du receveur s'activent, prolifèrent et attaquent les cellules du greffon, soit directement, soit par l'intermédiaire des anticorps. Il est défini par la présence spécifique des DSA, par des lésions histologiques (nécrose tubulaire aiguë, dilatation des capillaires péri-tubulaires, atteinte glomérulaire, thrombose, artérite), et un marquage C4d des capillaires péri tubulaires positif [32-37].

Les DSA néoformés peuvent survenir à n'importe quel moment après la transplantation [38]. Leur incidence est de 15 à 30% à 10 ans [39, 40]. Leur présence témoigne d'une immunosuppression insuffisante, soit parce que le patient nécessite intrinsèquement un traitement plus lourd que le traitement « standard » pour contrôler son immunité humorale, soit parce que l'immunosuppression a été diminuée en raison de complications infectieuses, tumorales, soit d'une mauvaise observance thérapeutique [41, 42]. La valeur pronostique péjorative de ces anticorps a bien été mise en évidence notamment par Wiebe et al qui ont

montré que les patients porteurs de DSA de novo ont une survie à 10 ans inférieure à celle des patients sans DSA (59% versus 96%) [39, 40, 43-47]. Supon et al ont signalé que 80% des patients qui ont développé des DSA néoformés ont subi un rejet aigu ou chronique. Cependant, ces anticorps peuvent ne pas provoquer un rejet irréversible, car la majorité de ces patients ont conservé des greffes fonctionnelles entre 2 ans et 7 ans plus tard [48]. Par ailleurs, il semblerait que les DSA de novo ont une valeur pronostique plus péjorative que les DSA préformés [49].

Tous les anticorps anti-HLA qu'ils soient de novo ou préformés, DSA ou non DSA ne sont pas forcément à l'origine d'un rejet. Plusieurs études ont montré que ces anticorps anti-HLA pour être néfastes doivent être capables d'activer le complément [50, 51]. Cette activation du complément se fait par le biais du C1q [52]. Ces anticorps sont des anticorps cytotoxiques.

Bien que les anticorps anti-HLA n'apparaissent qu'après des épisodes d'immunisation (transfusion, grossesse, avortement, transplantation antérieure), plusieurs équipes ont observé la présence d'anticorps anti-HLA chez des patients hommes jamais immunisés. Ces anticorps sont appelés des anticorps naturels [53, 54].

II-2- Techniques de recherche des anticorps anti-HLA

Plusieurs techniques ont été développées pour la recherche des anticorps anti-HLA. La première technique est la lymphocytotoxicité complément dépendante (LCT) qui a été largement utilisée et considérée comme une technique de référence depuis la fin des années 1960 [55]. Progressivement, des techniques plus sensibles sont apparues au début des années 1990 telle que l'enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) et récemment la technologie Luminex [17].

II-2-1- Lymphocytotoxicité complément dépendante (LCT)

Cette technique, peu sensible, met en évidence seulement les anticorps fixant le complément (IgG 1, 3, et IgM) sur un panel de lymphocytes : lymphocytes totaux pour les anticorps de classe I, lymphocytes B pour les anticorps de classe II (Figure 2). Ces lymphocytes B sont peu nombreux dans le sang et expriment les antigènes HLA de classe I et II, si bien qu'en présence d'anticorps de classe I, ces derniers doivent être éliminés du sérum testé par adsorption sur un mélange de plaquettes. Ainsi, la mise en œuvre de la recherche des

anticorps en LCT s'avère lourde et délicate, surtout pour les anticorps anti-HLA de classe II [56].

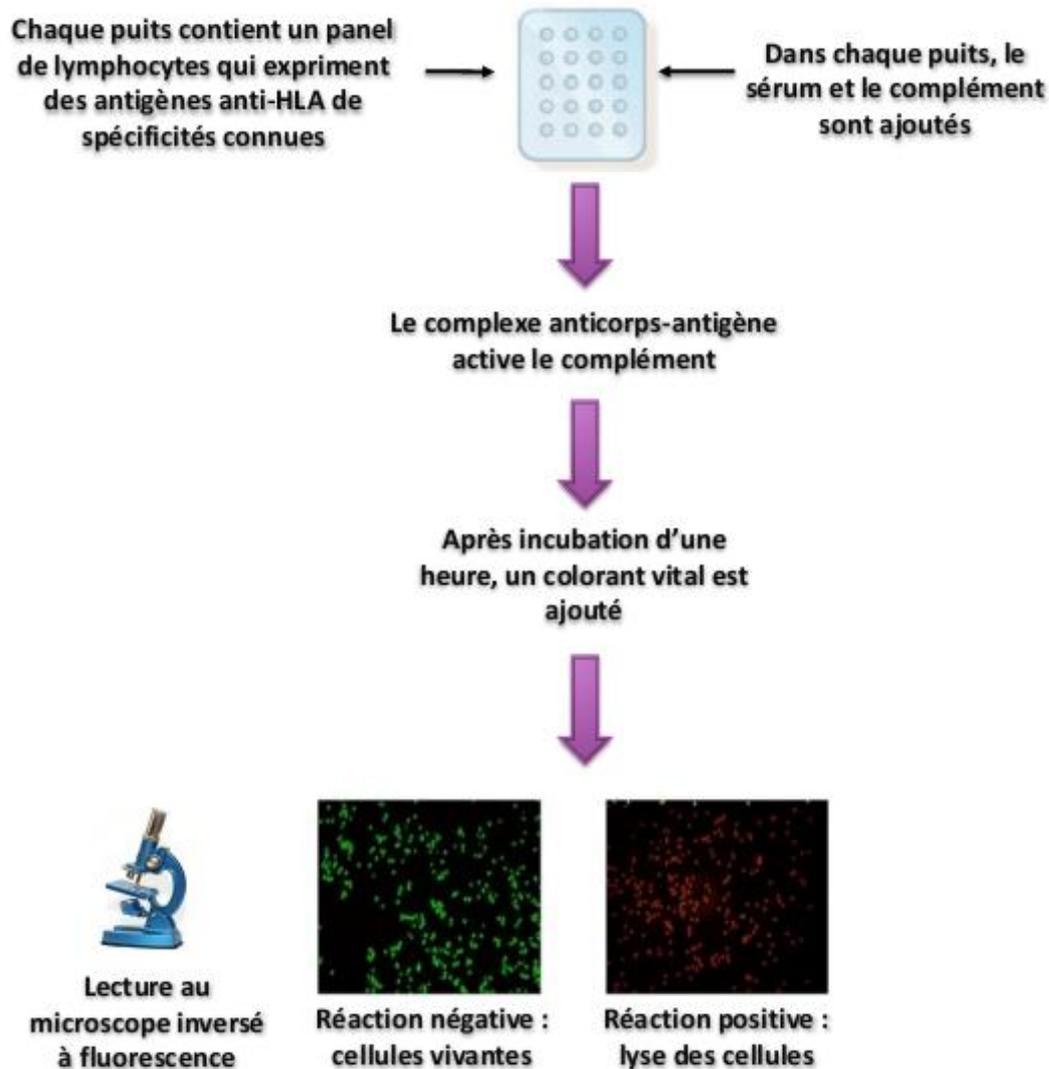


Figure 2 : Technique de Lymphocytotoxicité complément dépendante

II-2-2- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

La recherche des anticorps anti-HLA par ELISA est réalisée sur des plaques de Terasaki dont les puits sont recouverts d'antigènes HLA purifiés à partir de lignées cellulaires B transformées par le virus Epstein-Barr (EBV). La fixation spécifique des anticorps anti-HLA présents dans le sérum à tester est révélée après incubation avec le conjugué (anti-IgG couplée à une enzyme) (Figure 3). La réaction antigène-anticorps est visualisée grâce à une réaction colorée produite par l'action de l'enzyme sur son substrat. L'appréciation de la coloration

obtenue est effectuée à l'aide d'un lecteur ELISA spécifique à une longueur d'onde de 630 nm. La réaction enzymatique rend l'ELISA dépendante de la température et du pH [57].

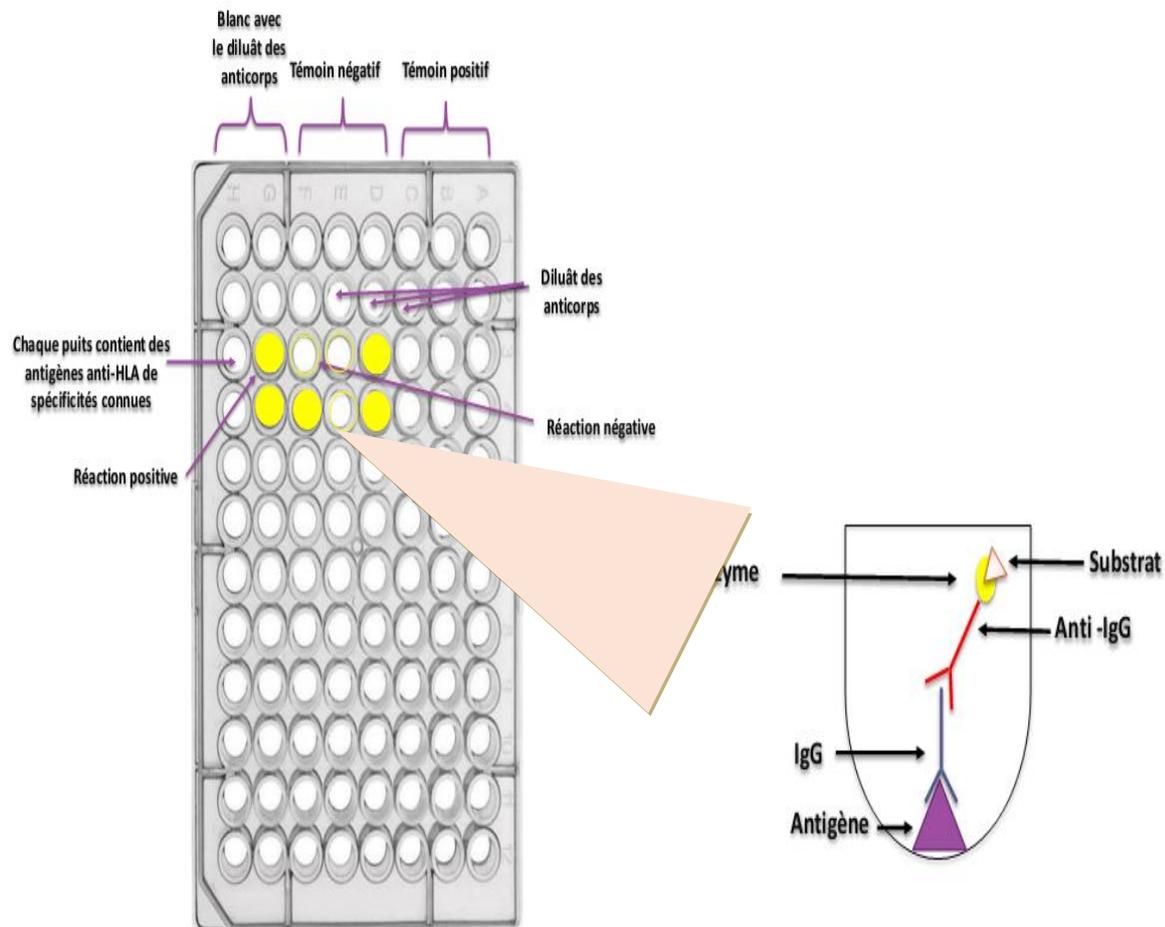


Figure 3 : Principe de la technique ELISA

II-2-3- Technologie luminex

La technologie Luminex est une technique en phase solide fondée sur le principe de la cytométrie de flux. En comparaison avec l'ELISA, la technologie Luminex est simple, rapide et reproductible [58], mais requiert un équipement plus coûteux [59]. La sensibilité de cette technique est comparable à celle d'un test ELISA [60] ou meilleure [61] selon les études. En comparaison avec la technique de cytométrie en flux classique, elle se montre d'une sensibilité équivalente, mais d'une meilleure spécificité [62].

La technologie Luminex utilise des microbilles fluorescentes en polystyrène (latex) recouvertes d'antigène HLA purifiés et une double lecture après excitation par deux faisceaux de laser (figure 4).

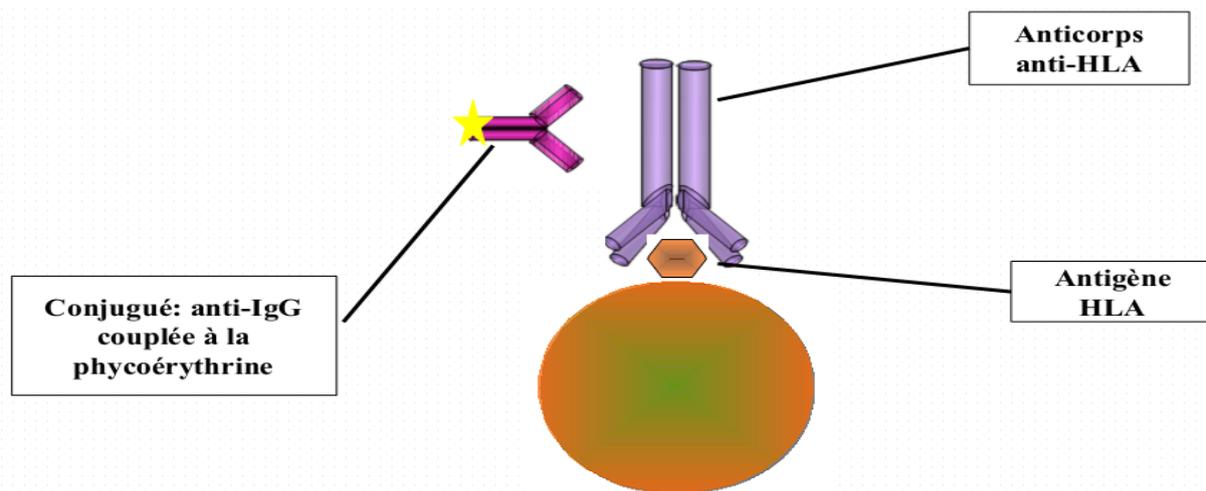


Figure 4 : Principe de screening des anticorps anti-HLA par la technologie Luminex

Deux types de billes existent pour la recherche des anticorps anti-HLA : les billes de dépistage qui portent plusieurs antigènes HLA à leurs surfaces et les billes d'identification recouvertes d'une seule spécificité HLA. Ces billes constituent un panel porteur de plus de soixante spécificités de classe I et de plus de vingt spécificités de classe II. Lors du mélange du sérum avec les billes, les anticorps IgG présents dans le sérum des patients se fixent sur les antigènes correspondants à la surface des billes. La réaction est révélée par une anti IgG couplée à la phycoérythrine (anticorps de détection ou conjugué) et le résultat est exprimé en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI). Ce panel de billes contient aussi une bille contrôle négative (BCN) et une bille contrôle positive (BCP). La BCN est une bille qui ne porte aucun antigène HLA à sa surface. La MFI de cette bille doit être inférieure à un seuil déterminé par le fournisseur. Une MFI au-delà de ce seuil reflète une fixation non spécifique à la BCN. Contrairement à la BCN, la BCP est cotée par les fragments cristallisables (Fc) d'immunoglobulines d'isotype IgG [63]. La MFI détectée à sa surface doit être supérieure à un seuil déterminé par le fournisseur. La BCP permet de vérifier la qualité et la stabilité du conjugué couplé à la phycoérythrine [64]. Les valeurs des MFI de ces deux billes constituent des critères de la validation technique au cours de la recherche des anticorps anti-HLA. D'autre part, la MFI de la BCN est utilisée pour calculer le ratio de fluorescence à la surface des autres billes selon la formule suivante :

Ratio normalisé =

$$\frac{\text{MFI de la N bille} - \text{MFI de la BCN}}{\text{MFI de la N bille du sérum négatif} - \text{MFI de la BCN du sérum négatif}}$$

II-3- Traitement des sérums avant la recherche d'anticorps

Au cours de la recherche des anticorps anti-HLA par la technique luminex, la BCN de certains sérums présente une valeur élevée de la MFI du fait qu'ils contiennent des éléments qui interfèrent avec les anticorps anti-HLA d'isotype IgG ou avec les anticorps de détection anti-IgG. Ces éléments peuvent être des substances affines pour le latex des billes réactifs, des IgM ou du complément. Afin de diminuer ou d'éliminer ce bruit de fond, les sérums peuvent être traités avant la recherche d'anticorps par le réactif «Adsorb-Out», le Dithiothreitol (DTT), l'Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA), la dilution ou la dialyse hypotonique [65-71].

II-3-1-Adsorb-Out

L'augmentation de la MFI de la BCN peut être due à la fixation non spécifique sur les billes de latex de substances contenues dans le sérum. Malgré les lavages ces substances ne peuvent plus être détachées des billes et donnent un bruit de fond. L'adsorb-Out permet de diminuer ou d'éliminer cette fixation. C'est un prétraitement des sérums, composé de microparticules sans revêtement antigénique spécifique traité avec une solution de blocage [71]. Lorsque l'Adsorb-Out est mélangé au sérum, les microparticules attirent et fixent de façon irréversible les substances sériques qui ont une affinité aux latex. Ces substances sont entièrement éliminées lorsque la dose de l'Adsorb-Out utilisée est suffisante [72]. Dans certains cas, il est nécessaire de traiter le sérum plusieurs fois par l'Adsorb-Out.

II-3-2- Dithiothreitol

Le Dithiothreitol (DTT), à des concentrations précises, détruit les ponts disulfures des chaînes lourdes mu des immunoglobulines M (IgM). Plusieurs équipes ont traité leurs sérums par du DTT lorsque la valeur de la MFI de la BCN était élevée [65,66]. Ces équipes évoquent la présence, dans ces sérums, d'anticorps anti-HLA d'isotype IgM qui se fixent sur les billes et empêchent les anticorps anti-HLA d'isotype IgG de s'y fixer. Ces derniers sont éliminés aux lavages. L'anti-IgG couplée à la phycoérythrine ne peut reconnaître les IgM. Cet environnement et son affinité pour le latex composant les billes favorisent la fixation de l'anti-IgG couplée à la phycoérythrine sur la BCN (Figure 5) [71].

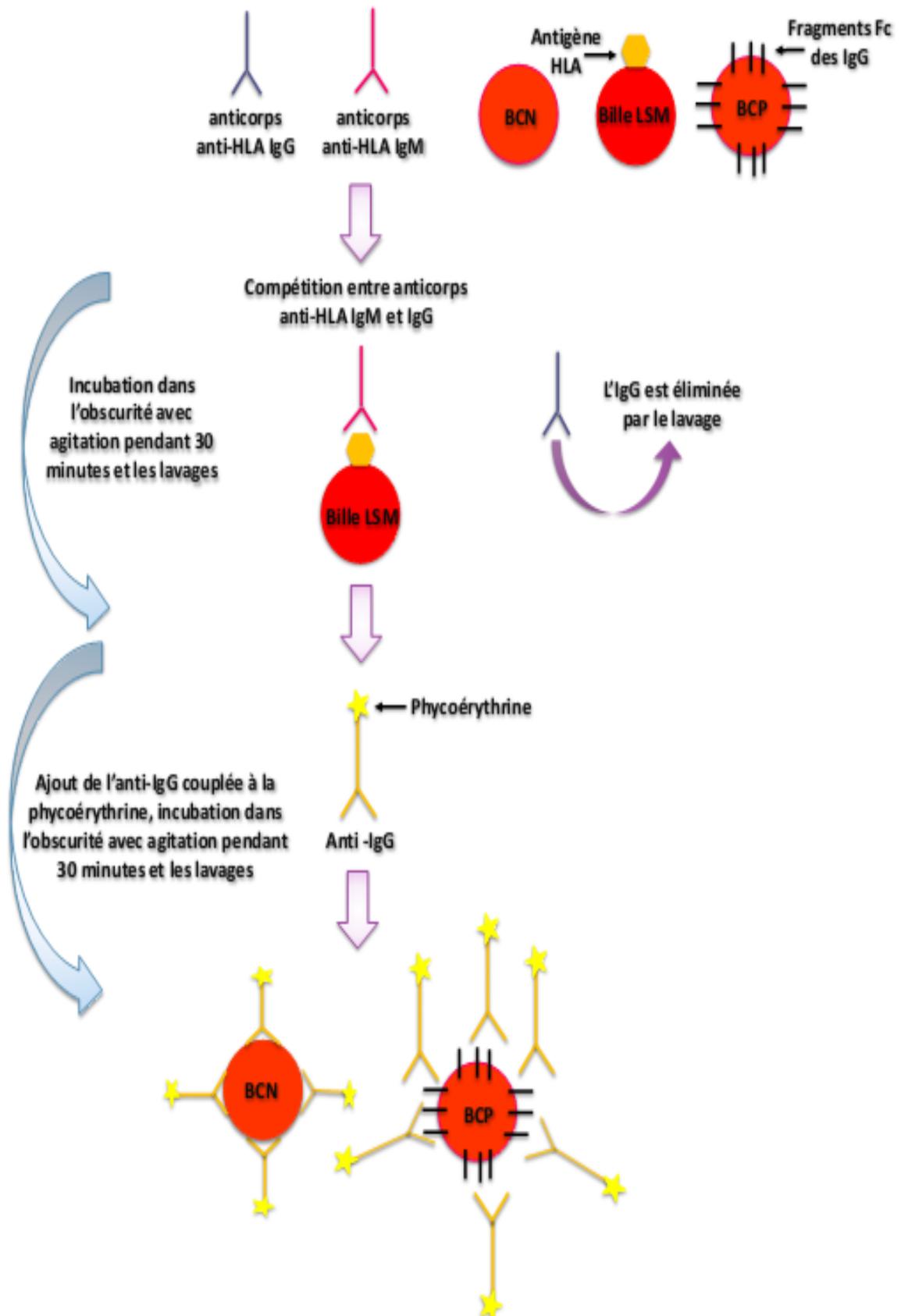


Figure 5 : Compétition entre les immunoglobulines IgG et IgM au cours du screening des anticorps anti-HLA.

II-3-3- Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA)

L'EDTA est un chélateur de calcium (Ca^{2+}). Certaines équipes traitent les sérums de leurs patients avec l'EDTA pour diminuer la MFI de la bille négatif contrôle [69, 70]. Ces équipes décrivent le rôle de la fraction 1 du complément "C1" dans ce phénomène. En effet, le Ca^{2+} est indispensable à la formation du premier fragment du complément (C1). Le C1 est un complexe macromoléculaire, constitué d'une molécule C1q et de deux molécules de C1r et C1s. Ces molécules sont maintenues ensemble en un complexe C1qr2s2 stabilisé par du Ca^{2+} . Le C1q est formé d'un bras à l'extrémité N-terminale impliqué dans la liaison aux dimères C1r-C1s et de têtes globulaires à l'extrémité C-terminale intervenant dans la liaison au deuxième domaine constant de la chaîne lourde (CH2) des IgM et des IgG (Figure 6).

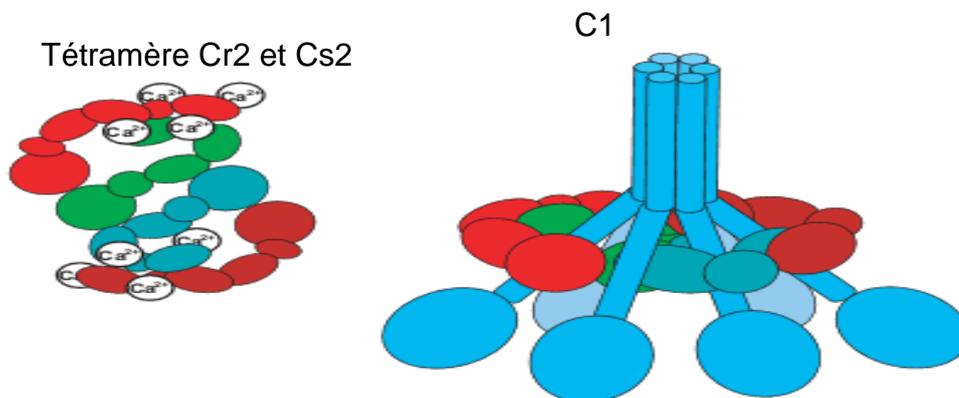


Figure 6 : Structure de la molécule C1 [69].

Le C1 se fixe au niveau de la région Fc entre deux IgG adjacentes. Il peut ainsi empêcher la fixation de l'anticorps de détection anti-IgG. Ceci favorise la fixation de l'anti-IgG couplée à la phycoérythrine sur la BCN (Figure 7) [69].

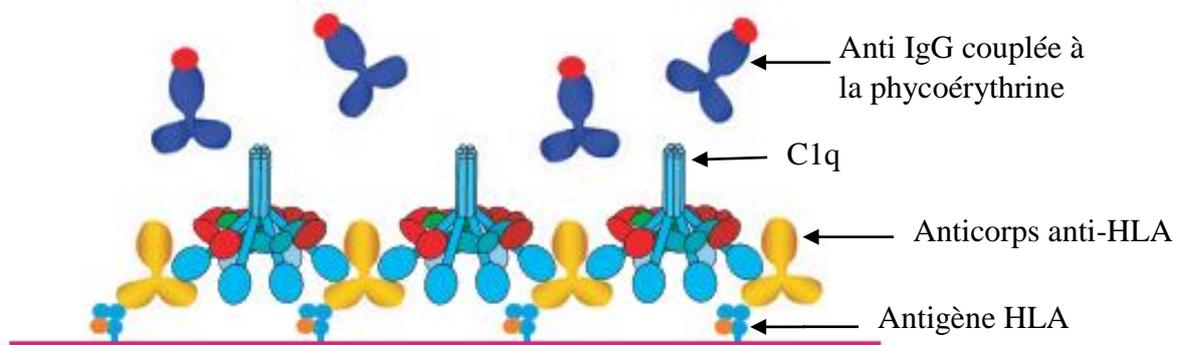


Figure 7 : Mécanisme d'action du C1 au cours du screening des anticorps anti-HLA [69].

II-3-4- Dilution

Plusieurs équipes procèdent à la dilution au 1/10 des sérums lorsque la valeur de la MFI de la BCN est élevée [67]. Ces équipes suspectent la présence des anticorps IgG anti-HLA à des taux importants dans ces sérums. Ce phénomène est appelé l'effet prozone. Au cours de ce phénomène, certains anticorps IgG anti-HLA se fixent par la région Fc au niveau des billes. Les autres vont former des amas occupant les régions Fc des anticorps, qui est le site de liaison des anticorps anti IgG couplés à la phycoérythrine.

II-3-5- Dialyse Hypotonique

Zachary et al ont dialysé leurs sérums contre de l'eau distillée lorsque la valeur de la MFI de la BCN était élevée [71]. Cette équipe incrimine la présence des anticorps anti-HLA d'isotype IgM qui entrent en compétition avec les anticorps anti-HLA d'isotype IgG sur leurs sites de liaison au niveau des billes. Les IgM sont des euglobulines insolubles dans l'eau tandis que les IgG sont des pseudoglobulines hydrosolubles. La dialyse du sérum contre l'eau distillée entraîne une précipitation des IgM permettant leur élimination efficace. Cette précipitation dure une nuit.

III-Les objectifs de notre étude

Dans la greffe rénale, la recherche des anticorps anti-HLA par la technologie Luminex a permis de réduire le risque de rejet et d'améliorer la survie du greffon en orientant la décision clinique de la greffe et le traitement immunosuppresseurs. Dans notre laboratoire, nous avons observé des valeurs de MFI de la BCN supérieures au seuil déterminé par le fournisseur. Ces valeurs élevées de MFI de la BCN reflètent une fixation non spécifique à la BCN. Dans ces cas, la recherche des anticorps anti-HLA ne peut pas être validée techniquement ni interprétée. Les liaisons non spécifiques à la BCN ont été décrites par plusieurs équipes qui ont proposé des prétraitements des sérums des patients avant le test de la recherche des anticorps anti-HLA tel que le DTT et l'EDTA. La société One Lambda propose le réactif l'Adsorb-Out. Chacun de ces prétraitements permet l'élimination, selon son mécanisme d'action, d'une cible bien précise incriminée dans la liaison non spécifique à la BCN.

L'objectif général de ce travail est de déterminer la conduite à tenir devant une valeur de la BCN élevée. Cet objectif est décliné en objectifs secondaires qui sont :

- Déterminer la fréquence des sérums avec une valeur élevée de la MFI de la BCN
- Evaluer l'effet de chaque prétraitement sur la valeur élevée de la MFI de la BCN
- Comparer l'effet des différents prétraitements sur le bruit de fond afin de déterminer le prétraitement le plus efficace pour diminuer la valeur élevée de la MFI de la BCN
- Calculer le pourcentage des sérums qui ont présenté une baisse de la MFI de la BCN après chaque prétraitement, ceci nous permettra de déduire la cible de ces prétraitements et de définir le traitement adéquat pour chaque cas afin d'établir une conduite à tenir devant ces sérums au niveau du laboratoire
- Comparer nos sérums dont la valeur de la MFI de la BCN est élevée à des sérums avec la valeur du MFI de la BCN normale en fonction de la néphropathie, des anticorps anti-nucléaires et des médicaments consommés à la recherche d'une association entre la valeur élevée de MFI de la BCN et ces caractéristiques

IV- Matériels et méthodes

IV-1- Sérums

Dans notre étude, le dépistage des anticorps anti-HLA a été réalisé sur 3500 sérums collectés sur quatre années de 2014 à 2017. Les sérums appartiennent à des patients marocains greffés ou en instance de greffe rénale venant des différents hôpitaux du royaume. Selon les recommandations de l'Agence de la Biomédecine française, les patients en attente de greffe doivent être prélevés à J15 et à J30 après un événement immunisant et tous les trois mois en dehors d'évènements immunisants. Après la transplantation, les sérums sont prélevés à J30, à 6 mois et à un an.

Les prélèvements de sang ont été effectués durant le suivi immunologique des patients. Ils sont envoyés à notre laboratoire d'histocompatibilité avec prescription médicale établie par le néphrologue traitant et comportant l'identification du patient, ses antécédents d'immunisation (annexe 1). La conformité du type de tube (sec), de sa validité et de l'identification du patient est réalisée dès réception au laboratoire. Les prélèvements non conformes sont répertoriés pour la traçabilité des non conformités puis sont déclarées au service pour refaire un autre prélèvement. Les prélèvements conformes sont centrifugés à 3000 tr/minute pendant 10 minutes et aliquotés dans des eppendorfs. Pour chaque prélèvement, cinq aliquots contenant 100µl de sérum chacun sont stockés et conservés à une température de -40°C dans la sérothèque du laboratoire d'histocompatibilité. Avant le stockage, les eppendorfs sont identifiés par l'année du prélèvement suivi du RER puis du numéro chronologique du sérum. Le RER (Receveur Eventuel de Rein) correspond au numéro de dossier du patient. Chaque patient a un numéro de dossier unique. Exemple : Les eppendorfs du cinquième sérum prélevé en 2017 chez un patient avec un numéro de dossier RER : 142 seront identifiés comme suivant : 17-142-5.

Sur le dossier du patient, l'emplacement des eppendorfs dans la sérothèque est mentionné selon le numéro de la boîte (B) et sa position dans la boîte. Exemple : B9, position A6, A7, A8, A9, A10 (annexe 2).

IV-2- Recherche des anticorps anti HLA

Pour notre travail, la recherche des anticorps anti-HLA a été effectuée au laboratoire d'histocompatibilité du centre hospitalier universitaire Ibn Sina de Rabat. Les sérums ont été

analysés suivant le protocole standard et les instructions du fournisseur pour la recherche des anticorps anti-HLA par le Luminex (LaBScreen Mixed beads, One Lambda, Inc Canoga Park, CA). La plateforme Luminex x MAP 200 et le logiciel HLA fusion 3.0 ont été utilisés pour l'acquisition de données et leur analyse.

IV-2-1- Réactifs LaBScreen Mixed beads de One Lambda

Pour la recherche des anticorps anti-HLA, la première étape consiste à sortir les sérums de la sérothèque et de les laisser se décongeler à température ambiante. Après la décongélation, les sérums sont centrifugés à 13500 tr/min pendant 10 minutes.

Sur une plaque de type ELISA de 96 puits, dans le premier puits 20 μ l du sérum contrôle négatif sont déposés et dans les autres puits 20 μ l des sérums à tester. Dans chaque puits, 5 μ l de billes sont rajoutés, la plaque est ensuite couverte par un seal, puis incubée dans l'obscurité pendant 30 minutes sur agitateur. Les billes présentent l'inconvénient d'être très sensibles à la lumière [76].

Après l'incubation, 200 μ l du tampon de lavage sont rajoutés avec une pipette multicanaux dans chaque puits. La plaque est agitée puis centrifugée à 3000 tr/min pendant 5 minutes. Pour éliminer le liquide de lavage des puits, la plaque est fliquée délicatement (renversée dans un mouvement rapide). Le lavage est réalisé deux fois. Dans chaque puits, 100 μ l d'anti-IgG couplée à la phycoérythrine sont rajoutés. La plaque est recouverte, agitée et incubée pendant 30 minutes.

Après l'incubation, deux lavages sont réalisés selon la même technique décrite plus haut. La dernière étape consiste à ajouter 80 μ l de PBS normal dans chaque puits, d'agiter la plaque et de la mettre sur Luminex pour la lecture (Figure 8). La plaque est lue immédiatement par le Luminex, elle peut être conservée dans l'obscurité à +4°C durant 24h.

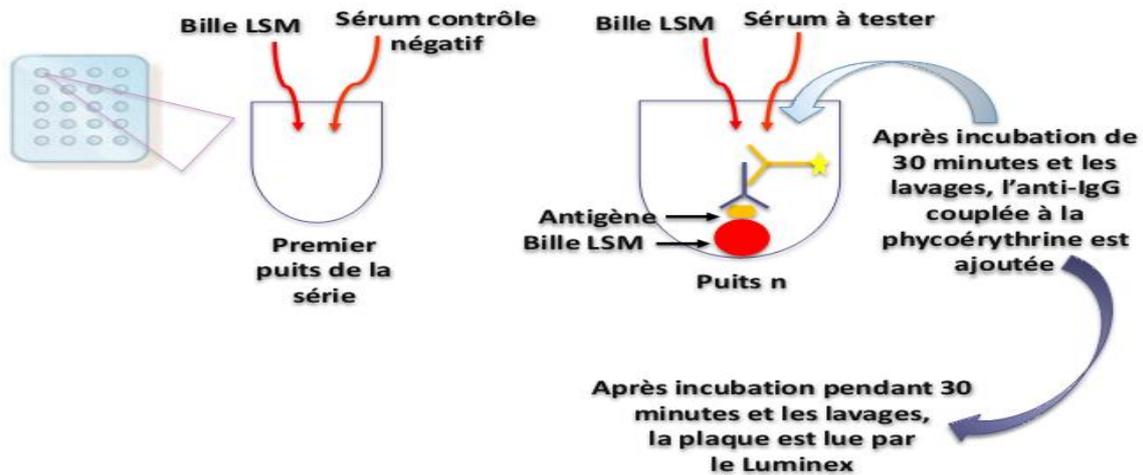


Figure 8 : Screening des anticorps anti-HLA par le kit LaBScreen Mixed

IV-2-2- Plateforme Luminex x MAP 200

Le terme « cytomètre » est quelque peu mal choisi pour la dénomination de cet appareil, car il n'y a pas d'analyses cellulaires. Cependant, le principe est identique, puisqu'une suspension de billes subit l'aspiration, puis le trajet dans une veine liquide. À la sortie de la veine liquide, les billes sont excitées par un jeu de deux lasers, ayant chacun un rôle précis [77]. La Plateforme Luminex x MAP 200 est un système multi-analytique constitué d'un lecteur de plaque qui comprend un système fluide et un système optique et est piloté par un logiciel d'acquisition qui permet le traitement des signaux numériques et l'acquisition des données en temps réel [56] (figure 9).



Figure 9 : Plateforme Luminex x MAP 200

IV-2-2-1- Système fluide

Le système fluide maintient le système propre et permet l'alignement des billes lorsqu'elles entrent dans un courant de liquide de gaine (sheath fluid). Une aiguille descend dans chaque puits aspire les billes du mélange et les injecte par une buse dans un courant continu de tampon. En appliquant au jet une onde de vibration d'une fréquence et d'une amplitude déterminées, l'échantillon va se rompre pour donner des gouttes à un point précis caractérisé par sa position et son temps d'apparition. Une fois que les billes sont en une seule file à l'intérieur de la cellule d'écoulement, chaque bille est excitée individuellement par les lasers [64].

III-2-2-2- Système optique

a- Lasers :

Deux types de lasers sont utilisés : un laser rouge et un laser vert (Figure 10).

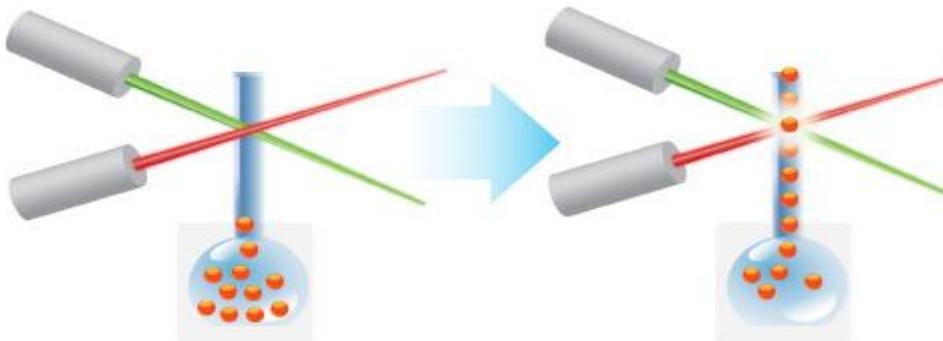


Figure 10 : Les lasers qui excitent les fluorochromes incorporés dans les billes et la phycoérythrine couplées à l'anti-IgG de détection [64]

Le laser rouge est appelé « laser de classification » car il est utilisé pour classer les billes en excitant les fluorochromes incorporés dans ces billes. À la sortie de la veine liquide, les billes excitées par le laser rouge émettent une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm). Chaque bille est identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge enregistrées par un capteur. Chaque bille a ainsi son propre code couleur d'identification, et plusieurs billes différentes (jusqu'à 100 actuellement) peuvent être mélangées dans un seul tube ce qui multiplie considérablement les possibilités d'analyses (Figure 11) [75,76].

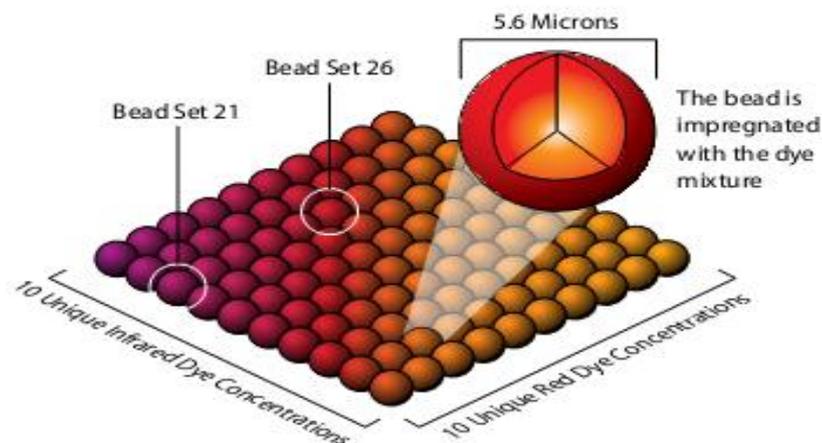


Figure 11 : Combinaison de 10 niveaux de concentration de fluorochrome rouge et de 10 niveaux de fluorochrome infra-rouge [78].

Le laser vert appelé « laser reporteur » excite la phycoérythrine couplée à l'anticorps anti-IgG. Il permet la révélation et la détection des anticorps anti-HLA fixés sur un type de billes spécifique.

Pour vérifier l'alignement des lasers, il est nécessaire de faire l'étalonnage tel que requis par les règles de la fédération européenne d'immunogénétique (EFI). L'étalonnage aide à assurer une acquisition cohérente des données dans le temps et à travers différents systèmes du Luminex 200.

Le processus d'étalonnage utilise des microsphères avec une intensité de fluorescence connue. Les calibrateurs utilisés sont le CAL1 pour étalonner le Laser rouge (Classificateur) et le CAL2 pour calibrer le Laser vert (Reporteur). Le système lit les billes de calibration, puis auto-aligne les lasers en modifiant la tension.

Il est recommandé de calibrer l'appareil toutes les semaines et à chaque fois que le delta de température est supérieur à $\pm 3,0$ (pièce climatisée), que l'instrument a été déplacé ou lorsqu'il y a des problèmes d'acquisition de l'échantillon.

b- Détecteurs

Lorsque le laser frappe les billes, les détecteurs captent la lumière émise et l'envoie à travers une série de miroirs

- Les photodiodes CL1 et CL2 détectent la fluorescence émises par les deux fluorochromes enfermés à l'intérieur des billes. L'intensité de fluorescence incorporée différencie entre les 100 billes par leur code couleur.

- Le tube photomultiplicateur (PMT) détecte la fluorescence émise par les molécules adhérentes à la surface de la bille. L'intensité de fluorescence ou le signal généré par la fixation des anticorps aux billes recouvertes d'un antigène spécifique permet de déterminer le titre de l'anticorps. Ainsi les détecteurs permettent la différenciation entre les billes qui ont fixé des anticorps spécifiques et ceux sans anticorps.
- Le double discriminateur (DD) détecte la taille des billes (Figure 12) [64]

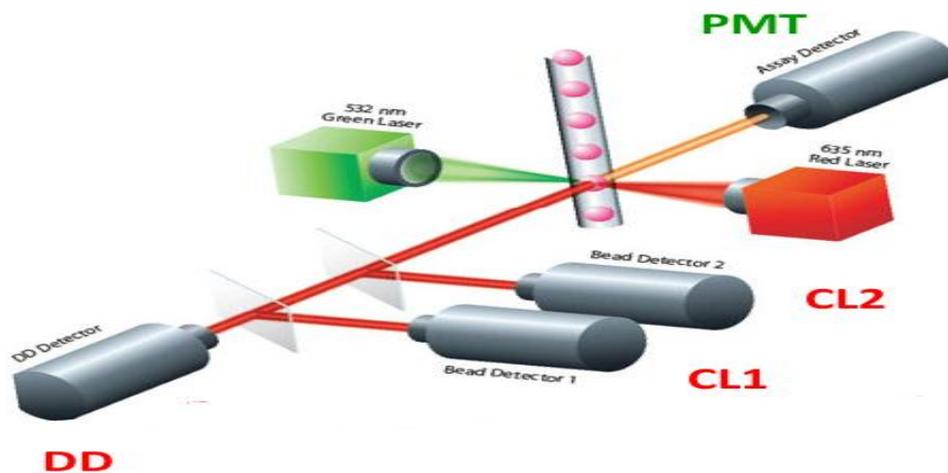


Figure 12 : Les détecteurs photodiodes de la technologie Luminex [64]

PMT : tube photomultiplicateur, **CL1** : classificateur 1, **CL2** : classificateur 2, **DD** : double discriminateur.

IV-2-3- Logiciel d'acquisition des données transmises par le Luminex

L'acquisition correspond à la lecture de la plaque par le Luminex. Elle est réalisée après la calibration de l'appareil. Le logiciel d'acquisition permet l'affichage des informations sur l'état physique de l'instrument et des lasers, des informations relatives à la pression du liquide de gaine, à la température du double discriminateur et la température de la plateforme ainsi qu'à l'étalonnage. Il affiche la liste des commandes exécutées avec leur progression, la date l'heure et le résultat. Toute erreur survenue pendant l'acquisition s'affiche en rouge. Le logiciel d'acquisition indique également, en temps réel, la progression pour chaque échantillon analysé [64].

Au cours de la lecture, les billes sont classées dans un masque préétabli selon la fluorescence rouge et infrarouge émise. Chaque ensemble de billes qui possèdent le même ratio des deux colorants tombent dans une région spécifique et vont porter un numéro d'identification unique. Des nuages de billes de même code couleur apparaissent et définissent la cartographie des billes (Figure 13).

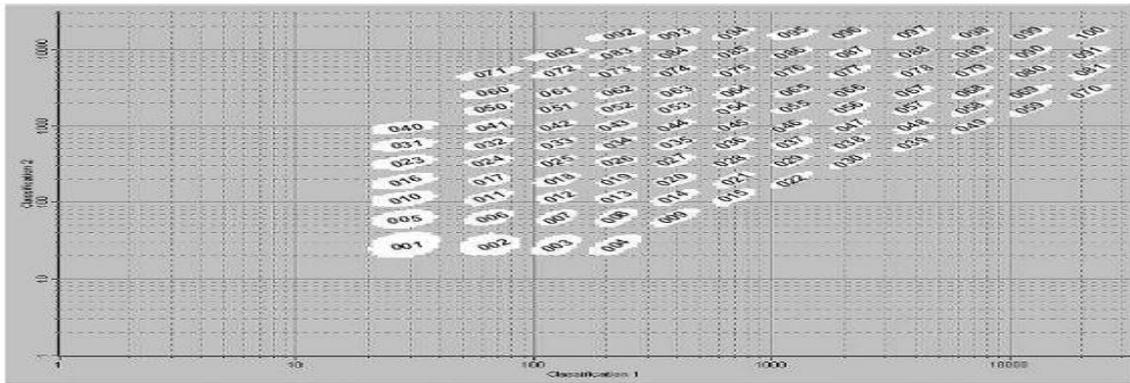


Figure 13 : Le nuage de billes observé lors de l’acquisition par la technologie Luminex [64]

Une déviation du nuage de billes par rapport à son masque peut être observée lors d’un défaut de marquage interne des microsphères, ou d’un mauvais réglage de l’appareil, dont les lasers sont sensibles aux variations de température. Une autre possibilité correspond à une mauvaise conservation des kits, les billes étant photosensibles.

Le logiciel d’acquisition fournit également des valeurs statistiques associées à chaque bille et pour chaque échantillon. Il compte le nombre de billes analysées par les lasers et donne la moyenne de la MFI des 150 billes qui portent le même numéro d’identification. Le logiciel d’acquisition permet de détecter les débris et les agrégats de billes. Les événements plus grands ou plus petits que les microsphères sont exclus [64].

IV-2-4- Logiciel fusion 3.0 pour l’analyse des résultats

Le logiciel Fusion 3.0 convertit les données brutes générées par le Luminex au cours de l’acquisition. Ces données se présentent sous forme de fichiers CSV. Elles montrent les MFI brutes de chaque bille superposées à celles importées du sérum contrôle négatif. Les résultats de l’analyse sont basés sur les spécifications catalogue fournies avec le logiciel. Le catalogue est sélectionné en correspondance avec le lot des billes utilisées. Les résultats bruts sont d’abord normalisés puis classés par valeurs normalisées décroissantes. Le catalogue importé et le fichier CSV contenant les données brutes sont nécessaires pour la normalisation des résultats. La fluorescence émise par la phycoérythrine est calculée par le logiciel Fusion 3.0 à partir de la valeur du sérum contrôle négatif et la MFI de la BCN selon la formule suivante :

Ratio normalisé =

$$\frac{\text{MFI de la N bille} - \text{MFI de la BCN}}{\text{MFI de la N bille du sérum négatif} - \text{MFI de la BCN du sérum négatif}}$$

Le fournisseur suggère qu'une valeur de MFI jusqu'à 1500 peut être acceptable pour la BCN. En routine, dans notre laboratoire, nous acceptons la marge entre 150 et 500 MFI pour la BCN. Une valeur de MFI inférieure à 150 est considérée comme valide (Annexe 3).

IV-3- Traitements des sérums avec une MFI élevée de la BCN

Tous les sérums ayant une valeur de MFI de la BCN élevée au cours de la première recherche d'anticorps anti-HLA ont été réanalysés une deuxième fois pour éliminer les problèmes liés à la manipulation. Les sérums ayant une MFI normale lors du deuxième test ont été exclus de l'étude. Les autres sérums ont été dilués à 1/10 puis analysés à la recherche d'effet de Prozone. Ils ont été ensuite traités par le réactif Adsorb-Out, le DTT et/ou l'EDTA [65-71] avant de les analyser par le Luminex (Figure 14).

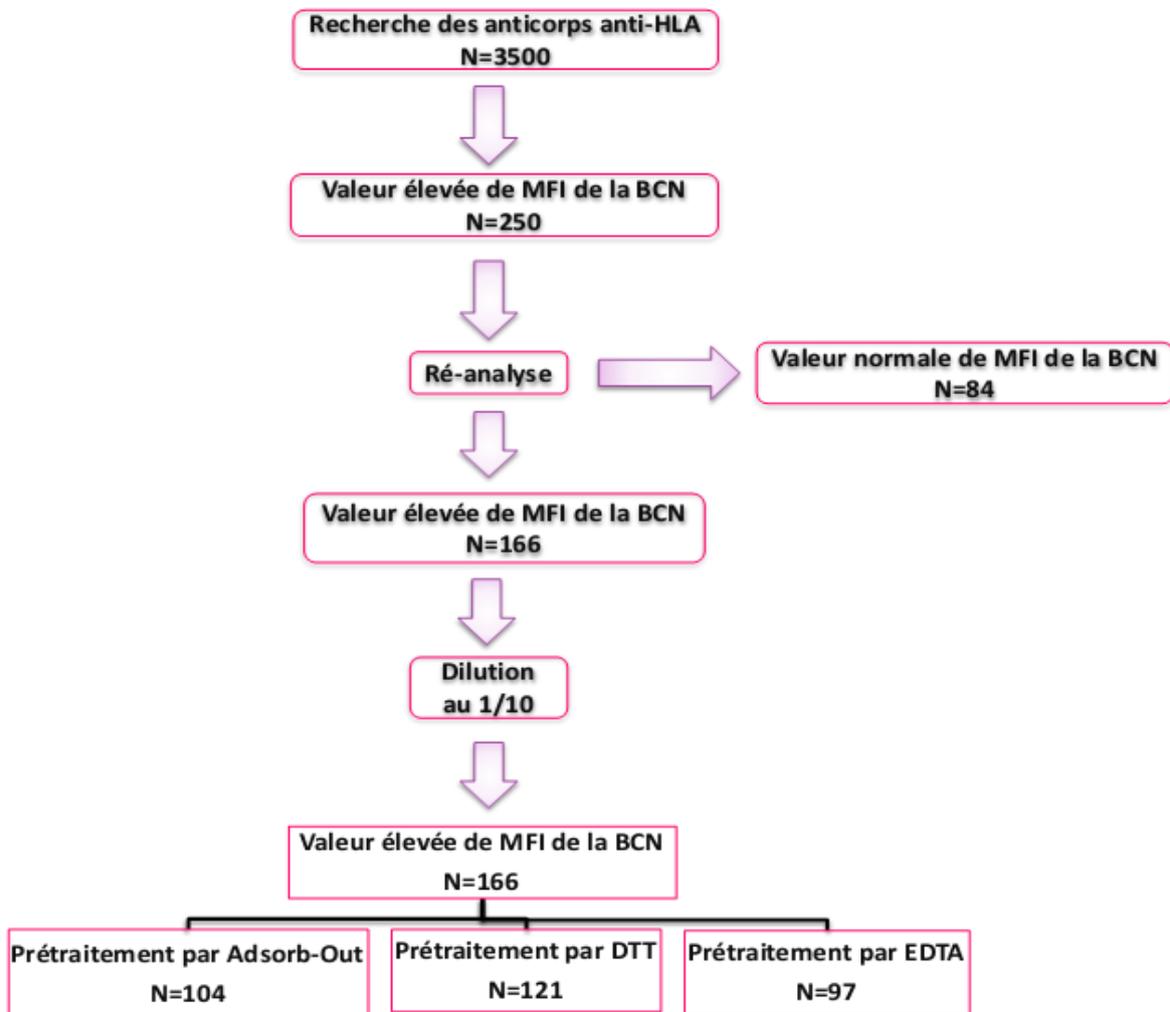


Figure 14 : Procédure adoptée devant une valeur élevée de MFI de la BCN au cours du LaBScreen Mixed

IV-3-1- Traitement par Adsorb-Out

Les sérums ont été incubés pendant 30 minutes à température ambiante avec un volume égal du réactif Adsorb-Out (0.01 M) puis ont été centrifugés à 13500 tr/minutes pendant 10 minutes [71].

IV-3-2- Traitement par DTT

Les sérums ont été incubés pendant 30 minutes à une température de +37°C avec un volume égal du DTT (0.01 M dans le tampon phosphate-saline) puis ont été centrifugés à 13500 tr/minutes pendant 10 minutes [65, 66].

IV-3-3- Traitement par EDTA

Les sérums ont été dilués avec l'EDTA (0.01 M) au 1/10 puis ont été incubés pendant 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé à 13500 tr/minutes pendant 10 minutes [68-70].

IV-4- Données pathologiques et médicamenteuses des patients

Les informations pathologiques et médicamenteuses ont été collectées à partir des dossiers médicaux des patients. Seuls les patients suivis au service de néphrologie du CHU de Rabat ont été inclus. Ils représentent 86 patients parmi les 166 patients ayant une valeur élevée de la BCN sur LaBScreen mixed (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des patients (N=166) dont les sérums présentent une valeur élevée de MFI de la BCN sur LaBScreen mixed

Caractéristiques	Valeurs
Age	40.23± 13.007
Sexe	
Homme	67.5% (n=112)
Femme	32.5% (n=54)
Evénements immunisants	
Oui	37.3% (n=62)
Non	62.7% (n=104)

Dans cette étude, nous avons comparé nos patients (N=86) avec des contrôles (N = 212) ayant une valeur inférieure à 150 de MFI de la BCN par rapport à la néphropathie, à la présence des anticorps anti-nucléaires et aux médicaments pris avant et durant l'analyse des anticorps. Les patients et les contrôles ont été appariés selon l'âge et le sexe.

La recherche des ANA pour les patients et les contrôles inclus dans l'étude a été réalisée par notre équipe au laboratoire d'auto-immunité du CHU Ibn Sina de Rabat par la technique d'immunofluorescence indirecte sur Hep2/ kit AESKUSLIDES*ANA. 40µl de sérum sont déposés dans chaque puits. Après une incubation de 30 minutes à 20°C et dans l'obscurité, 40 µl de conjugué prêt à l'emploi (anti-IgG marquée à la fluorescéine) sont déposés dans chaque puits. La lame est incubée pendant 30 minutes à +20°C dans l'obscurité, puis lue au microscope à fluorescence. Chaque sérum est testé en duplicate à la dilution 1/160 et puis 1/320 (Figure 15).

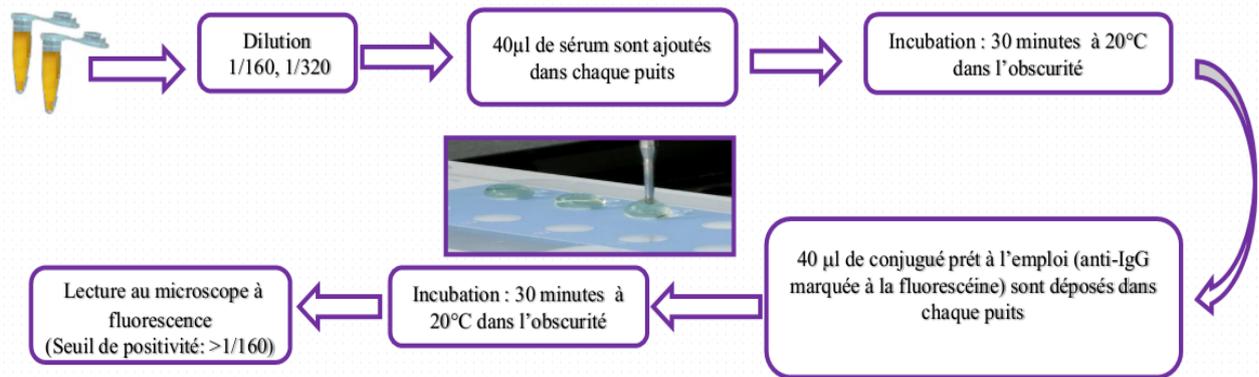


Figure 15 : Principe de la recherche des ANA par Immunofluorescence indirecte

IV-5- Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée par le logiciel SPSS pour Windows, version 13.0 (SPSS Institute, Chigago, IL). La normalité de la distribution du BCN et du BCP a été testée par le test Kolmogorov-Smirnov. La comparaison de la valeur BCN et BCP entre les sérums non traités et traités a été effectuée respectivement par les tests Wilcoxon et Student. La comparaison de la valeur de la BCN entre les patients et les témoins a été réalisée par le test de Man-Whitney. La comparaison des fréquences a été effectuée par le test Pearson chi-carré. La comparaison des variables quantitatives a été effectuée par le test de Mann-Whitney. L'étude des facteurs associés à l'effet Adsorb-Out sur les valeurs de la BCN a été réalisée en utilisant une régression logistique univariée et multivariée. Le niveau de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$.

V- Résultats

La première partie consistait à évaluer l'effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de la MFI de la BCN. Ce prétraitement est un réactif commercialisé et préconisé par le fournisseur en cas de valeur de la MFI élevée de la BCN mais qui reste coûteux pour notre pratique. A cette étape, nous avons inclus 98 sérums.

Dans la deuxième partie, nous avons testé d'autres prétraitements décrits dans la littérature comme le DTT et l'EDTA en parallèle avec le réactif Adsorb-Out. Un nombre de 97 sérums ont été traité par les trois prétraitements. Nous avons comparé l'effet de tous ces prétraitements sur la valeur de la MFI de la BCN. Dans cette partie. Nous avons également cherché l'association entre la valeur élevée du MFI de la BCN et la néphropathie, les anticorps anti-nucléaires (ANA) et les médicaments pris durant la période de la recherche des anticorps anti-HLA en comparant nos sérums avec des sérums dont les valeurs du MFI de la BCN sont normales.

V-1- Traitement des sérums par le réactif Adsorb-Out

V-1-1- Médiane de MFI de la BCN avant traitement par l'Adsorb-Out

Dans notre échantillon, la médiane de la BCN était de 595 [268-1588]. Elle était plus élevée dans les sérums des femmes 995 [294-3827] que ceux des hommes 430 [227-1256] avec une différence statistiquement significative ($p=0.018$). Par contre, la différence de la médiane de la BCN des sérums entre les patients immunisés 607 [314-1228] et non immunisés 584 [200-2518] était statistiquement non significative. La médiane de la BCN était plus élevée dans les sérums stockés plus de 7 jours 767 [315-1589] comparés à ceux stockés moins de 7 jours 407 [206-1338] mais statistiquement non significative (tableau 2).

Tableau 2 : Valeur de MFI de la BCN des sérums non traités en fonction du sexe, des événements d'immunisation et de la durée de stockage

Caractéristiques	Médiane de la BCN	P value
Sexe		
Homme	430 [227-1256]	0.018
Femme	995 [294-3827]	
EI		
Oui	607 [314-1228]	0.680
Non	584 [200-2518]	
Durée de stockage		
<7 jours	407 [206-1338]	0.255
>7 jours	767 [315-1589]	

BCN : bille contrôle négatif, **EI** : événements d'immunisation, Sexe, EI et Durée de stockage sont exprimés par la médiane et interquartile

V-1-2- Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCN

Après traitement des sérums par le réactif Adsorb-Out, la médiane de la BCN était de 87 [33-289]. La comparaison de cette médiane entre les sérums traités et non traités a montré une différence statistiquement significative (87 versus 595, $p < 0.001$). La figure 16 montre que le traitement des sérums par l'Adsorb-Out a diminué la valeur de la MFI de la BCN dans la plupart des sérums.

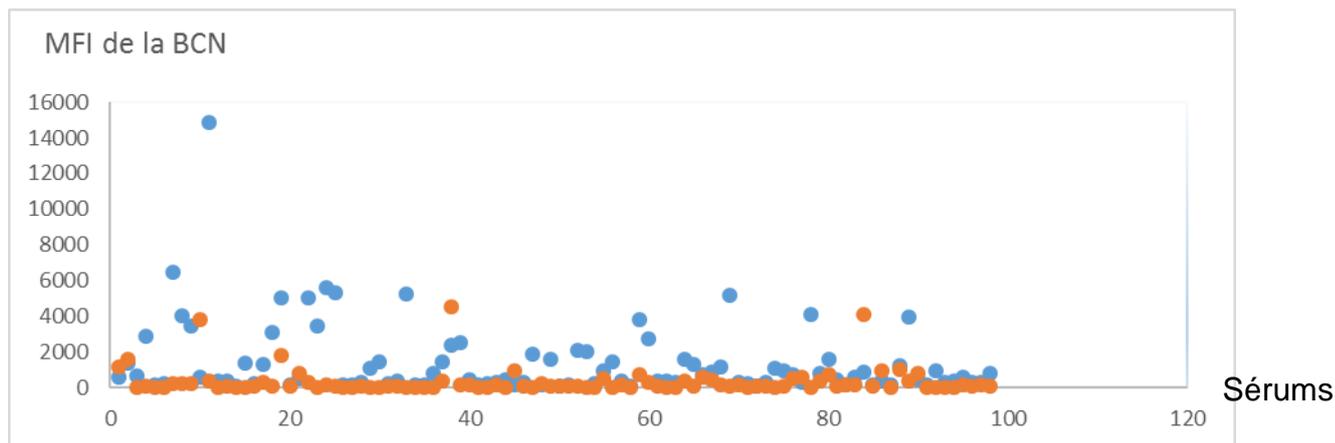


Figure 16 : Effet de l’Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCN (N=98)

MFI : intensité moyenne de fluorescence, **BCN** : bille contrôle négative, **Bleu** : BCN des sérums non traités, **Orange** : BCN des sérums traités par l’Adsorb-Out

Nos résultats ont montré que l’Adsorb-Out a diminué la valeur de la BCN à moins de 150 de MFI dans 62.2% des cas. Dans 25.5% des cas, l’Adsorb-Out a diminué la valeur de la BCN mais elle est restée supérieure à 150 de MFI. Il n’avait aucun effet sur la valeur de la BCN ou au contraire l’avait augmentée dans 12.3% des cas.

Dans le tableau 3, nous avons comparé la médiane de la BCN après traitement par le réactif Adsorb-Out en fonction du sexe et de l’événement immunisant. La différence est statistiquement non significative.

Tableau 3 : Valeur de MFI de la BCN des sérums traités par l’Adsorb-Out en fonction du sexe et des événements d’immunisation

Caractéristiques	Médiane de la BCN	P value
Sexe		
Femme	77 [32-359]	0.94
Homme	102 [44-252]	
EI		
Oui	115 [31-374]	0.64
Non	70 [34-200]	

BCN : bille contrôle négatif, **EI** : événements d’immunisation, Sexe et EI sont exprimés par la médiane et interquartile

Pour étudier l'effet de l'Adsorb-Out en fonction de la valeur initiale de la BCN, nous avons comparé les sérums avec une MFI de la BCN inférieure à 500 et ceux avec une MFI de la BCN supérieure à 500. La différence de l'effet de l'Adsorb-Out dans les deux groupes était statistiquement significative (OR= 0.333 ; IC 95%= [0.146-0.760], p=0.009). En ajustant sur : l'âge des patients, le sexe, et l'événement immunisant, l'effet de l'Adsorb-Out ne dépend que de la valeur initiale de la BCN (OR= 0.358, IC 95% [0.151-0,849], p= 0.020) (Tableau 4).

Tableau 4 : Corrélation logistique des sérums traités par l'Adsorb-Out au cours du LaBScreen Mixed

Variables indépendantes	Analyse univariée			Analyse multivariée		
	OR	IC 95%	P value	OR	IC 95%	P value
Age (Années)	1.016	0.986-1.046	0.311	1.011	0.977-1.046	0.521
Sexe						
Homme	1			1		
Femme	0.938	0.412-2.132	0.878	1.342	0.516-3.491	0.547
EI						
Oui	0.852	0.385-1.883	0.692	0.936	0.382-2.290	0.884
Non	1			1		
Valeur de la BCN						
<500	1			1		
>500	0.333	0.146-0.760	0.009	0.358	0.151-0.849	0.020

OR: odds ratio, IC: Intervalle de confiance, BCN: Bille contrôle négatif.

V-1-3- Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCP

La médiane de la BCP des sérums traités par le réactif Adsorb-Out était de 8570± 3881. La comparaison de cette médiane entre les sérums traités et non traités a montré une différence statistiquement significative (8570±3881 versus 11027± 3656, p<0.001).

La figure 17 montre l'effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de la BCP. Nous avons observé que le traitement des sérums par l'Adsorb-Out a augmenté la valeur de la BCP dans la plupart des sérums.

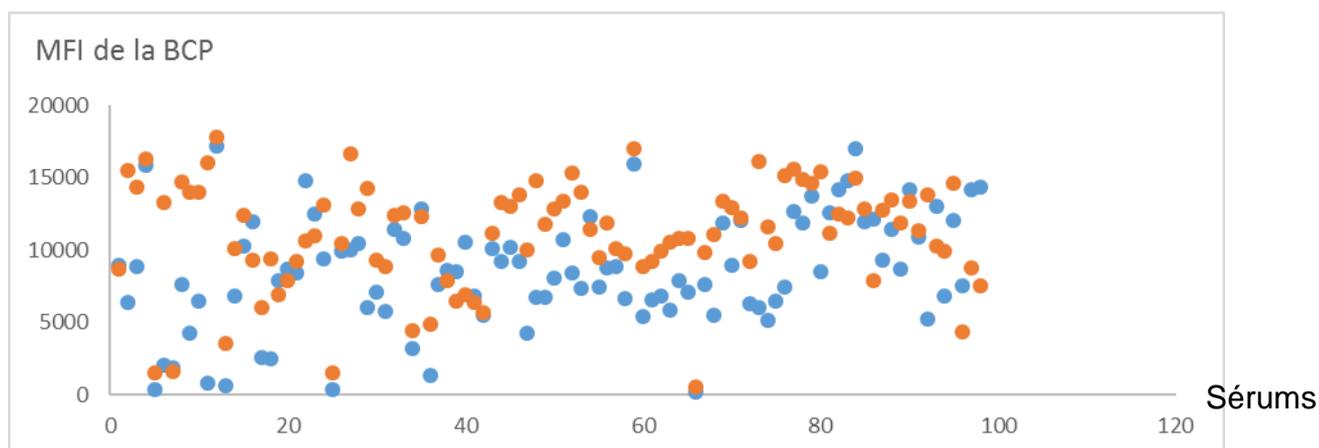


Figure 17 : Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCP

MFI : Intensité moyenne de fluorescence, **BCP** : bille contrôle positive, **Bleu** : BCP des sérums non traités, **Orange** : BCP des sérums traités par l'Adsorb-Out

V-2- Traitement des sérums par le réactif Adsorb-Out, DTT et EDTA

V-2-1- Effet de l'Adsorb-Out, DTT et EDTA sur la valeur de MFI de la BCN

Avant traitement des sérums, la médiane de la BCN était de 723.5 [299.25-1443]. Après traitement par l'Adsorb-Out, DTT et l'EDTA, la médiane de la BCN des sérums était respectivement de 85 [34-218], 184 [106-597], et 455 [131-1177]. La comparaison de la médiane entre les sérums traités et non traités par les différents traitements a montré une différence statistiquement significative ($p < 0.001$), ($p < 0.001$), et ($p = 0.004$) (Tableau 5).

Tableau 5 : Valeur de MFI de la BCN des sérums non traités et de ceux traités au cours du LaBScreen Mixed.

Prétraitements	Médiane de la BCN		P value
	Sérums traités	Sérums non traités	
Adsorb-Out	85.5 [34.5-218.75]		<0.001
DTT	184 [106-597]	723.5 [299.25-1443]	<0.001
EDTA	455 [131.5-1177]		<0.004

BCN : bille contrôle négatif ; **MFI** : Intensité moyenne de fluorescence ; **DTT** : dithiothreitol; **EDTA**: acide tétra éthylène diamine

Nous avons comparé l'effet des différents prétraitements sur la valeur de la BCN. La différence était statistiquement significative entre les sérums traités par l'Adsorb-Out et ceux traités par DTT (85.5 versus 184, $p = 0.009$), entre les sérums traités par Adsorb-Out et ceux

traités par EDTA (85.5 versus 455, $p=0.003$) et entre les sérums traités par DTT et ceux traités par EDTA (184 versus 455, $p=0.002$).

Les figures 18, 19 et 20 montrent que ces différents traitements ont diminué la valeur MFI de la BCN dans la plupart des sérums.

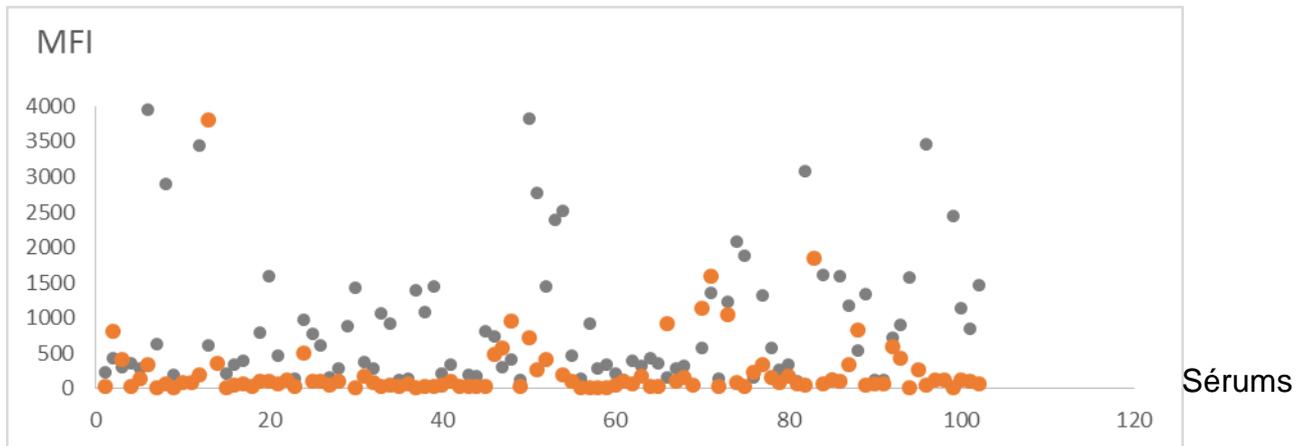


Figure 18 : Effet de l'Adsorb-Out sur la valeur de MFI de la BCN (N=104)

MFI : Intensité moyenne de fluorescence ; **Gris** : BCN des sérums non traités ; **Orange** : BCN des sérums traités par l'Adsorb-Out.

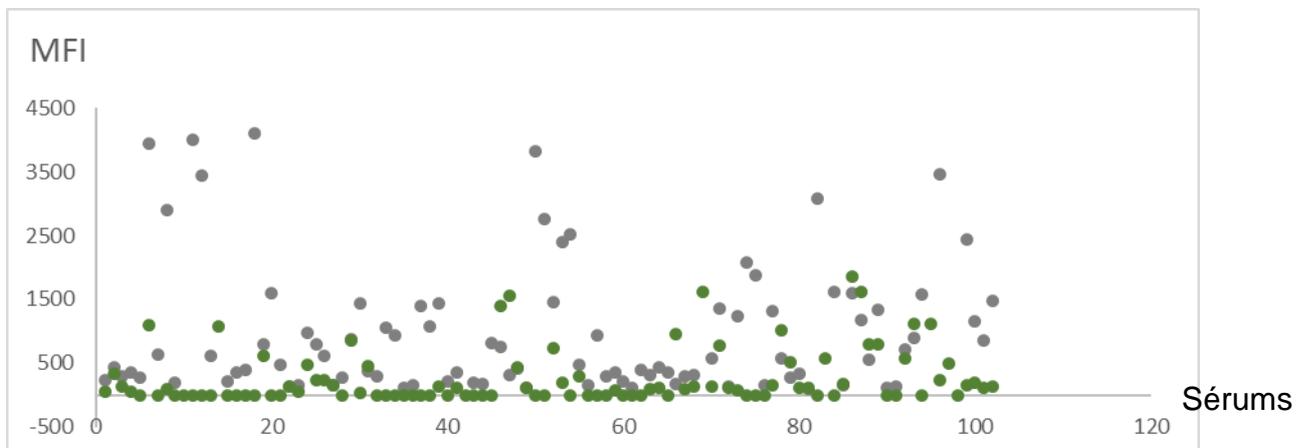


Figure 19 : Effet du DTT sur la valeur de MFI de la BCN

MFI : Intensité moyenne de fluorescence ; **Gris** : BCN des sérums non traités ; **Vert** : BCN des sérums traités par DTT.

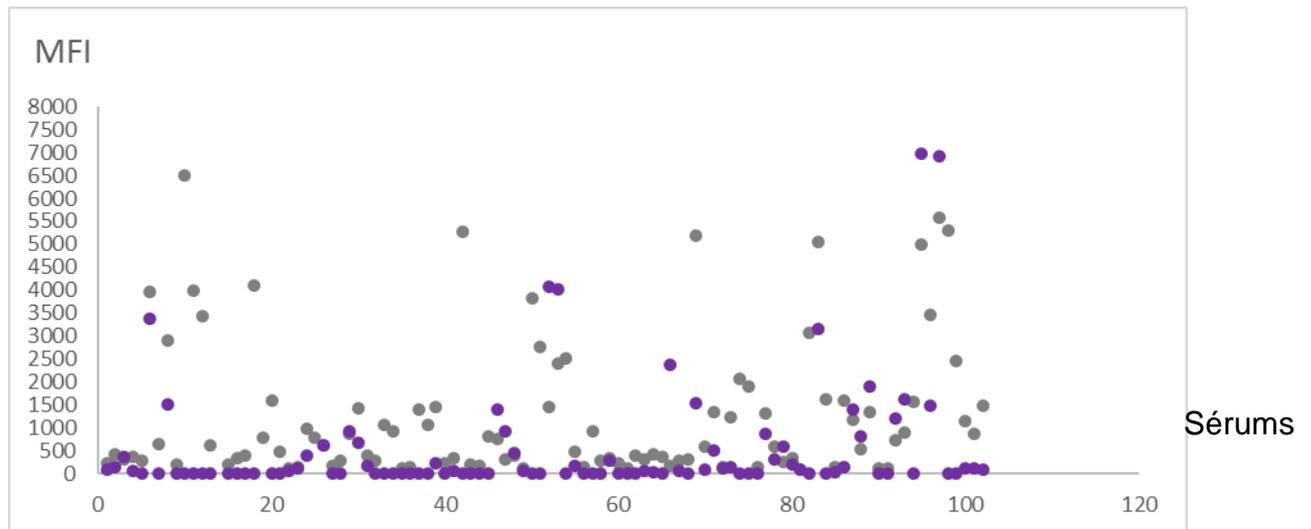


Figure 20 : Effet de l'EDTA sur la valeur de MFI de la BCN

MFI : Intensité moyenne de fluorescence ; **Gris :** BCN des sérums non traités ; **Violet :** BCN des sérums traités par l'EDTA.

Nos résultats ont montré que l'Adsorb-Out a diminué la valeur de la BCN à moins de 150 de MFI dans 69.2% des cas, le DTT dans 43% des cas et l'EDTA dans 30% des cas. La valeur de la BCN est restée entre 150 et 500 de MFI dans 17.3% des sérums traités par Adsorb-Out, dans 28.1% des sérums traités par DTT, et dans 48.4% des sérums traités par EDTA. Par contre, l'Adsorb-Out, le DTT, et l'EDTA n'avaient aucun effet sur la valeur de la BCN ou au contraire l'avaient augmentée respectivement dans 13.5%, 28.9%, et 21.6%.

V-2-2- Association entre la valeur de MFI de la BCN et les caractéristiques des patients

La comparaison de la médiane de la BCN entre les sérums des patients et des témoins est statistiquement significative 723.5 [299.25-1443] versus 29.5 [19-50], $p < 0.001$).

La différence de la médiane de la BCN entre les sérums des patients et des témoins en fonction des corticoïdes, des immunosuppresseurs, de l'héparine et des auto-anticorps ANA est statistiquement significative ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.043$ $p = 0.008$ respectivement). Par contre, la différence en fonction de la néphropathie est statistiquement non significative (Tableau 6).

Tableau 6 : La comparaison entre les sérums des patients et des témoins en fonction de la néphropathie, des ANA et du traitement reçu.

Caractéristiques	Patients (N=86)	Témoins (N=212)	OR	IC (95%)	P value
Néphropathie					
Indéterminée	48.8%	56.6%			
Hypertensive	29.1%	25.9%			
Lupus	2.3%	1.9%			0.287
Polykystose	14%	8.5%			
Interstitielle	4.7%	1.9%			
Maladie glomérulaire	1.2%	2.4%			
Diabète	0	2.8%			
ANA	56.5%	43.5%		[0.016-0.010]	0.008
suppléance en Fer					
Oui	61.6%	71.2%			
Non	38.4%	28.8%	0.649	[0.383-1.099]	0.106
Traitements Immunosuppresseurs					
Oui	36%	60.4%			
Non	64%	39.6%	0.370	[0.220- 0.622]	<0.001
Erythropoïétine£					
Oui	55.8%	44.8%			
Non	44.2%	55.2%	1.556	[0.939- 2.576]	0.085
Corticoides£					
Oui	23.3%	0%			
Non	76.7%	100%	1.303	[1.160-1.464]	<0.001
Anti hypertenseur £					
Oui	45.3%	42%			
Non	54.7%	58%	1.147	[0.692-1.899]	0.595
Insuline £					
Oui	2.3%	0%			
No	97.7%	100%	1.024	[0.991-1.058]	0.083
Héparine£					
Oui	10.5%	20.3%			
Non	89.5%	79.7%	0.459	[0.213-0.989]	0.043

£ : Ces traitements ont été pris des semaines avant et pendant la collecte des sérums ; ANA : anticorps anti-nucléaires

V-2-3- Effet de l'Adsorb-Out, DTT et l'EDTA sur la valeur de MFI de la BCP

La médiane de la BCP des sérums traités par le réactif Adsorb-Out était de 9334.89 ± 3667.313 . Après traitement par l'Adsorb-Out, DTT et l'EDTA, la moyenne de la BCP des sérums était respectivement de 11218.73, 13435.55, et 12382.41. La différence de la valeur de la BCP était statistiquement significative entre les sérums non traités et ceux traités par l'Adsorb-Out (9334.89 ± 3667.313 versus 11218 ± 3586.698 , $p < 0.001$), entre les sérums non traités et ceux traités par DTT (9334.89 ± 3667.313 versus 13435.55 ± 3281.207 , $p < 0.001$), et aussi entre les sérums non traités et ceux traités par EDTA (9334.89 ± 3667.313 versus 12382.41 ± 2842.969 , $p < 0.001$) (Tableau 7).

Tableau 7 : Valeur de MFI de la bille contrôle positive des sérums non traités et des sérums traités sur LaBScreen Mixed

Traitements	Valeur MFI de PC		P value
	Sérums traités	Sérums non traités	
Adsorb-Out	11218.73 ± 3586.698		<0.001
DTT	13435.55 ± 3281.207	9334.89 ± 3667.313	<0.001
EDTA	12382.41 ± 2842.969		<0.001

BCP : Bille contrôle positif ; **MFI :** Intensité moyenne de fluorescence ; **DTT :** Dithiothreitol; **EDTA:** l'acide tétra éthylène diamine

La différence de la valeur de la BCP était statistiquement non significative entre les sérums traités par l'Adsorb-Out et ceux par DTT, entre les sérums traités par l'Adsorb-Out et ceux par EDTA. Par contre, la différence entre les sérums traités par DTT et ceux par EDTA était statistiquement significative ($p < 0.001$).

La figure 21 montre que ces différents traitements ont augmenté la valeur MFI de la BCP dans la plupart des sérums.

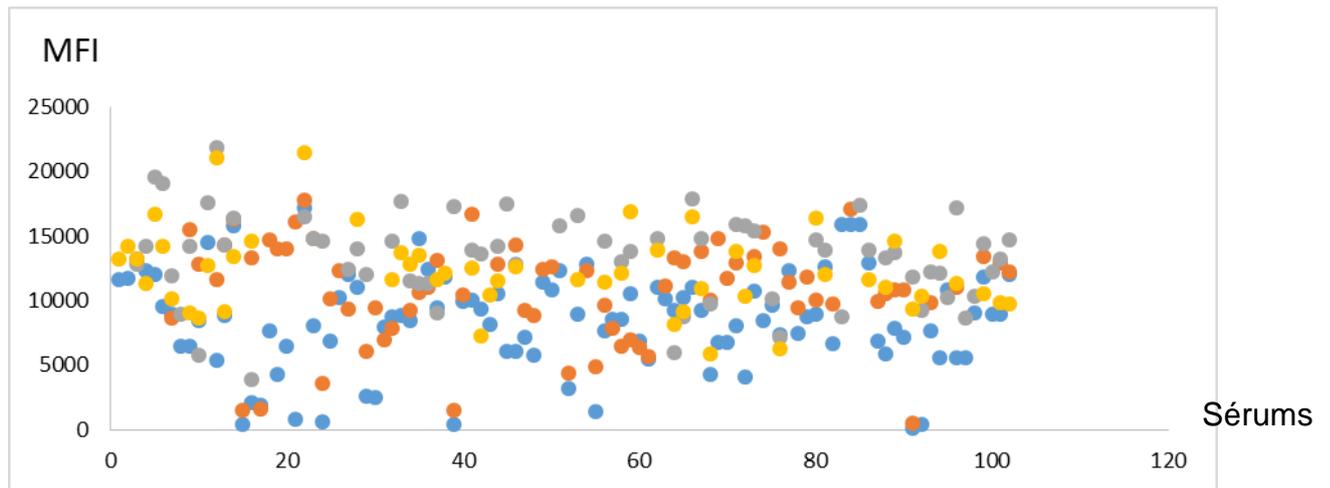


Figure 21 : Effet de l'Adsorb-Out, du DTT et de l'EDTA sur la valeur de MFI de la BCP

MFI : Intensité moyenne de fluorescence ; **Bleu** : BCN des sérums non traités ; **Orange** : BCN des sérums traités par l'Adsorb-Out ; **Gris** : BCN des sérums traités par DTT ; **Jaune** : BCN des sérums traités par l'EDTA.

VI- Discussion

La recherche des anticorps anti-HLA dans le sérum des patients en pré et post transplantation rénale est importante dans la surveillance clinique. Cette recherche a été facilitée par l'utilisation des techniques en phase solide telle que la technologie Luminex [79-81]. En dépit des avantages de haute sensibilité, la spécificité et la capacité semi-quantitative, la technologie Luminex présente quelque fois des valeurs de MFI élevées de la BCN au cours du LABScreen mixed [82, 84]. Ce bruit de fond résulte de liaisons non spécifiques à la BCN. Dans la littérature, les principales raisons responsables du bruit de fond sont les substances sériques ayant une affinité au latex tel que l'albumine, les anticorps anti-HLA d'isotype IgM et le C1 [65, 66, 68, 69, 70, 83]. Lorsque les valeurs MFI de la BCN sont élevées, les résultats de la recherche des anticorps anti-HLA sont ininterprétables au cours du LaBScreen mixed. Dans notre étude, nous avons constaté que les valeurs élevées de la BCN ne représentaient que 4% des sérums de nos patients. Ce phénomène est rare dans notre échantillon. Néanmoins, ces patients étaient en attente des résultats de la recherche d'anticorps anti-HLA qui permet l'évaluation de leur statut immunologique nécessaire à la décision clinique pour la transplantation.

Les valeurs élevées de la BCN étaient plus importantes dans les sérums des patients de sexe féminin que masculin (995 versus 430, $p= 0.018$). De multiples facteurs tels que la prédisposition génétique aux maladies auto-immunes [85, 86], la grossesse et les fausses couches [87, 88, 89] séparés ou assemblés peuvent favoriser les interactions non spécifiques donnant des valeurs élevées de BCN chez les femmes. Renato de Marco et al ont constaté que le stockage des sérums de plus de 7 jours à -20°C est associé à des valeurs élevées de la BCN [90]. Dans notre étude, la durée de stockage n'a pas influencé les valeurs de la BCN.

Dans ce travail, le traitement des sérums par l'Adsorb-Out a réduit les valeurs de la BCN six fois par rapport à la valeur initiale dans les sérums non traités (87 versus 595, $p < 0.001$). Ce résultat montre l'efficacité de l'Adsorb-Out pour réduire le bruit de fond. Il est bien connu que le réactif Adsorb-Out contient des microparticules qui bloquent les substances qui se lient de façon non spécifique aux latex. Reva H. Goggins et al ont eux aussi traité leurs sérums avec l'Adsorb-Out lorsque les valeurs de BCN étaient élevées [91]. Ils ont constaté que l'Adsorb-Out a diminué les valeurs de BCN dans 57% des sérums. Dans notre échantillon, ce taux était légèrement plus haut de 62.2%. Cette légère différence peut être expliquée par le

seuil de MFI choisi par l'équipe de Reva H. Goggins et qui était de 300 alors que dans notre étude le seuil était de 150. Cependant, notre taux de 62.2% reste inférieur au taux rapporté par le fournisseur et qui est de 80%. Cette différence peut être due au fait que le fournisseur traite les sérums plusieurs fois par l'Adsorb-Out jusqu'à l'élimination des substances.

Nous avons observé que l'effet de l'Adsorb-Out était remarquable dans les sérums des patients avec une valeur de la BCN supérieure à 500 MFI. De plus l'ajustement sur l'âge des patients, le sexe et l'événement immunisant a montré que l'effet de l'Adsorb-Out ne dépendait que de la valeur initiale de la BCN. Cet effet laisse supposer que peut être les interférences non spécifiques réelles ne doivent être considérées qu'au-delà d'une MFI de 500.

L'Adsorb-Out n'avait aucun effet sur la valeur de la BCN dans 12.3% des cas. Il peut s'agir d'une concentration élevée de substances sériques ayant une affinité pour le latex et qui nécessite plusieurs traitements par l'Adsorb-Out [70]. Pour notre pratique, cette procédure reste trop coûteuse. Dans ces sérums, la cause du bruit de fond peut ne pas constituer une cible de l'Adsorb-Out. Les sérums de ces patients peuvent avoir besoin d'un autre traitement comme l'EDTA et le DTT utilisés respectivement par d'autres équipes : Schnaidt.M et al, Kosmoliaptsis V et al [65, 66, 68, 69, 70].

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons comparé l'effet de l'Adsorb-Out, l'EDTA et le DTT sur la valeur de la BCN. Dans notre échantillon, tous les prétraitements ont réussi à réduire la valeur de la BCN. Le prétraitement le plus efficace était l'Adsorb-Out suivi par le DTT et le moins efficace était l'EDTA. D'autre part, l'Adsorb-Out a diminué les valeurs de la BCN dans les deux tiers des sérums (69.2%), le DTT dans presque la moitié des sérums (43%) et l'EDTA dans le tiers des sérums (30%). Dans la littérature, Il est connu que le DTT dissocie les ponts disulfures des complexes IgM [65, 92]. L'EDTA a été utilisé pour la destruction des tétramères du complément C1q [68, 69, 93]. Dans nos sérums, les interférences secondaires au latex sont peut-être plus fréquentes que les interférences secondaires aux IgM ou aux C1.

Pour certains sérums, nous avons constaté que l'Adsorb-Out, le DTT et de l'EDTA n'ont aucun effet. L'action spécifique de chaque prétraitement contre une cible bien définie peut expliquer leur inefficacité dans ces sérums. L'effet des prétraitements est observé lorsque le bruit de fond est secondaire à la présence de cette cible. Dans certains de ces sérums, les

prétraitements avaient augmenté la valeur de MFI de la BCN. Ces sérums peuvent avoir besoin d'un double prétraitement ou de deux traitements successifs au cours de la même analyse.

Dans la littérature, plusieurs facteurs spécifiques aux patients ont été associés à un niveau élevé du bruit de fond tel que le type de maladie, le médicament immunosuppresseur, la présence d'hyperlipidémie, mais la plupart sont inconnus [94]. Dans cette étude, nous avons comparé nos sérums avec des sérums témoins (valeurs normales de la BCN) en fonction de la néphropathie, des auto-anticorps et des traitements pris au cours de la période où l'analyse a été réalisée. La valeur élevée de la BCN a été associée à la prise de corticoïdes, des immunosuppresseurs, et de l'héparine. Chez ces patients, les corticoïdes et les immunosuppresseurs ont été utilisés pour prévenir le rejet de greffe. Ces traitements inhibent et réduisent la production des anticorps anti-HLA [22, 30]. Plusieurs études ont montré que les immunosuppresseurs comme la globuline antithymocyte, l'inhibiteur du protéasome bortezomib et l'eculizumab (un inhibiteur du complément C5) peuvent provoquer des valeurs de MFI élevées de la BCN [95, 96, 97]. Le mécanisme de cette réaction est inconnu.

L'administration de l'héparine permet de fluidifier le sang en inhibant la transformation du fibrinogène en fibrine. Elle bloque ainsi la formation de thrombus. Au cours de la recherche des anticorps anti-HLA, le prélèvement est collecté sur un tube sec. Chez les patients traités par l'héparine, une quantité du fibrinogène (qui a une affinité pour le latex) reste soluble dans le sérum.

Nous avons observé que les patients ayant une recherche positive des ANA ont une valeur élevée de la BCN. Plusieurs équipes ont incriminé la dose élevée d'immunoglobulines intraveineuse G (IVIG) dans le cas de bruit de fond. Il a été signalée comme augmentée plus de cinq fois après le traitement des patients bénéficiant d'un traitement aux IVIG [95, 96].

VII- Conclusion et perspective

Au cours du LaBScreen Mixed, certains sérums peuvent contenir différentes substances qui interfèrent avec la BCN donnant un bruit de fond élevé. L'Adsorb-Out est le réactif préconisé par le fournisseur pour réduire le bruit de fond. Il bloque les substances sériques qui présentent une affinité au latex. Le fournisseur rapporte une efficacité de l'Adsorb-Out dans 80% des cas. Dans notre étude, Ce réactif était efficace dans 69.2% des cas. Pour les 11% restants, Il peut s'agir d'une concentration élevée de substances sériques ayant une affinité pour le latex et qui nécessite plusieurs traitements par l'Adsorb-Out. Les autres sérums (20%) peuvent contenir des substances administrées aux patients comme les traitements immunosuppresseurs. Ces substances qui sont la cause du bruit de fond peuvent ne pas constituer une cible de l'Adsorb-Out. Les sérums de ces patients peuvent avoir besoin d'autres prétraitements comme l'EDTA et le DTT. Ces prétraitements sont présents sur le marché et sont décrits et recommandés par des équipes dans le cas d'une valeur élevée de la MFI de la BCN. L'action spécifique de chaque prétraitement dépend de la présence d'une cible bien définie. Certains sérums peuvent contenir des substances inconnues qui ne constituent pas la cible des prétraitements.

Nous suggérons pour ces sérums :

- L'utilisation d'un autre réactif ou de billes magnétiques, mais il y aura un souci de comparaison avec les sérums testés par LaBScreen Mixed.
- Le passage à une technique plus sensible et plus spécifique comme le single Antigène, qui est réalisée sur la même technologie d'où le risque d'avoir les mêmes limites que la recherche.
- Le retour à la technique ELISA, mais il y a un problème de sensibilité.

Nous avons remarqué que les sérums ayant une valeur MFI élevée de la BCN au cours de la recherche des anticorps anti-HLA montrent une légère augmentation pendant l'analyse d'identification. Cette légère augmentation peut être provoquée par le C1q. Pour ces sérums, nous prévoyons la réalisation systématique de l'analyse d'identification des anticorps anti-HLA avec un prétraitement par l'EDTA. Enfin, nous sommes justes au commencement d'utiliser le prétraitement EDTA au cours de l'analyse d'identification des anticorps anti-HLA afin d'évaluer son impact sur les spécificités d'anticorps identifiées.

Résumé

Introduction : La recherche des anticorps anti-HLA en pré et post greffe rénale est indispensable pour la surveillance clinique. Cette recherche réalisée par la technologie Luminex peut être ininterprétable lorsque la bille négatif contrôle (BCN) présente des valeurs de fluorescence (unité : MFI) élevées. Plusieurs traitements des sérums à tester sont relatés par les équipes qui s'intéressent au sujet : le réactif Adsorb-Out, le Dithiothreitol (DTT) et l'Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA).

L'objectif de ce travail est la comparaison des différents prétraitements selon leur effet sur les valeurs de la fluorescence de la BCN.

Matériels et méthodes : La recherche d'anticorps anti-HLA a été réalisée sur 3500 sérums, 166 (4%) sérums ont présenté une valeur de BCN supérieure à 150 de MFI qui est le seuil acceptable. Parmi ces 166 sérums, 104 ont été traités par l'Adsorb-Out, 121 par DTT et 97 par EDTA puis retestés avec la même technologie.

Résultats : Nos résultats ont montré que tous les prétraitements ont diminué les valeurs de MFI élevées de la BCN. Le traitement par l'Adsorb-Out a abouti à la meilleure diminution de la MFI de la BNC et ceci dans 69.2% des cas, suivi par le DTT dans 43% des cas et l'EDTA dans 30% des cas. Les médicaments pris au cours de la recherche des anticorps anti-HLA comme les corticoïdes, les immunosuppresseurs, l'héparine, et la présence dans le sérum des anticorps antinucléaires sont associés avec les valeurs de MFI élevées de la BCN.

Conclusion : Tous les traitements ont réussi à réduire la valeur initiale de la BCN. Mais ils n'avaient aucun effet sur quelques sérums. Nous suggérons l'utilisation d'autre réactif ou de billes magnétiques, le passage à une technique plus sensible et plus spécifique comme le single Antigène, ou le retour à la technique ELISA.

Mot clés : Luminex, anticorps anti-HLA, bille contrôle négatif, Adsorb-Out, DTT, EDTA.

Abstract

Introduction: The anti-HLA antibodies screening in pre and post-renal graft is essential for clinical monitoring. This screening carried out by Luminex technology can be uninterpretable when the negative control bead exhibits high fluorescence values (MFI). Several sera treatments were tested are reported by teams interested in the subject: Adsorb-Out reagent, Dithiothreitol (DTT) and the Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid (EDTA).

The objective of this work is to compare the different pretreatments according to their effect on the fluorescence values of the negative control bead (BCN).

Materials and methods: Anti-HLA antibody screening was performed on 3500 sera, 166 (4%) sera had BCN value greater than 150 of MFI that is the acceptable threshold. within 166 sera, 104 were treated by Adsorb-Out, 121 by DTT and 97 by EDTA and then retested with the same technology.

Results: Our results showed that all pretreatments decreased the BCN high MFI values. The Adsorb-Out Treatment had the best decrease of BNC MFI in 69.2% of cases, followed by DTT in 43% of cases and EDTA in 30% of cases. We found that drugs taken during the anti-HLA antibodies screening such as corticosteroids, immunosuppressive, heparin, and the presence of antinuclear antibodies in patients sera are associated with high MFI values of BCN.

Conclusion: This phenomenon of high MFI values of BCN is rare in our sera. All treatments have succeeded to reduce the initial value of the BCN. Nevertheless, they had no effect on some sera. For these sera, we suggest the use of another reagent or magnetic beads, switching to a more sensitive and specific techniques such as the single Antigen, or the return to the ELISA technique.

Key words: Luminex, Anti-HLA antibody, negative control bead, Adsorb-Out, DTT, EDTA.

ملخص

مقدمة: البحث عن الأجسام المضادة المضادة هلا قبل وبعد عملية زرع الكلى أمر ضروري للمراقبة السريرية. هذا البحث عن طريق تكنولوجيا لومينكس يمكن أن يكون غير قابل للتفسير عندما تكون الكرة السيطرة السلبية لديها قيمة شدة متوسطة لإشعاع عالية. وذكرت العديد من العلاجات اختبار الأمصال من قبل الفرق المهتمة في: كثف خارج كاشف، كل معاملة لديها آلية محددة جيدا من العمل. (EDTA) والإيثيلين ديامين رباعي الخليك (DTT) Dithiothreitol والهدف المحدد.

موضوع: الهدف من هذا العمل هو المقارنة بين المعاملات المختلفة وفقا لتأثيرها على شدة متوسطة لإشعاع من الكرة السيطرة السلبية

المواد والطرق: تم البحث عن الأجسام المضادة ا على 3500 مصل، وكان 166 (4%) مصل بين أكثر من 150 قيمة شدة متوسطة لإشعاع وهو عتبة مقبولة. من هذه المصلات 166، تم علاج 104 مع أذروب خارج، 121 مع دت و97 مع إدنا ومن ثم إعادة اختبارها مع نفس التكنولوجيا

النتائج: أظهرت نتائجنا أن جميع المعالجات المسبقة انخفضت من قيم مؤسسات التمويل الأصغر العالية للبنك الأهلي التجاري. وأدى العلاج بالامتزاز إلى أفضل انخفاض في مؤسسات التمويل الأصغر في 69.2% من الحالات، تليها دت في مثل HLA 43% من الحالات وإدنا في 30% من الحالات. وجدنا أن الأدوية التي يتم تناولها أثناء تفتيش الأجسام المضادة الستيرويدات، الأدوية المثبطة للمناعة، الهيبارين

الاستنتاج: هذه الظاهرة من قيم مؤسسات التمويل الأصغر العالية من بن نادرة في مصلنا. وتمكنت جميع العلاجات من تقليل القيمة الأولية للبنك الأهلي التجاري. ولكن لم يكن لها تأثير على بعض المصل. نقترح لهذه المصل استخدام كاشف آخر أو الخرز المغناطيسي، والانتقال إلى تقنية أكثر حساسية ومحددة مثل مستضد واحد، أو العودة إلى تقنية إليسا

الكلمات الرئيسية: لومينكس، المضادة-هلا، الأجسام المضادة، سلبية الكرة السيطرة، امتزاز-خارج، دت، إدنا

VIII- Références

- [1] Cohen DJ, Christensen LL, Bloom RD, Sung RS. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1995-2004. *Am J Transplant* 2006; 6: 1153-69.
- [2] Bonal J, Cleries M, Velae. Transplantation versus haemodialysis in elderly patients. Renal Registry Committee. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 261-64.
- [3] Johnson DW, Herzig K, Purdie D, et al. A comparison of the effects of dialysis and renal transplantation on the survival of older uremic patients. *Transplantation* 2000; 69: 794-99.
- [4] Benghanem Gharbi M, Hachim K, Ramdani B, Fatihi E, Zahiri K, Zaïd D. Transplantation rénale au Maroc : combien ça coûte? *Cahiers du Médecin* 1997; 1, 4:39-45.
- [5] Legendre C. Les nouvelles modalités de suivi des patients transplantés rénaux. *Nephrol Ther* 2008; 4:S1-2.
- [6] Futagawa Y, Terasaki PI. ABO incompatible kidney transplantation an analysis of UNOS Registry data. *Clin Transplant* 2005; 20: 122-26.
- [7] Magee CC. Transplantation across previously incompatible immunological barriers. *Transpl Int* 2006; 19:87-97.
- [8] Aydingoz SE, Takemoto SK, Pinsky BW, Salvalaggio PR, Lentine KL, Willoughby L, et al. The impact of human leukocyte antigen matching on transplant complications and immunosuppression dosage. *Hum Immunol* 2007; 68: 491-9.
- [9] Moalic V. Comment est réalisé un typage HLA ? *Reanimation* 2008; 17: 407-11.
- [10] Piazza A, Poggi E, Ozzella G, Borrelli L, Monaco PI, Scornajenghi A, et al. Public epitope specificity of HLA class I antibodies induced by failed kidney trans-plant: alloantibody characterization by flow cytometric techniques. *Transplantation* 2006; 81:1298-05.
- [11] El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Hum Immunol* 2005; 66:989-97.
- [12] Phelan D, Mohanakumar T, Ramachandran S, Jendrisak M. Living donor renal transplantation in the presence of donor-specific human leukocyte antibody detected by solid-phase assay. *Hum Immunol* 2009; 70:584-8.

- [13] Moalic V, Mercier B, Ferec C. Technologie Luminex™ : principe, applications et perspectives. *Immunoanal Biol Spec* 2004; 19:181-87.
- [14] Clatworthy MR, Espeli M, Torpey N, Smith KG. The generation and maintenance of serum alloantibody. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22(5): 669-81.
- [15] Colombani J. HLA : fonctions immunitaires et applications médicales. Paris : John Libbey Eurotext, 1993: 23-30, 39-47, 69-77.
- [16] Cesbron Gautier A, Gagne K, Retière C, Devys A, Bignon J. *Système HLA*. EMC 2007.
- [17] WWW.HLA.alleles.org.
- [18] Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet*. 2008; 35(3):179-92.
- [19] Van Oosterhout C. A new theory of MHC evolution: beyond selection on the immune genes. *Proc Biol Sci*. 2009; 657-65.
- [20] Schwartz BD, Luehrman LK, Rodey GE. HLA public determinants are target antigens of cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med*. 1980; 152: 340s-50s.
- [21] Schwartz BD, Luehrman LK, Lee J, Rodey GE. A public antigenic determinant in the HLA-B5 cross-reacting group--a basis for cross-reactivity and a possible link with Behcet's disease. *Hum Immunol*. 1980; 1(1):37-54.
- [22] Fuller AA, Trevithick JE, Rodey GE, Parham P, Fuller TC. Topographic map of the HLA-A2 CREG epitopes using human alloantibody probes. *Hum Immunol*. 1990; 28(3):284-05.
- [23] Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969; 280(14):735-39.
- [24] Halloran PF, Wadgyamar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation* 1990; 49:85-91.
- [25] Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 1992; 53:550-55.

- [26] Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis II. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation* 2004; 78:190-93.
- [27] Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, Bachelet T, Moreau K, Morel D, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation*. 2010; 91(5): 527-35.
- [28] Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, Tanriover B, Crew RJ, Dube G, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(12): 2061-71.
- [29] Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hene RJ, van Zuilen AD. Pretransplant donor-specific HLA class-I and class II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant*. 2012; 12(6): 1618-23.
- [30] Mohanakumar T, Rhodes C, Mendez-Picon G, Goldman M, Moncure C, Lee H. Renal allograft rejection associated with presensitization to HLA-DR antigens. *Transplantation*. 1981; 31(1):935.
- [31] Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2011; 11(10): 2132-43.
- [32] Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2009; 9: 2561-70.
- [33] Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, et al. Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. *Am J Transplant* 2007; 7: 832-41.
- [34] Hill GS, Nochy D, Bruneval P, et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 975-83.
- [35] Smith RN, Kawai T, Boskovic S, et al. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in *Cynomolgus* monkeys. *Am J Transplant* 2008; 8: 1662-72.

- [36] Haas M, Mirocha J. Early ultrastructural changes in renal allografts: correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2011; 11: 2123-31.
- [37] Sis B, Einecke G, Chang J, et al. Cluster analysis of lesions in nonselected kidney transplant biopsies: microcirculation changes, tubulointerstitial inflammation and scarring. *Am J Transplant* 2010; 10: 421-30.
- [38] McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000; 69(3): 319-26.
- [39] Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2009; 87(10): 1505-13.
- [40] Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation*. 2013; 95(3): 410-7.
- [41] Gloor JM, Winters JL, Cornell LD, Fix LA, DeGoey SR, Knauer RM, et al. Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2010; 10(3): 582-89.
- [42] Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Pochinco D, Birk PE, Ho J, et al. Rates and Determinants of Progression to Graft Failure in Kidney Allograft Recipients With De Novo Donor-Specific Antibody. *Am J Transplant*. 2015; 15(11): 2921-30.
- [43] Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012; 12(5): 1157-67.
- [44] Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, Santos-Nunez E, Steggar C, Galliford J, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 2012; 94(2): 172-7.
- [45] Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant*. 2009; 9(11): 2532-41. 353.

- [46] Devos JM, Gaber AO, Teeter LD, Graviss EA, Patel SJ, Land GA, et al. Intermediate-term graft loss after renal transplantation is associated with both donor-specific antibody and acute rejection. *Transplantation*. 2014; 97(5): 534-40.
- [47] Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thauinat O, Dubois V, et al. Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27(2):615-25.
- [48] Supon P, Constantino D, Hao P, Cagle L, Hahn A, Conti DJ, Freed BM. Prevalence of donor-specific anti-HLA antibodies during episodes of renal allograft rejection. *Transplantation*. 2001; 71(4): 577-80.
- [49] Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant*. 2009; 9(11): 2532-41.
- [50] Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant sub-set of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* 2011; 72: 849-58.
- [51] Freitas MC, Rebellato LM, Ozawa M, et al. The role of immunoglobulin-G sub-classes and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation* 2013; 15: 113-9.
- [52] Daha N. A., Banda, N. K., Roos, A., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Daha, M. R., et al.. Complement activation by (auto) antibodies. *Mol. Immunol*. 2011; 48, 1656-1665.
- [53] Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberu J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in non alloimmunized healthy males. *Transplantation*. 2008; 86(8): 1111-5.
- [54] Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, et al. Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. *Am J Transplant*. 2013; 13(8): 2075-82.
- [55] Doxiadis II, Roelen D, Claas FH. Mature wines are better: CDC as the leading method to define highly sensitized patients. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010; 15(6): 716-9.
- [56] Schwartz BD, Luehrman LK, Rodey GE. HLA public determinants are target antigens of cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med*. 1980; 152(2 Pt 2): 340s-50s.

- [57] Zachary AA, Ratner LE, Graziani JA, Lucas DP, Delaney NL, Leffell MS. Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance. *Hum Immunol* 2001; 62: 236-46.
- [58] Pretl K, Chesterton KA, Sholander JT, Leffell MS, Zachary AA. Accurate, rapid characterization of HLA-specific antibody using Luminex technology. *Hum Immunol* 2003; 64: S108.
- [59] Scholander JT, Graziani JA, Schillinger KP, Zachary AA, Leffell MS. Luminex technology for tests of HLA-specific antibodies. *Hum Immunol* 2002; 63 (10 suppl): S15.
- [60] Ray BL, Ebner D, Balazs I. Identifying HLA alloantibodies using Luminex microspheres. *Hum Immunol* 2002; 63 (10 suppl): S85.
- [61] Goggins R, Lorber MI, Geiselhart LA. Luminex labscreen mixed as a qualitative antibody-screening assay. *Hum Immunol* 2002; 63 (10 suppl): S104.
- [62] Bray RA, Wilmoth-Hosey L, Chapman P, Gebel HM. Utility of labscreen for the identification and characterization of HLA alloantibodies. *Hum Immunol* 2002; 63 (10 suppl): S16.
- [63] B. D. Tait, F. Hudson, G. Brewin, L. Cantwell & R. Holdsworth. Solid phase HLA antibody detection technology – challenges in interpretation. *Tissue Antigens* 2010; 76, 87-95.
- [64] Angeloni S, Cordes R, Dunbar S, Garcia C, Gibson G, Martin C, Stone V. xMAP Cookbook, 1st edition, 2013.
- [65] Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Peacock S, et al. Detection of immuno-globulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation* 2009; 87: 813.
- [66] Kosmoliaptsis V, O'Rourke C, Bradley JA, et al. Improved Luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum Immunol* 2010; 71: 45.
- [67] Butch AW. Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon. *Clin Chem* 2000; 46: 1719.

- [68] Schnaidt, M., Jurisic, M., Schmid-Horch, B., Wernet, D., Ender, A. & Weinstock, C. Luminex single antigen bead testing: adding EDTA to serum abolishes the hook effect. *Clinical Laboratory* 2011; 57: S8.
- [69] Schnaidt, M., Weinstock, C., Jurisic, M., Schmid-Horch, B., Ender, A. & Wernet, D. HLA antibody specification using single-antigen beads– a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011; 92: 510.
- [70] Schnaidt M, Weinstock C. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Internat J Immunog*, 2013, 40: 171-77.
- [71] Zachary, A.A., Lucas, D.P., Detrick, B. & Leffell, M.S. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum Immun* 2009; 70: 496.
- [72] www.onelambda.com. LABScreen reagents. Catalog ADSORB 2014; rev 3.
- [72] Joos TO, Stoll D, Templin MF. Miniaturized multiplexed immunoassays. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 6:76-80.
- [74] Keij JF, Steinkamp JA. Flow cytometric characterization and classification of multiple dual-color fluorescent microspheres using fluorescence lifetime. *Cytometry* 1998; 33: 318-23.
- [75] Kettman J, Davies T, Chandler D, Olivier K, Fulton R. Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets. *Cytometry* 1998; 33: 234-43.
- [77] Vignali DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 2000; 243: 243-55.
- [78] Lakomy D, Olsson N O. Apport du multiplexage en pratique diagnostique immunologique. *Revue francophone des laboratoires* 2008, 38, 59-66.
- [79] Pei, R., Lee, JH., Shih, NJ., et al., Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2003; 75 (1) 43-49.
- [80] Fuggle, S.V., Martin, S., Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation* 2008; 86 (3) 384-390.

- [81] Taylor, C.J., Kosmoliaptsis, V., Summers, DM., et al., Back to the future: application of contemporary technology to long-standing questions about the clinical relevance of HLA-specific alloantibodies in renal transplantation. *Hum Immunol* 2009; 70 (8): 563-568.
- [82] Tait, B.D., Süsal, C., Gebel, HM., et al., Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95 (1): 19-47.
- [83] Newell H, Smith JD, Rogers P, et al. Sensitization following LVAD implantation using leucodepleted blood is not due to HLA anti-bodies. *Am J Transplant* 2006; 6: 1712.
- [84] Billen, E.V., Christiaans, MH., Lee, J., et al., Donor-directed HLA antibodies before and after transplantectomy detected by the luminex single antigen assay. *Transplantation* 2009; 87(4): 563-69.
- [85] Perricone, C., de Carolis, C., Perricone, R., Pregnancy and autoimmunity: a common problem. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2012; 26(1): 47-60.
- [86] Mecacci, F., Pieralli, A., Bianchi, B., et al., The impact of autoimmune disorders and adverse pregnancy outcome. *Semin Perinatol* 2007; 31(4): 223-226.
- [87] Regan, L., Braude, PR., Hill, DP., A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. *Hum Reprod* 1991; 6(2): 294-298.
- [88] Densmore TL1, Goodnough LT, Ali S, et al., Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion* 1999; 39(1): 103-106.
- [89] Morin-Papunen, L, Tiilikainen, A, Hartikainen-Sorri, AL., Maternal HLA immunization during pregnancy: presence of anti HLA antibodies in half of multigravidous women. *Med Biol* 1984; 62(6): 323-325.
- [92] Taylor CJ, Chapman JR, Ting A, Morris PJ. Characterization of lymphocytotoxic antibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation: relationship to primary and regraft outcome. *Transplantation* 1989; 48: 953-58.
- [93] Arnold JN, Wormald MR, Suter DM, et al. Human serum IgM glycosylation: Identification of glycoforms that can bind to mannan-binding lectin. *J Biol Chem* 2005; 280(32): 29080-87.

[94] Thomas M. Ellis. Interpretation of HLA single antigen bead assays. *Transplant reviews* 2013; 27: 108-11.

[95] Newell H, Smith JD, Rogers P, et al. Sensitization following LVAD implantation using leucodepleted blood is not due to HLA antibodies. *Am J Transplant* 2006; 6: 1712.

[96] Badders JL, Houp JA, Sholander JT, et al. Considerations in interpreting solid phase antibody data. *Hum Immunol* 2010; 71: S18.

[97] Gloor JM, Moore SB, Schneider BA, et al. The effect of antithymocyte globulin on anti-human leukocyte antigen antibody detection assays. *Transplantation* 2007; 84: 258.

[98] Masson E, Devillard N, Cabod J, et al. Misleading de novo detection of serum anti-HLA-A3 antibodies in kidney recipients having received ATG before transplantation. *Transplantation* 2010; 71: 170.

IX- Annexes

Annexe 1

DEMANDE D'ANALYSES D'HISTOCOMPATIBILITE

Date :

Nom et Prénom :

Date de naissance :

N° d'entrée :

Structure et service :

Médecin prescripteur :

Diagnostic, signes cliniques, résultats précédents :

RDV LE :

Analyses demandées :

Typage HLA classe I

Typage HLA classe II

Recherche d'anticorps anti HLA

Identification d'anticorps anti HLA

Cross match lymphocytaire

Cachet et signature :

Annexe 2

Fiche Sérothèque

Nom et prénom :

N° patient : 1028

Transplantation : 08/06/2017

Détransplantation :

Even Immu	Date	Date	Date	Date	Date	Date
Transfusion						
Grossesse						
RAS	10/12/15					

Congélation			Recherche d'anticorps anti HLA				SA
Date	N°	Boite-position	Type	Date	Classe I	Classe II	
29/01/2015	15-1028-1	Boite 172 E5, E6, E7, E8	LSM	09/02/2015	NEG	NEG	
28/07/2015	15-1028-2	Boite 172 E10, F1, F2, F3	LSM	10/11/2015	NEG	NEG	
30/11/2015	15-1028-3	Boite 172 F4, F5, F6, F7	LSM	15/12/2015	NEG	NEG	
02/08/2016	16-1028-4	Boite 172 F8, F9, G1, G2	LSM	04/08/2016	NEG	NEG	
03/05/2017	17-1028-5	Boite 172 G3, G4, G5, G6	Cross Match	03/05/2017	NEG	NEG	
08/06/2017	17-1028-6	Boite 172 G7, G8, G9, H1	LSM	15/06/2017	POS	POS	

Fiche de stockage des sérums

Annexe 3

LSM Detail

Approved By:

Date:

Session ID: 170620_LSM3D_20170620_124429

Catalog ID: LSM12NC17_021_00

NS Sample: NC

Background Values

003	94.9	004	97.58	005	129.83	007	93.57	009	103.02	012	98.14	013	84.11	014	95.38	016	98.72	017	90.23
019	105.51	023	86.17	025	61.16	033	104.96	035	68.38	050	66.34	065	76.61	068	97.37	097	78.97	NC	51.96

Class I	Positive Cutoff:	1.5	Negative Cutoff:	1.2	NC Threshold:	50	Class I	Sensitivity/MFI:	0
Class II	Positive Cutoff:	1.5	Negative Cutoff:	1.2	NC Threshold:	50	Class II	Sensitivity/MFI:	0
MIC	Positive Cutoff:	1.5	Negative Cutoff:	1.2	NC Threshold:	50	HNA	Sensitivity/MFI:	0

Patient ID: RER 1354

Patient Name:

Local ID:

Status:

Transplant Type:

[39(I,G5)16-1354-1

Class I						Class II					
Overall	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count	Overall	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count
Positive	003	Positive	324.26	5.11	121	Positive	025	Negative	104.32	0.71	115
	004	Positive	315.88	4.94	163		033	Positive	173.12	1.97	157
	005	Positive	350.85	3.62	134		035	Negative	111.18	0.85	139
	007	Positive	253.68	3.70	155		050	Negative	107.03	0.77	155
	009	Positive	315.4	4.83	163		065	Negative	122.04	1.07	140
	012	Positive	517.3	8.97	129						
	013	Positive	368.38	5.99	187						
	014	Positive	231.78	3.26	158						
	016	Positive	257.63	3.78	102						
	017	Positive	293.44	4.49	172						
	019	Positive	292.7	4.18	100						
	023	Positive	233.04	3.29	120						
MIC											
Overall	Bead	Result	Raw Data	Ratio	Count						
Positive	068	Positive	195.05	2.53	137						
	097	Undetermined	134.48	1.31	152						

Sample Date:		
NC	68.73	119
PC	14392.18	173
PC/NC Ratio		209.4

Sec. Ab:

Saved By: STSH,STSH

Confirmed By:

Comment:

User Comment:

Treatment:

Saved Date: Jun 20, 2017

Confirmed Date:

Résultat du LaBScreen Mixed