



HAL
open science

Développement d'un outil d'aide à l'interprétation des résultats de tests de Single Antigen HLA dans le cadre de la greffe d'organes

Bastien Cauquil

► **To cite this version:**

Bastien Cauquil. Développement d'un outil d'aide à l'interprétation des résultats de tests de Single Antigen HLA dans le cadre de la greffe d'organes. Sciences pharmaceutiques. 2019. hal-03297977

HAL Id: hal-03297977

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297977>

Submitted on 23 Jul 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE 2019

FACULTE DE PHARMACIE
MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de Biologie Médicale

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 27 Novembre 2019

Par Bastien CAUQUIL

né (e) le 21 Janvier 1992

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Titre

Développement d'un outil d'aide à l'interprétation des résultats de tests de Single
Antigen HLA dans le cadre de la greffe d'organes.

Membres du Jury

Président : Pr Danièle Bensoussan

Juges : Pr Pierre Tiberghien
Dr Arnaud Dupuis
Dr Guillaume Dautin

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2018-2019

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Communication

Innovation pédagogique

Référente ADE

Référente dotation sur projet (DSP)

Marie-Paule SAUDER

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Marie-Paule SAUDER

Responsabilités

Filière Officine

Filière Industrie

Filière Hôpital

Pharma Plus ENSIC

Pharma Plus ENSAIA

Pharma Plus ENSGSI

Cellule de Formation Continue et Individuelle

Commission d'agrément des maîtres de stage

ERASMUS

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Xavier BELLANGER

Igor CLAROT

Luc FERRARI

François DUPUIS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Pierre LEROY

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Claude BLOCK

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

Marie-Madeleine GALTEAU

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Gérald CATAU

Thérèse GIRARD
 Michel JACQUE
 Pierre LABRUDE
 Vincent LOPPINET
 Alain NICOLAS
 Janine SCHWARTZBROD
 Louis SCHWARTZBROD

Jean-Claude CHEVIN
 Jocelyne COLLOMB
 Bernard DANGIEN
 Marie-Claude FUZELLIER
 Françoise HINZELIN
 Marie-Hélène LIVERTOUX
 Bernard MIGNOT
 Blandine MOREAU
 Dominique NOTTER
 Francine PAULUS
 Christine PERDICAKIS
 Marie-France POCHON
 Anne ROVEL
 Gabriel TROCKLE
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU
 Colette ZINUTTI

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
 Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section CNU

*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPPPEL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine CAPIZZI BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT ^H	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN ^H	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER ^H	85	Chimie Physique
Cédric BOURA ^H	86	Physiologie
Joël COULON ^H	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAÏ ^H	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS ^H	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER ^H	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD ^H	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT ^H	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU

*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN ^H	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	86	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL ^H	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET ^H	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ^H	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU ^H	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD

11 *Anglais*

^H *Maître de conférences titulaire HDR*

* *Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES À LEUR AUTEUR ».

Remerciements

Je remercie le Professeur Pierre Tiberghien qui, par son soutien, a permis à ce projet de voir le jour et qui, grâce à nos nombreuses discussions, m'a toujours aidé à progresser.

Je remercie le Professeur Danièle Bensoussan d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.

Je remercie le Docteur Arnaud Dupuis qui m'a accueilli chaleureusement à Strasbourg : Tu m'as toujours ouvert la porte de ton bureau et donné des conseils avisés et précieux lorsque je t'ai sollicité.

Je remercie le Docteur Guillaume Dautin qui m'a donné accès au domaine de l'Immunogénétique pour mener un Master 2 et qui a toujours suivi mon travail.

Je remercie toutes les équipes avec lesquelles j'ai travaillées à Dijon, Besançon et Strasbourg : la réalisation de ce travail est aussi le fruit de leur soutien et de leur aide.

À ma petite Maman et à mon Père.

À ma Sœur.

À la famille que j'ai trouvée à Dijon.

À ceux qui me manquent : les Salvetois BdL et la Meute.

Table des Matières

I – Introduction	9
1 - Généralités sur le HLA (Human Leukocyte Antigen)	9
2 - Rappel de Nomenclature	9
3 - Expression et fonction des molécules HLA	9
Les molécules HLA de classe I :	10
Les molécules HLA de classe II :	10
4 - Les anticorps (Ac) anti-HLA	10
Origine	10
a) Grossesse	11
b) Transplantation	11
c) Transfusion	11
d) Ac Anti-HLA naturels	11
Définition des concepts d'épitopes et eplets	12
Pathogénicité	12
5 - Dépistage et identification des Ac anti-HLA	13
Techniques disponibles	13
a) La Micro-LymphoCytoToxicité	13
b) La cytométrie en flux	14
c) Le Luminex	14
Avantages et inconvénients de la technique Luminex	15
6 - Le système HLA et les greffes	15
7 - Objectif du travail	16
II – Présentation du travail réalisé sous la forme d'un article scientifique	19
1 - Introduction:	22
2 - Methods:	24
2.a) Justification of A1 and A2	24
2.b) Proposed model	24
2.c) Proposed analysis method and implementation	25
3 - Results	26
Justification of the two assumptions	26
Presentation of three patient analyze results and comparison with the HLAMatchmaker ones:	28
4 - Discussion:	35

The Model and the assumptions:	35
Results discussion:	36
Perspectives:	36
5 - Conclusion:	39
III – Discussion	41
1 - Capacité de l’algorithme présenté	41
2 - Problème de matrice	41
3 - Utilisation de la notion d’épitope pour conclure sur la positivité des billes dont la MFI est légèrement inférieure au seuil de positivité	42
4 - Stratégie actuelle d’attribution des greffons	42
Forces et limites de ce travail	43
V – Conclusion	45
VI – Perspectives	47
1 - Applications de l’algorithme à la recherche d’épitopes non vérifiés	47
2 - Utilisation de ce travail pour repérer des profils d’intérêts et proposition de travaux expérimentaux à réaliser	47
VII – Travaux Annexes	49
VIII – Références	59

Liste des Tableaux

Tableau Ia et Ib: Considering that, in those theoretical examples, the beads presented are the only one of the test with positives MFI. HLAMatchmaker report as potentially reactive all those eplets (80I, 76ESI, 65GK, 71SA and 62GRN) whereas, because of the beads MFI hierarchy, our attentive analyses conclude on the implication of the eplet 80I and 76ESI in the first example (Tableau Ia) and the implication of the eplet 80I and 65GK in the second example (Tableau Ib). Our tool is designed to do it automatically. We also drive the reader attention on the fact that no beads of the test only carry the 76ESI eplet or the 65GK ones without carrying the 80I. It complicated the conclusion on those eplets implication in MFI positives results. That's what we call the matrix design problems. 23

Tableau II: We present the MFI results of five patients selected in our data bases. For each of those patients the positive MFI value (superior to the 2000 cut-off) are consistent and can be explained by an eplet sharing. Those datas supports our first assumption (A1) and allow the application of our mathematical treatment. 27

Tableau III: We present the MFI results of three patients selected in our data bases. For each of those patients the positive MFI value (superior to the 2000 cut-off) can be explained by an eplet sharing and the beads MFI hierarchy is coherent with our vision presented in the Tableau Ia and Ib. Those datas supports our second assumption (A2) and allow the application of our mathematical treatment. 28

Tableau IV: Patient 9: HLAMatchmaker connected to the fusion 4.2 Version Patient 9 profile analysis results showing the sharing between the beads with positives MFI results of the 41T eplet but also reporting as potentially implicated others eplet (80TA, 144QL, 45KE, 162GLS, and 199V) which did not seems pertinent in this case. 29

Tableau V: Patient 10: HLAMatchmaker connected to the fusion 4.2 Version Patient 10 profile analysis results showing the sharing between the beads with positives MFI results of the 82LR eplet but also reporting as potentially implicated a lot of others eplet which did not seems pertinent in this case. 31

Tableau VI: Patient 11: HLAMatchmaker connected to the fusion 4.2 Version Patient 11 profile analysis results showing the sharing between the beads with positives MFI results of the 127K eplet but also reporting as potentially implicated a lot of others eplet which did not seems pertinent in this case. 34

Tableau VII: Patient 12: HLAMatchmaker connected to the fusion 4.2 Version Patient 12 profile analysis results. We find the same eplets as the one presented in our tool analysis. This case is presented in order to show the kind of matters that we could be confronted to in order to establish a discussion and highlight our work limits and the interest to compare the HLAMatchmaker results with our in those kinds of cases. 37

Tableau VIII: Patient single antigen tests MFI results (OneLambda, ThermoFisher, Lot 10). Serum reactivity with 193AV-carrying alleles. 53

Tableau IX: Patient single antigen tests MFI results (OneLambda, ThermoFisher). Serum reactivity with 162GLS-carrying alleles. 56

Tableau X: 22/07/2016 Sera testing with the Immucor reagent sets confirming the implication of the 162GLS eplet in the positives results. 57

Liste des Figures

Figure 1: Patient 9: Fusion Patient 9 profile copy showing quite consistent MFI value for the beads with MFI over the 2000 cut-off..... 28

Figure 2: Patient 9: Our algorithm results of the Patient 9 profile showing that the constant MFI results can be explained by the sharing of the 41T eplet between the beads with positive MFI results. Those results let suspect a patient specific immunization against this eplet. 29

Figure 3: Patient 10: Fusion Patient 10 profile copy showing quite consistent MFI value for the beads with MFI over the 2000 cut-off..... 30

Figure 4: Patient 10: Our algorithm results of the Patient 10 profile showing that the constant MFI results can be explained by the sharing of the 82LR eplet between the beads with positive MFI results. Those results let suspect a patient specific immunization against this eplet. 31

Figure 5: Patient 11: Fusion Patient 11 profile copy showing quite consistent MFI value for the beads with MFI over the 2000 cut-off..... 33

Figure 6: Patient 11: Our algorithm results of the Patient 11 profile showing that the constant MFI results can be explained by the sharing of the 127K eplet between the beads with positive MFI results. Those results let suspect a patient specific immunization against this eplet. 34

Figure 7: Patient 12: Fusion Patient 12 profile copy showing a demarcation in the MFI value for the beads with MFI over the 2000 cut-off. 36

Figure 8: Patient 12: Our algorithm results of the Patient 12 profile showing that the MFI results can be explained by immunization against the 144K and the 144KR eplets. 37

Abréviations

Ac : Anticorp (s)
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène
CREG : Cross-REactive Groups
DSA : Donor Specific Antibodies
FAB : Fragment Antigen Binding
FC : Fragment Crystallizable
HLA : Human Leukocyte Antigen
LCT : Micro-LymphoCytoToxicité
MFI : Mean Fluorescence Intensity
NC : Negative Control
NGS : Next Generation Sequencing
PC : Positive Control
PRA : Panel Reactive Antibody
SAG : Single Antigen
TCR : T Cell Receptor
TGI : Taux de Greffons Incompatibles

I – Introduction

1 - Généralités sur le HLA (Human Leukocyte Antigen)

Jusque dans les années 1994, on considérait que la fonction première du système immunitaire était de différencier le « *soi* » du « *non soi* ». Cette notion a été modifiée par les travaux de P. Matzinger (Matzinger, 1994) qui a introduit l'idée du système immunitaire ayant pour objectif de détecter et de protéger l'organisme contre le « Danger » grâce notamment à des interactions positives et négatives avec d'autres acteurs. Cette notion est particulièrement importante car elle concorde avec les réactions contre le soi dangereux (auto-immunité) et les réactions peu importantes voire inexistantes contre le non soi peu dangereux.

L'activation du système immunitaire adaptatif passe par la liaison entre le lymphocyte T via son TCR (T Cell Receptor) et un antigène peptidique. Les antigènes peptidiques sont présentés par les CPA (Cellules Présentatrices de l'Antigène) via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présent à leur surface.

Dans les années 1950, Jean Dausset met en évidence le CMH, aussi appelé HLA « *Human Leukocyte Antigen* » par réaction d'immuno-agrégation (Dausset, 1958). C'est un système multigénique très polymorphe (23 907 allèles décrits à ce jour) et les gènes codant pour le système HLA sont localisés sur le bras court du chromosome 6.

2 - Rappel de Nomenclature

Prenons l'allèle HLA-A*02:101:01:03N pour exemple :

- HLA est le préfixe indiquant qu'il s'agit d'un gène HLA.
- Un tiret est utilisé pour séparer le nom du gène (ici A) du reste du préfixe.
- L'astérisque indique que ce résultat de typage a été obtenu par biologie moléculaire.
- Se trouvent ensuite quatre champs au maximum, pouvant ne pas être tous présents et séparés entre eux par deux points (:): le premier correspond au groupe d'allèle (ici, 02) et le second à l'allèle spécifique (ici, 101) ; le troisième (ici, 01) permet de différencier des allèles pour lesquels la séquence ADN des exons est différente mais dont la séquence protéique traduite est la même ; pour ce qui est du quatrième champ (ici, 03), il permet de différencier des allèles présentant des différences dans les régions non codantes (introns).
- Vient enfin un suffixe qui peut être de différentes natures : ici le N indique que l'allèle n'est pas exprimé (N = *Null*). Ce suffixe peut aussi être un L indiquant que l'allèle est faiblement exprimé (L = *Low*), un S indiquant qu'il s'agit d'un allèle Sécrété ou un Q pour « *Questionable* » lorsqu'un allèle nécessite encore des investigations pour sa confirmation.

3 - Expression et fonction des molécules HLA

Les gènes codants pour les molécules HLA sont transmis en bloc, par le père et la mère de l'individu, et ils sont co-exprimés. La co-expression de ces gènes assure la diversité.

Cette diversité garantit la capacité de certains individus à lutter contre n'importe quels types d'agents pathogènes potentiellement aptes à causer une épidémie et se révèle

ainsi indispensable à la survie de l'espèce. Cependant, elle est aussi un frein dans les domaines des greffes et des transplantations car elle limite grandement les possibilités de compatibilité.

Les molécules HLA de classe I :

Les molécules HLA de classe I sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques exprimées par toutes les cellules nucléées de l'organisme et codées par les locis A, B et C. Elles présentent des peptides d'origine intracellulaire à leur pôle apical qui peuvent être des peptides du soi ou des peptides issus de micro-organismes présentant une phase intra-cellulaire comme les virus.

L'association entre la β 2-microglobuline et le domaine α 3 forme la partie proximale des molécules HLA de classe I. L'association des domaines α 1 et α 2 crée, elle, au niveau distal, le sillon accueillant un peptide de 8 à 9 acides aminés. Les cellules qui interagissent avec les molécules CMH de classe I sont les lymphocytes T CD8 ainsi que les cellules NK. La boucle α 3 est le domaine de liaison au CD8 du lymphocyte T. Les domaines α 1, α 2 et α 3 forment la chaîne lourde, alors que la β 2-microglobuline (protéine invariante n'appartenant pas au système HLA) constitue la chaîne légère. La liaison entre ces deux chaînes est non covalente.

Les molécules HLA de classe II :

Les molécules HLA de classe II sont exprimées uniquement par les cellules présentatrices de l'antigène : cellules dendritiques, monocytes, macrophages, lymphocytes B, lymphocytes T activés et cellules endothéliales.

Elles présentent aux lymphocytes T CD4 des peptides de 10 à 30 acides aminés d'origine exogène qui ont été internalisés par les cellules présentatrices de l'antigène.

Les molécules de classe II DR, DQ et DP sont codées par deux gènes chacune : DRA1 et DRB1, DQA1 et DQB1 ainsi que DPA1 et DPA2. Les gènes A et B permettent respectivement la synthèse des chaînes α et des chaînes β .

Le domaine extracellulaire des molécules HLA de classe II se compose de deux parties comme pour la classe I. Le domaine proximal est formé des régions α 2 et β 2 (β 2 constitue le site de liaison au corécepteur CD4 du lymphocyte T) et le domaine distal est composé de α 1 et β 1. Leur liaison forme le sillon dans lequel s'insère le peptide. La liaison entre les chaînes α et β est non covalente.

4 - Les anticorps (Ac) anti-HLA

Origine

Les anticorps (Ac), glycoprotéines hétérodimériques, sont sécrétés par les plasmocytes qui sont des cellules dérivant de la lignée lymphocytaire B. Toutes les immunoglobulines sont constituées d'une unité de base comprenant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques deux à deux et liées entre elles par des ponts disulfures. Les chaînes lourdes constituent le fragment Fc (Fragment Crystallizable) responsable des fonctions effectrices. Le fragment Fab (Fragment Antigen Binding) est lui constitué par les extrémités NH₂ d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. C'est cette partie qui permet la reconnaissance de l'épitope.

Il existe différentes classes d'immunoglobulines : IgG, IgA, IgM, IgE et IgD par ordre décroissant des concentrations sériques chez le sujet normal. Elles diffèrent entre elles par la

nature de leur chaîne lourde (γ , α , μ , ϵ , δ). Les IgG, IgD et IgE sont des monomères, les IgM sont des pentamères et les IgA sont des monomères dans le sérum mais des dimères dans les sécrétions. Elles présentent des fonctions différentes et les chaînes lourdes peuvent se lier avec deux types de chaînes légères Kappa ou Lambda.

La présence dans le sérum d'un individu d'Ac reconnaissant les molécules du CMH signe l'immunisation anti-HLA. L'immunisation peut survenir si le patient a été en contact avec des molécules HLA différentes des siennes. Les trois principales causes d'immunisation anti-HLA sont la grossesse, la transplantation et la transfusion notamment de concentrés plaquettaires (Hyun, Park, Yoo et al., 2012).

a) Grossesse

Il a été démontré que plus de 50 % des femmes développent un Ac anti-HLA après une grossesse. Cela concerne autant la classe I que la classe II et le facteur de risque majeur est le nombre de grossesses (Masson, Vidal, Deschamps et al., 2013).

Le fœtus étant haplo-identique à sa mère, l'immunisation se fait contre les antigènes du père, via l'existence d'un trafic cellulaire bidirectionnel entre le sang maternel et le sang fœtal (Lo, Lo, Watson et al., 1996). Les Ac ainsi formés disparaissent généralement quelques mois après l'accouchement, mais certains peuvent persister à vie.

b) Transplantation

La transplantation est associée à une très forte probabilité d'immunisation anti-HLA. L'incidence varie de 7 à 25 % selon les études et semblerait plus élevée dans la population pédiatrique (Guidicelli, Guerville, Lepreux et al., 2016 ; Everly, Rebellato, Haisch et al., 2013 ; Cioni, Nocera, Innocente et al., 2017). Il est à noter que nous sommes actuellement de plus en plus confrontés aux problèmes de transplantectomie et retransplantation ainsi que leurs impacts négatifs en termes d'immunisation anti-HLA.

c) Transfusion

Les plaquettes dérivant des mégacaryocytes et les cellules mononucléées expriment des antigènes HLA de classe I à leur surface. Malgré les traitements de déleucocytation des produits sanguins avant transfusion, des leucocytes résiduels restent présents dans les poches et peuvent être responsable d'alloimmunisation anti-HLA chez le receveur. De plus, des antigènes HLA libres ou adsorbés sur les globules rouges peuvent également être présents dans les produits sanguins transfusés (Rivera et Scornik, 1986 ; Everett, Kao et Scornik, 1987). Ces phénomènes d'immunisations peuvent être la cause d'effets indésirables comme les réactions fébriles non hémolytiques ou encore les états réfractaires aux transfusions (Delbos et Cesbron, 2017).

Environ 10 % des patients développent un Ac mesurable par technique de Single Antigen directement après une transfusion. Les titres d'Ac diminuent généralement quelques mois après et deviennent indétectables. Le risque, plus important chez l'enfant, diminue avec l'âge ; mais augmente avec le nombre de transfusions (Scornik, Pfaff, Howard et al., 1994).

d) Ac Anti-HLA naturels

En 2008, l'équipe de Morales-Buenrostro (Morales-Buenrostro, Terasaki, Marino-Vazquez et al., 2008) confirme l'existence d'Ac anti-HLA naturels dans les sérums d'hommes

n'ayant pas connu d'évènement immunisant. Ces Ac proviendraient de réactivités croisées avec des microorganismes, des protéines ingérées lors de l'alimentation, ou des allergènes. Parmi les microorganismes impliqués, peuvent être cités le streptocoque (Hirata et Terasaki, 1970) ainsi que certaines entérobactéries.

Définition des concepts d'épitopes et eplets

Un épitope est constitué d'une séquence définie et très précise d'acides aminés formant, dans l'espace et en fonction de la conformation protéique, une cible pour les Ac et les lymphocytes T. Cette séquence peut être continue ou discontinue. Les épitopes conformationnels sont formés par des replis protéiques qui rapprochent dans l'espace des séquences discontinues d'acides aminés et ils sont classiquement reconnus par les lymphocytes B alors que les lymphocytes T reconnaissent des séquences linéaires présentées par des CPA.

Au cours des années 2000, l'équipe de Duquesnoy (Pittsburgh) a défini la notion de « *triplet* ». Il s'agit d'un motif constitué par 2 ou 3 acides aminés voisins dans la séquence des protéines du CMH et pouvant constituer un épitope immunogène reconnu par des Ac (Duquesnoy, 2001). Par la suite, ce terme a été remplacé par « *eplet* », pour faire face au cas des épitopes conformationnels.

Actuellement, 272 eplets de classe I dont 72 vérifiés et 292 de classe II dont 66 vérifiés sont décrits (HLA EpRegistry website - <http://epregistry.com.br> - Juillet 2019). Le terme d'épitopes vérifiés est utilisé lorsque des cas d'immunisation de patients contre ces épitopes ont pu faire l'objet d'expériences d'éluotion ou de case report afin d'en rapporter la spécificité.

Les allèles HLA et les eplets qu'ils portent sont à l'origine du développement du programme de calcul d'intersection « *HLAMatchmaker* ». Cet algorithme est fondé sur les deux hypothèses de base suivantes :

- Chaque molécule HLA présente à sa surface un ensemble d'eplets qui sont potentiellement immunogènes.
- Un individu ne peut pas s'immuniser contre les eplets qu'il porte lui-même sur ses molécules HLA.

Il s'agit d'une approche « *épitopique* » qui permet de disposer d'une analyse plus fine en termes d'attribution de greffons et de suivi immunologique post-greffe. Elle permet également d'expliquer la plupart des réactions croisées déjà bien connues et regroupées sous l'appellation « *CREG* » (Cross-REactive Groups). Un Ac anti-HLA peut réagir avec plusieurs molécules HLA différentes. Ces réactivités sont expliquées par la présence sur des molécules HLA différentes, parfois codées par des locus différents, d'un ou plusieurs eplets identiques. Ceci explique que l'immunisation contre une molécule HLA donnée puisse induire la synthèse d'Ac qui seront réactifs envers d'autres molécules HLA que potentiellement, le patient n'a jamais rencontrées.

Pathogénicité

Les Donor Specific Antibodies (DSA), Ac reconnaissant spécifiquement des motifs du greffon, ont un impact sur la survie de l'organe transplanté. S'ils sont présents avant la greffe, on parle de DSA préformés qui peuvent causer des rejets hyperaigus sur table. S'ils apparaissent après la greffe on parle de DSA néoformés responsables de rejets plus tardifs (aigus et

chroniques). Il est important de noter que des DSA préformés à titre très faible peuvent ne pas être détectés par les techniques actuelles et impacter la survie du greffon.

Leur apparition n'est pas systématique ce qui peut laisser à penser que certains eplets sont plus immunogènes que d'autres. Les traitements immunosuppresseurs visent notamment à éviter leur émergence.

Le diagnostic et le suivi des DSA sont importants : en pré-greffe, d'une part, car ils permettent d'éviter l'attribution d'un greffon non compatible ; et, en post-greffe, d'autre part, car ils aident à anticiper le risque de lésions et de rejet. De plus, leur apparition peut être transitoire et résolutive, d'où la nécessité de répéter les recherches et de conserver des aliquots de sérums qui pourront être réutilisés lors de la réalisation de crossmatch. Il est alors obligatoire de tenir compte de tous les Ac trouvés pour l'attribution de greffon même si leur présence n'a été que transitoire et discordante sur deux recherches différentes. Ils peuvent, en effet, être réexprimés de manière forte et rapide via les mécanismes de mémoire du système immunitaire en cas de restimulation.

5 - Dépistage et identification des Ac anti-HLA

L'étude des Ac anti-HLA est importante pour attribuer un greffon adapté au patient et diminuer le risque de rejet. La prise en compte des spécificités entrées pour l'attribution d'un greffon est faite par le logiciel Cristal développé par l'Agence de la Biomédecine et mis à disposition des professionnels impliqués dans les greffes d'organes.

Les recherches d'Ac anti-HLA de classe I et de classe II sont indispensables en vue d'une inscription sur liste d'attente de greffe (Agence de la Biomédecine - Recommandations concernant le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes - Novembre 2010).

Techniques disponibles

a) La Micro-LymphoCytoToxicité

La Micro-LymphoCytoToxicité (LCT) est la technique de référence pour le crossmatch (Doxiadis, Roelen et Claas, 2010).

Le sérum du patient est mis en contact avec un panel de lymphocytes T et/ou B de typage connu. On ajoute ensuite du complément de lapin, qui va participer à la lyse des cellules en cas de fixation d'Ac. Cette lyse est évaluée grâce à l'utilisation de colorants marquant les cellules mortes (éosine ou bleu de tryptan) et visualisée au microscope. Les résultats sont rendus en pourcentage (%). On parle de Panel Reactive Antibody (PRA) qui reflète le degré d'immunisation du patient car la sélection des lymphocytes T et/ou B est faite de manière à représenter la population locale. Le PRA montre ainsi la difficulté à trouver un donneur compatible. Cette technique présente deux avantages majeurs : elle utilise des cellules et les molécules HLA natives qui sont à leur surface ; et elle met en évidence la capacité des Ac reconnaissant les molécules HLA à activer le complément ce qui a un impact clinique.

Cette technique présente aussi quelques limites : d'abord, sa sensibilité inférieure aux techniques de cytométrie ; ensuite, elle nécessite de disposer de banque de cellules présentant des phénotypes divers et connu ; et enfin, elle demande de la main d'œuvre expérimentée.

b) La cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de détecter les Ac anti-HLA de classe I et II dans le sérum du receveur à l'aide de lymphocytes T et B de donneurs et l'ajout d'un conjugué (anti-IgG marqué). Cette technique utilise des cellules présentant des molécules HLA natives à leur surface mais ne teste pas la capacité des Ac à activer le complément (Liwski, Greenshields, Conrad et al., 2018).

c) Le Luminex

Le Luminex est une technique automatisée récente utilisant la cytométrie en flux couplée à la détection de fluorescence (Tait, 2016).

Des microbilles de polystyrène contenant un mélange de deux fluorochromes, dont le rapport des fluorescences émises en permet une identification précise, portent à leur surface des molécules HLA. Les fluorochromes utilisés pour l'identification des billes émettent dans le rouge (675 nm) et l'infrarouge (> 712 nm).

Pour les analyses de dépistage, plusieurs molécules HLA différentes sont coaptées à la surface des billes alors que, pour les identifications, des molécules HLA d'origine recombinante, codées par un seul allèle, sont présentes. On parle alors de tests de Single Antigen (SAG).

Les billes sont mises à incuber avec le sérum patient et la présence de complexes antigènes-Ac est révélée par ajout d'un Ac anti-immunoglobuline humaine marqué à la phycoérythrine (émission = 575 nm) après des lavages successifs éliminant les Ac non fixés. Pour mesure du signal de fluorescence, les billes passent une à une devant la cellule de détection.

Dans cette cellule de détection, un premier laser (633 nm) excite le mélange de fluorochrome composant les billes. Le signal mesuré permet leur identification. Un deuxième laser (532 nm) excite la phycoérythrine et la fluorescence mesurée quantifie les complexes antigènes-Ac formés à la surface de la bille et donc la présence, dans le sérum patient, d'Ac anti-HLA dirigés contre l'allèle coapté à la surface de la bille. L'intensité de fluorescence obtenue après passage dans l'automate est normalisée sur un sérum négatif. On parle alors de Mean Fluorescence Intensity (MFI).

Les dernières recommandations des groupes d'experts de l'agence de biomédecine sont d'utiliser depuis le 2 janvier 2017 un seuil de 2000 de MFI pour rendre les spécificités interdites (Agence de la Biomédecine - Compte rendu de la réunion Nationale des laboratoires HLA du Mardi 22 Novembre 2016). Les seuils de 1000, puis 1500, ont été jugés trop restrictifs en termes d'attribution des greffons et non corrélés aux impacts cliniques.

Un contrôle positif (PC) et un contrôle négatif (NC) permettent de confirmer la validité de l'expérience. Les recommandations fournisseur sont d'accepter les résultats de l'expérience si la MFI de la bille NC est inférieure à 1500 et si la MFI de la bille PC est supérieure à cette même valeur de 1500. En pratique, dans les laboratoires, ces valeurs sont un peu plus strictes, notamment pour la valeur d'acceptation de la bille NC qui est parfois abaissée à 500 de MFI en routine.

L'acquisition de résultats de fluorescence s'arrête lorsque cent billes de chaque catégorie ont été lues. Alors, la valeur de MFI rendue correspond à la moyenne calculée sur les cent valeurs mesurées. Les résultats de MFI sont rendus en unité arbitraire et seront cités dans la suite de ce document sous forme de nombre sans référence à une unité.

Avantages et inconvénients de la technique Luminex

Cette technique présente plusieurs avantages. Premièrement, elle est très sensible. Deuxièmement, bien que la préparation des plaques reste manuelle, la lecture, elle, est automatisée ce qui représente un gain de temps précieux. Troisièmement, ce processus élimine une bonne partie du risque d'erreur de lecture avec une mauvaise identification patient par rapport à un passage strictement manuel.

Depuis l'utilisation en routine de la technique Luminex, le PRA n'est plus utilisé. Un calcul différent permet d'obtenir le Taux de Greffons Incompatibles (TGI ou cPRA), qui se base sur la population des donneurs.

Toutefois, cette technique présente aussi des inconvénients. Tout d'abord, des interférences négatives apparaissent par compétition entre le conjugué (Ac anti-immunoglobuline humaine marqué à la phycoérythrine) et les fractions du complément pour la liaison aux Ac. C'est l'effet « *Prozone* » pouvant être responsable de résultats faussement négatifs. Mais, les fractions du complément étant calcium-dépendantes et thermosensibles : l'ajout d'EDTA ou le traitement pendant 30 min à 56°C des échantillons de sérum avant analyse permettent d'éviter ce problème.

Ensuite, il existe des résultats faussement positifs. D'abord par présence d'Ac anti-HLA dénaturé dans le sérum patient fixant les épitopes cryptiques des molécules HLA dénaturées à la surface des billes et qui aboutissent à la mesure d'un signal de fluorescence supérieur au seuil de positivité (Ottens, Verhaar, Borst et al., 2013). Des résultats faussement positifs peuvent aussi se voir dans les cas de forte concentration d'IgM ou les contextes inflammatoires (Visentin, Guidicelli, Couzi et al., 2016 ; Kokko, Bray, Nickerson et al., 2009).

Par ailleurs, la forte sensibilité de cette technique, cumulée aux exigences hypersécuritaires, entraîne le rendu d'un grand nombre de spécificités interdites qui peuvent fortement freiner l'accès à la greffe de certains patients (Agence de la Biomédecine - Compte rendu de la réunion Nationale des laboratoires HLA du Mardi 22 Novembre 2016).

Il est à noter que le coefficient de variation entre plusieurs expériences identiques réalisées à des temps différents est de l'ordre de 20% (Visentin, Guidicelli, Bachelet et al., 2014) pour cette technique et que les résultats sont semi-quantitatifs.

De plus, il n'y a pas de concordance entre les résultats du Luminex et ceux du Crossmatch.

6 - Le système HLA et les greffes

Le Rejet de Greffe

Un conflit immunologique entre les cellules du donneur et celles du receveur est toujours à l'origine du rejet. On parle d'alloréactivité. Cette réaction est entraînée, à sa première

étape, par les lymphocytes T alloréactifs du receveur. Elle fait également intervenir des alloanticorps de haute affinité.

En transplantation d'organe, on distingue classiquement trois types de rejets (Abul, Andrew, Shiv et al., 2013) :

- Le rejet hyperaigu qui survient dans un délai de quelques minutes à quelques heures après la revascularisation du greffon. Il est provoqué par des anticorps (Ac) préexistants à la greffe (Ac préformés dirigés contre les molécules HLA du donneur). Il s'ensuit alors une activation du complément, des lésions thrombotiques ainsi qu'une nécrose ischémique. Ce rejet est aujourd'hui largement évité grâce au suivi immunologique des patients en attente de greffe et à l'utilisation des techniques de crossmatch.

- Le rejet aigu, qui survient avant le centième jour post-greffe, comprend une composante humorale et une composante cellulaire. Les traitements immunosuppresseurs visent à l'empêcher mais il reste la principale cause des échecs précoces de transplantation.

- Le rejet chronique qui survient après le centième jour post-greffe. Le mécanisme est complexe et fait intervenir des facteurs immunologiques dont la présence d'Ac anti-HLA.

L'étude des Ac anti HLA présent dans le sérum d'un patient ainsi que le fait de connaître leur cible est indispensable au travail amont de toute greffe qui vise à attribuer de manière optimale les greffons aux receveurs.

Certains outils comme le Logiciel « HLAMatchmaker » aident ces travaux en permettant d'obtenir une liste exhaustive des eplets potentiellement impliqués dans les résultats de MFI positifs grâce à une approche en deux étapes. D'abord, un seuil de MFI est fixé permettant de définir les billes avec MFI supérieure au seuil comme « positives », et ensuite tous les eplets, hormis ceux portés par des billes à MFI négative sont rapportés comme potentiellement impliqués dans les résultats positifs. Ces outils sont des aides mais leur fonctionnement peut être amélioré : d'abord, en actualisant les bases de données sur lesquelles ils sont fondés ; et ensuite, en affinant les stratégies d'analyse des résultats obtenus.

7 - Objectif du travail

L'objectif de ce travail est de présenter les résultats d'un algorithme destiné à faciliter l'analyse épitopique des résultats de tests de SAG (Single Antigen) obtenus par technique Luminex. La tendance à la médecine de précision pousse, dans ce domaine, à s'intéresser aux spécificités épitopiques des Ac anti-HLA. Le logiciel HLAMatchmaker a été développé dans ce but ; il permet de connaître tous les eplets vérifiés contre lesquels les Ac anti-HLA présents dans le sérum d'un patient peuvent potentiellement réagir. Ces résultats sont exhaustifs et contiennent donc les eplets potentiellement cibles des Ac anti-HLA présents dans le sérum du patient, mais souvent, une analyse minutieuse est nécessaire pour démêler les résultats obtenus. Notre algorithme a été développé pour faciliter ce travail.

Nous avons choisi de rédiger les parties suivantes sous la forme d'un article scientifique après un résumé et quelques explications destinées à aider le lecteur.

II – Présentation du travail réalisé sous la forme d'un article scientifique.

Résumé du contexte et explications sur l'utilisation de la méthode des moindres carrés :

La détermination de la compatibilité HLA au niveau épitopique a prouvé son intérêt dans le domaine de la compatibilité hôte-greffon. Le programme HLAMatchmaker est l'une des contributions majeures dans ce domaine. Il permet d'obtenir la liste des eplets potentiellement réactifs au moyen d'une approche composée des deux étapes suivantes. Les billes sont classées positives ou négatives selon qu'elles ont une MFI respectivement supérieure ou inférieure à un seuil. Cette valeur de seuil est fixée par l'utilisateur. Les eplets pour lesquels toutes les répétitions du panel appartiennent aux billes positives sont rapportés comme potentiellement réactifs tandis que ceux pour lesquels une répétition est portée par une bille négative sont écartés.

Cette technique présente de bonnes performances, de nombreux résultats sont rapportés dans la littérature (Duquesnoy, 2013). Elle présente cependant certaines limitations. L'analyse des résultats peut être longue et fastidieuse, notamment dans les cas présentant de nombreuses positivités (voir exemple Patient 10 de l'article ci-dessous). Les eplets rapportés comme potentiellement impliqués ne sont pas toujours pertinents (différence dans les bases de données utilisées). Et enfin, la composition des panels ne permet pas toujours de conclure sur l'implication d'un eplet (problèmes de matrice, Tableau Ia, Ib et Patient 12 de l'article).

L'identification des eplets réactifs à partir de l'ensemble des valeurs de MFI est un problème inverse : en effet on tente de déterminer les causes des résultats de MFI par l'observation de leurs valeurs. Pour le résoudre, nous proposons dans ce travail de mettre en jeu un modèle qui lie la quantité de fluorescence (MFI) mesurée par une bille en fonction des réactivités des anticorps présents dans le sérum patient et des différents eplets portés sur les billes de test de SAG. L'intérêt d'utiliser un tel modèle est double : il permet d'automatiser la résolution de l'identification des eplets réactifs et il vise à fournir une solution moins ambiguë que l'approche standard en reposant sur l'utilisation de l'ensemble des valeurs de MFI à travers une méthode de résolution directe.

Le modèle fait intervenir la notion de valeur de MFI par catégorie d'eplets. Une catégorie d'eplets correspond à l'ensemble des mêmes eplets présents à la surface de la bille. Il y a donc plusieurs catégories d'eplets à la surface d'une bille. Pour une bille donnée, la valeur de MFI d'une catégorie est définie comme le cumul des émissions de fluorescence induites par la fixation d'anticorps sur l'ensemble des eplets de la catégorie. La valeur de MFI d'une catégorie est supposée constante et indépendante de sa bille support. Le modèle proposé considère la valeur de MFI mesurée pour une bille comme la somme des valeurs de MFI des catégories d'eplets réactifs. Une part des contributions de ce travail portent sur la validation de ces hypothèses de base (tableau II et III de l'article).

Nous proposons une solution au problème d'identification des eplets réactifs reposant sur un modèle pour lequel une valeur de MFI mesurée est une fonction linéaire des MFI par catégorie d'eplets réactifs. La solution d'identification proposée correspond à la solution d'un problème d'optimisation aux moindres carrés dont les paramètres estimés sont les valeurs de MFI par catégorie d'eplets. Ces valeurs sont positives pour les catégories d'eplets réactives, nulles pour les autres catégories. La méthode des moindres carrés calcule les valeurs de MFI par catégorie d'eplets qui minimisent la somme des carrés des différences entre les MFI

mesurées et la somme des MFI des catégories d'eplets réactifs. La résolution est directe et considère l'ensemble des MFI simultanément. Les erreurs de mesure sont bien prises en compte par la méthode d'estimation.

On peut faire un parallèle avec le calcul du coefficient de détermination R^2 dans les modèles de régression linéaire qui utilise aussi des sommes de carrés. Les valeurs de MFI étant par définition positives, nous avons intégré cette contrainte dans la méthode de résolution. Les valeurs calculées par la méthode des moindres carrés sont optimisées grâce à la fonction Matlab © Isqnonneg qui contraint les paramètres estimés à être positifs. Cette optimisation peut être rapprochée de l'idée de trouver parmi toutes les équations possibles celle qui donne le R^2 le plus proche de 1 dans l'exemple de la régression linéaire.

En fin d'article nous démontrons des résultats concordant avec ceux de HLAMatchmaker (Patients 9, 10 et 11 de l'article) ce qui représente une première étape vers la validation de nos hypothèses et de notre modèle pour les cas présentés. Ces résultats laissent à penser que notre outil peut être utilisé en l'état. Des pistes d'amélioration sont discutées dans les parties Discussion et Perspective de ce travail.

Proposition d'article :

A non negative least squares based method to complement HLAMatchmaker in determining the most probably involved HLA eplets in Luminex Single Antigen class I tests MFI results.

Bastien CAUQUIL, EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

Corresponding author Bastien CAUQUIL

Acknowledgement: We thank Dr Lilian CALVET, ENCOV group (Endoscopy and Computer Vision), Université Clermont Auvergne and CNRS, Institut Pascal for his help and comments that greatly improved this manuscript.

Conflicts of interest notification:

The authors declare no conflict of interest

Abstract:

The determination of the HLA compatibility at the structural level has proven its usefulness in donor/recipient matching and graft outcomes domains. The release of the HLAMatchmaker computer program has been one of the most substantial contributions in this field. HLAMatchmaker program allows one to obtain an exhaustive list of potential reactive eplets through a two-step approach: (i) emitting beads, referred to as *positive* beads, are identified using MFI (Mean Fluorescent Intensity) value thresholding and (ii) eplets which belong to all positive beads and do not belong to *negative* beads are reported as *reactive*. Such a technique has shown to perform well and extensive validations are reported in the literature but the results interpretations are time consuming because of their presentation even more when a lot of positivity are found in profiles. This paper consists in the presentation of a novel non negative least squares based method to facilitate the identification of the most probably HLA eplets involved in the positive results of single antigen class I tests. Such a model allows one to express the list of potential reactive eplets as a non negative least squares solution making use of all the MFI measurements simultaneously in a single step approach. A validation of the model has been conducted over three patients data. The obtained non negative least squares solutions delivers coherent reactive eplets with the one obtained using HLAMatchmaker (Version connected to the Fusion V4.2). The obtained results therefore suggest that our analysis method may complement the HLAMatchmaker program to make eplets analysis easier in a less time consuming and more pertinent/efficient way.

Keywords: HLAMatchmaker, Eplet, Linear Least Squares

1 - Introduction:

The understanding of the HLA compatibility at the structural level is one of the actual aims of current research. One of the major updates in this domain was the set-up of the HLAMatchmaker computer program. The application of those results increases the probability of finding compatible donors for transplant candidates and structurally based HLA matching reduces humoral allosensitization (Duquesnoy et Askar, 2007 ; Duquesnoy et Claas, 2005). Moreover, epitopic analyses are useful in the comprehension of serum antibody reactivity and benefits the strategy of identifying acceptable mismatches for highly sensitized patients (Duquesnoy, 2008; Duquesnoy, 2011; Duquesnoy, 2013).

The interest of the HLAMatchmaker analysis is well known for listing the potential reactive eplets. It works by following the above-mentioned steps (i) and (ii).

However, some point could be ameliorated. Result analysis is time-consuming and the eplet nomenclature used is not exactly the same as the HLA Ep Registry reference website one. It complicates interpretation of involved eplets consequences because of HLA alleles carrying eplets lists lack.

Our Analysis method is able to present the most probably involved eplet.

We describe this model through two main assumptions, referred to as A1 and A2 in the following.

A1. If in a patient's sera, antibodies bind to a specific eplet, all the beads bearing the same eplet are recognized, and the resulting MFI values should be close. As with HLAMatchmaker only eplets with all the repetitions in the positives MFI are considered.

A2. If more than one eplet is targeted on the same HLA bead, the MFI resulting from the binding of the corresponding antibodies should be the sum of the individual MFI values resulting from each eplet-antibodies interaction.

This second assumption was necessary in order to apply our mathematical treatment. It was chosen to benefit our eplet detection strategy. In the two following theoretical examples (Tableau Ia and Ib) HLAMatchmaker may report as positive the five eplets (80I, 76ESI, 71SA, 65GK, and 62GRN) because all the repetitions of each eplet of the panel are present on the beads with positive MFI.

Whereas it seems appropriate after an attentive analyze to conclude on the probable implication of the 80I and 76ESI eplets in the first example (Tableau Ia) and 80I and 65GK in the second one (Tableau Ib). Considering for those example that the MFI of the beads carrying the 76ESI eplet or the 65GK eplet are significantly superior to the one of the beads only carrying the 80I eplet.

Our tool was designed to do it automatically.

Tableau Ia et Ib: Considering that, in those theoretical examples, the beads presented are the only one of the test with positives MFI. HLA Matchmaker report as potentially reactive all those eplets (80I, 76ESI, 65GK, 71SA and 62GRN) whereas, because of the beads MFI hierarchy, our attentive analyses conclude on the implication of the eplet 80I and 76ESI in the first example (Tableau Ia) and the implication of the eplet 80I and 65GK in the second example (Tableau Ib). Our tool is designed to do it automatically. We also drive the reader attention on the fact that no beads of the test only carry the 76ESI eplet or the 65GK ones without carrying the 80I. It complicated the conclusion on those eplets implication in MFI positives results. That's what we call the matrix design problems.

Tableau Ia :

	MFI	80I	76ESI	71SA	65GK	62GRN
Positive	A*25:01	Strongest MFI	X	X		
Positive	A*32:01		X	X		
Positive	B*57:01		X			X
Positive	A*24:02		X		X	
Positive	B*49:01		X			
Positive	B*15:13		X			
Positive	B*51:01		X			
Positive	B*51:02		X			
Positive	B*57:03		X	X		X
Positive	B*52:01		X			
Positive	B*53:01		X			
Positive	B*58:01		X	X		X
Positive	A*23:01		X		X	
Positive	B*38:01		X			
Positive	A*24:03		X		X	
Positive	B*59:01		X			
Positive	B*15:16	lowest MFI	X	X		

MFI Cut-off

Negatives

Considering all the other Alleles with lowest Mfi than the Cut-off.
X = Eplet presence on the Bead

Tableau Ib:

	MFI	80I	65GK	76ESI	71SA	62GRN
Positive	A*24:02	Strongest MFI	X	X		
Positive	A*23:01		X	X		
Positive	A*24:03		X	X		
Positive	B*51:01		X			
Positive	B*51:02		X			
Positive	A*25:01		X		X	
Positive	B*57:01		X		X	X
Positive	B*49:01		X			
Positive	B*15:13		X			
Positive	B*57:03		X		X	X
Positive	B*52:01		X			
Positive	A*32:01		X		X	
Positive	B*53:01		X			
Positive	B*58:01		X		X	X
Positive	B*38:01		X			
Positive	B*59:01		X			
Positive	B*15:16	lowest MFI	X		X	

MFI Cut-off

Negatives

Considering all the other Alleles with lowest Mfi than the Cut-off.
X = Eplet presence on the HLA Allele

In the following, we compare the results of our algorithm with the HLAMatchmaker version connected to Fusion V4.2 ones.

Our experiments present some model approximation errors yet within a range for which the derived analysis method relying on a linear least squares solution performs well. This result is supported by our experiments in section III which shows that the proposed model is able to deliver coherent results with the HLAMatchmaker ones.

2 - Methods:

2.a) Justification of A1 and A2

- (A1) The MFI results with a method which could be presented as an ancestor of the Luminex using microbeads coated with HLA molecule and cytometry for the reading are close for a murine monoclonal antibody.
- (A1) The MFI results in Luminex single antigen tests with One Lambda reagent set for profile used in the determination of specific eplets immunization are near too. Because those papers have been used for the justification of antibody targeting specific eplet, we can consider those MFI to be the result of the fixation between antibodies and the specific eplet.
- (A1) We found in our data bases some profiles with close MFI as well and a verified eplet which could explain all those reactivities (Tableau II).
- (A2) The MFI is the result of the antibodies quantity fixed on the beads. We find in our data bases profiles with MFI which can be explained by the fixation of antibodies on two different eplets and that would support that assumption (Tableau III).

2.b) Proposed model

The proposed assumptions (A1) and (A2) allows one to explain the MFI values in a very compact and linear manner through the following equation

$$f_i = \sum_{j=1..M} \gamma a_{ij} x_j \quad (1)$$

where f_i represents the MFI value of the bead #i, x_j the MFI associated to the eplet-antibody interaction of the eplet #j, a_{ij} is a scalar equal to 1 if the eplet j belongs to the bead i and gamma a constant possibly equal to 1. The linear equation (1) can be written in its matrix form

$$\mathbf{F} = \gamma \mathbf{A} \mathbf{X} \quad (2)$$

where $\mathbf{F} = [f_i]^\top$, $\mathbf{A} = [a_{ij}]$ and $\mathbf{X} = [x_j]$ represents the vector of the MFI values, the panel matrix, reporting the presence or absence of the eplets on every bead, and the vector of eplet's MFI. The problem of finding reactive eplet is then shifted to the one of solving the equation (2). In practice, the matrix A is not square and its rank may vary which lead to formulate the problem as the following optimization problem

$$\hat{\mathbf{X}} = \underset{\mathbf{X}}{\operatorname{argmin}} \left\| \tilde{\mathbf{A}} \mathbf{X} - \tilde{\mathbf{F}} \right\|^2 \quad (3).$$

It consists in a linear least squares problem. All the indices associated to elements of positive values in the obtained solution X correspond to potential reactive eplet.

2.c) Proposed analysis method and implementation

The solution of (3) is obtained using the matlab © software R2017b (9.3.0.713579). The function that is used is lsqnonneg which is a type of constrained least squares where the values of X are not allowed to be negative. In our case, it allows to better constrain our solution.

The entire procedure can be summarized as follows:

Stack on the MFI values in F,

Create the matrix A based on the panel content,

Compute the solution of (3) e.g. with the matlab software,

Collect all the indices in the solution X obtained in (3) for which the value is greater than a threshold.

The algorithm consists in running the **steps (3) and (4)** which automatically delivers the list of reactive eplets based on F and A.

In the results section (III), histograms are used to represent the obtained solution, e.g. allowing one to compare the measured MFI against the cumulated MFI over eplets belonging to a same bead. Computed MFI value per eplet are represented using one color per eplet and are stacked on the bins (a bin representing the measured MFI for a bead), see figure 2, 4 and 6.

We manage to present our results in a way comparable to the fusion representation of the Single antigen tests results in order to help readers interpretation.

We classically use a 2000 MFI Cut off to consider positives MFI as recommended by the French Experts groups (Agence de la Biomédecine - Compte rendu de la réunion Nationale des laboratoires HLA du Mardi 22 Novembre 2016). Other Value can be used in order to work on specifics MFI range of interest as the one presenting a demarcation on the Fusion profile representation.

The Matrix used was based on the HLA alleles tested in the Single Antigen Class I, OneLambda, ThermoFisher, reagent sets and on the HLA Epitope Registry website. It attributes to each HLA allele tested all the verified eplets carried by each HLA molecule.

One of the strengths of this approach is the use of all the fluorescence measurements simultaneously.

As for HLAMatchmaker, we can apply a matrix mask on the eplets carried by the receiver in order to discard them. We are also able to easily modify the positive/negative cut-off value. It allows to add or remove HLA alleles presenting MFI close of the cut-off and see the results modifications induced.

From a practical aspect, we can copy the MFI results directly from the Fusion profile interface and paste them in Matlab. The figures are obtained without any other actions.

Profiles analysis presented:

We present the analysis of three profiles in order to show their consistency with the HLAMatchmaker analysis results and their contribution on analysis.

3 - Results

Justification of the two assumptions

El-awar et al. in 2010 (El-Awar, Terasaki, Nguyen et al., 2010) report close MFI results obtained with an ancestor of the luminex technique for murine eplets specific monoclonal antibodies.

Duquesnoy et al. in 2011 and 2016 (Duquesnoy et Marrari, 2011; Duquesnoy, Hönger, Hösli et al., 2016) report constant MFI results for three cases used for the determination of new verified eplets.

We present tables with MFI results of profiles observed in our databases (Tableau II and Tableau III). Those profiles help us on our formulation.

Tableau II: We present the MFI results of five patients selected in our data bases. For each of those patients the positive MFI value (superior to the 2000 cut-off) are consistent and can be explained by an eplet sharing. Those data supports our first assumption (A1) and allow the application of our mathematical treatment.

		MFI	Eplet
Patient 1	Ctrl Neg	39	
	Ctrl Pos	6682	
	A*02:01	4426	62GK2
	A*02:06	4094	62GK2
	A*02:03	3753	62GK2
	A*69:01	1413	
	A*25:01	1158	

		MFI	Eplet
Patient 4	Ctrl Neg	20	
	Ctrl Pos	7221	
	A*11:02	2643	151AHA
	A*11:01	2466	151AHA
	B*08:01	1791	
	B*07:02	1619	

		MFI	Eplet
Patient 2	Ctrl Neg	37	
	Ctrl Pos	13629	
	B*57:03	2416	62GRN
	B*57:01	2277	62GRN
	B*58:01	2144	62GRN
	A*01:01	1581	
A*02:06	1002		

		MFI	Eplet
Patient 5	Ctrl Neg	91	
	Ctrl Pos	12835	
	B*45:01	11410	163LS/G
	B*44:03	10335	163LS/G
	B*82:01	9252	163LS/G
	B*15:12	9022	163LS/G
	B*44:02	8685	163LS/G
	B*50:01	1317	
	B*41:01	1121	

		MFI	Eplet
Patient 3	Ctrl Neg	32	
	Ctrl Pos	5989	
	A*29:02	3481	62LQ
	A*29:01	3047	62LQ
	A*43:01	2441	62LQ
	B*73:01	658	
	B*78:01	431	

Tableau III: We present the MFI results of three patients selected in our data bases. For each of those patients the positive MFI value (superior to the 2000 cut-off) can be explained by an eplet sharing and the beads MFI hierarchy is coherent with our vision presented in the Tableau Ia and Ib. Those datas supports our second assumption (A2) and allow the application of our mathematical treatment.

		MFI	Eplets	
Patient 6	Ctrl Neg	54		
	Ctrl Pos	9392		
	B*57:03	7384	62GRN	71SA
	B*57:01	7353	62GRN	71SA
	B*58:01	7044	62GRN	71SA
	B*15:16	2380	71SA	
	B*15:12	908		
B*56:01	813			

		MFI	Eplets	
Patient 8	Ctrl Neg	18		
	Ctrl Pos	5059		
	C*17:01	11815	73AN	80K
	C*18:02	10906	73AN	80K
	C*04:01	10605	73AN	80K
	C*06:02	9232	73AN	80K
	C*02:02	3482	80K	
	C*05:01	3265	80K	
	C*15:02	3072	80K	
	B*27:05	774		
	B*15:12	738		

		MFI	Eplets	
Patient 7	Ctrl Neg	79		
	Ctrl Pos	11541		
	A*23:01	12191	65GK	62EE
	A*24:02	11887	65GK	62EE
	A*24:03	11855	65GK	62EE
	A*80:01	3872	62EE	
	B*15:02	984		
	A*11:02	734		

Presentation of three patient analyze results and comparison with the HLAMatchmaker ones:

Patient 9: She's a 69 years old woman waiting for a heart transplantation. Her husband is B*40:01 and B*40:02. Those two HLA alleles carry the 41T eplet and could be implicated in the immunologic story of this patient.

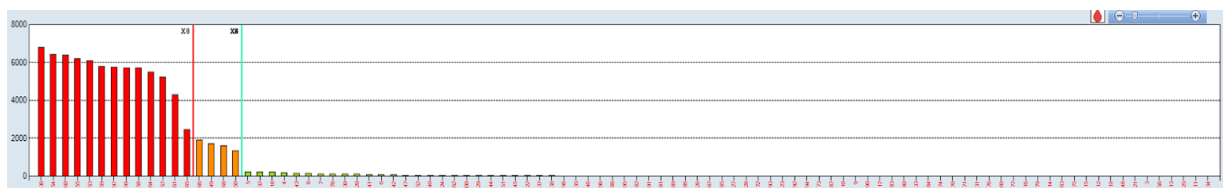


Figure 1: Patient 9: Fusion Patient 9 profile copy showing quite consistent MFI value for the beads with MFI over the 2000 cut-off.

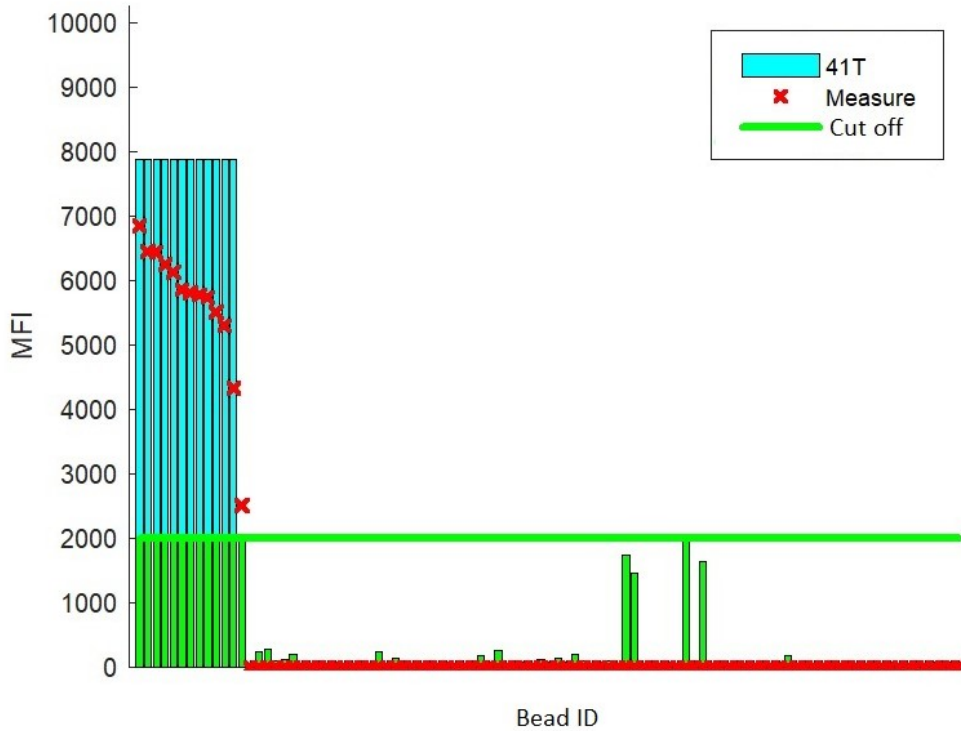


Figure 2: Patient 9: Our algorithm results of the Patient 9 profile showing that the constant MFI results can be explained by the sharing of the 41T eplet between the beads with positive MFI results. Those results let us suspect a patient-specific immunization against this eplet.

Tableau IV: Patient 9: HLA-Matchmaker connected to the fusion 4.2 Version Patient 9 profile analysis results showing the sharing between the beads with positive MFI results of the 41T eplet but also reporting as potentially implicated other eplets (80TA, 144QL, 45KE, 162GLS, and 199V) which do not seem pertinent in this case.

Allele	Bead ID	Raw	Rxn	Eplets Ab Verified
B*13:02	036	6852	POS	41T, 80TA, 144QL
B*40:02	054	6454	POS	41T, 45KE
B*49:01	060	6434	POS	41T, 45KE
B*41:01	055	6250	POS	41T, 45KE
B*40:01	053	6130	POS	41T, 45KE
B*45:01	059	5864	POS	41T, 45KE, 162GLS
B*13:01	097	5809	POS	41T, 80TA, 144QL
B*40:06	099	5780	POS	41T, 45KE
B*44:03	058	5741	POS	41T, 45KE, 80TA, 162GLS, 199V

B*50:01	064	5512	POS	41T, 45KE
B*44:02	057	5298	POS	41T, 45KE, 80TA, 162GLS, 199V
B*47:01	061	4335	POS	41T, 45KE
B*51:01	065	2511	POS	
B*51:02	066	1959	NEG	
B*35:01	049	1747	NEG	

Patient 10: She's a 63 years old woman, who had two children with her husband who bears the B13 gene and protein. We did not have a four digit HLA typing of the husband nor the children but the laboratory concluded to an intrafamilial immunization for this patient. Most of the B13 carry the 82LR eplet. Only one exception the B*13:09.



Figure 3: Patient 10: Fusion Patient 10 profile copy showing quite consistent MFI value for the beads with MFI over the 3000 cut-off.

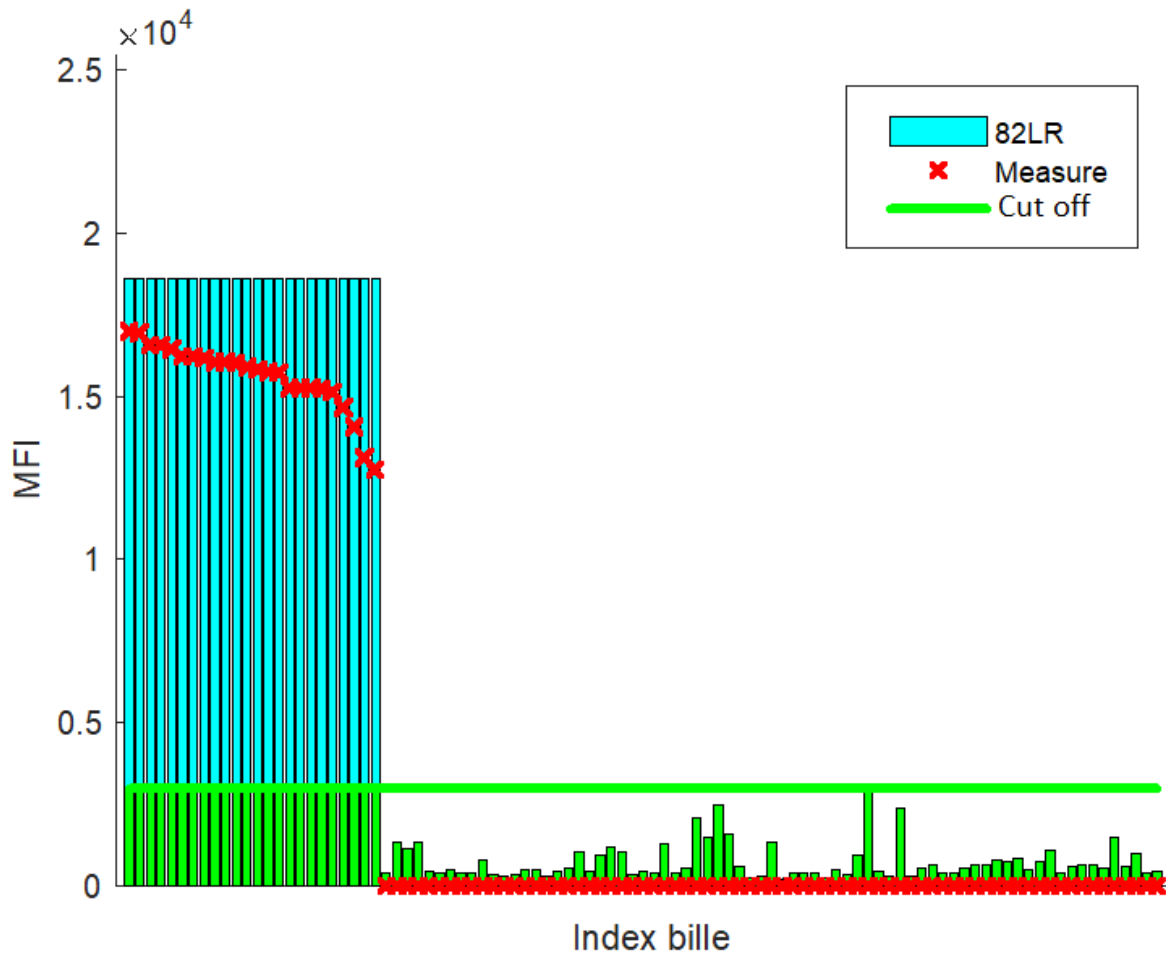


Figure 4: Patient 10: Our algorithm results of the Patient 10 profile showing that the constant MFI results can be explained by the sharing of the 82LR eplet between the beads with positive MFI results. Those results let suspect a patient specific immunization against this eplet.

Tableau V: Patient 10: HLAMatchmaker connected to the fusion 4.2 Version Patient 10 profile analysis results showing the sharing between the beads with positive MFI results of the 82LR eplet but also reporting as potentially implicated a lot of other eplets which do not seem pertinent in this case.

Allele	Bead ID	Raw MFI	Rxn	Eplets Ab verified
B*49:01	60	19998	POS	71TTN, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+69TNT, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*57:03	73	19954	POS	62GRN, 65RNA+80I, 71SA, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA, 97V
B*38:01	51	19570	POS	71TTN, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+69TNT, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*27:05	16	19562	POS	71ATD, 76ED, 80TLR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA

B*51:02	66	19456	POS	71TTN, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+69TNT, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*58:01	74	19222	POS	62GRN, 65RNA+80I, 71SA, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*37:01	50	19217	POS	71TTD, 76ED, 80TLR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
A*32:01	21	19060	POS	65RNA+80I, 76ESI, 80I, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138M, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*53:01	68	19048	POS	71TTN, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+69TNT, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
A*24:03	12	19014	POS	65GK, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138M, 82LR+145R, 82LR+145RA, 144KR+127K
B*15:16	46	19167	POS	62RER, 65RNA+80I, 71SA, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
A*24:02	11	18906	POS	65GK, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138M, 82LR+145R, 82LR+145RA, 144KR+127K, 163TG
A*23:01	10	18839	POS	65GK, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138M, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA, 163TG
A*25:01	13	18764	POS	65RNA+80I, 76ESI, 80I, 81ALR, 82LR, 82LR+138M, 82LR+144QR, 82LR+145R
B*57:01	72	18729	POS	62GRN, 65RNA+80I, 71SA, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA, 97V
B*15:13	45	18259	POS	71TTN, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+69TNT, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*59:01	75	18257	POS	71TTN, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+69TNT, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*52:01	67	18264	POS	71TTN, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+69TNT, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA

B*51:01	65	18220	POS	71TTN, 76ENI, 76ENR, 80I, 80I+69TNT, 80I+90A, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*44:03	58	18130	POS	71TTN, 76ENR, 80TA, 80TLR, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA, 199V
B*13:02	36	17660	POS	71TTN, 76ENR, 80TA, 80TLR, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 144QL
B*47:01	61	17065	POS	71TTD, 76ED, 80TLR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA
B*44:02	57	16124	POS	71TTN, 76ENR, 80TA, 80TLR, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 82LR+144QR, 82LR+145R, 82LR+145RA, 199V
B*13:01	97	15745	POS	71TTN, 76ENR, 80TA, 80TLR, 81ALR, 82LR, 82LR+90A, 82LR+138T, 144QL
B*50:01	64	1882	NEG	
B*15:03	42	1673	NEG	

Patient 11: He is a 48 years old man waiting for his third renal transplantation. He was transplanted in 1986 with an A24 kidney which was removed in 1987 because of humoral rejection. His immunization profile is stable since then. Most of the A24 carry the 127K eplet.

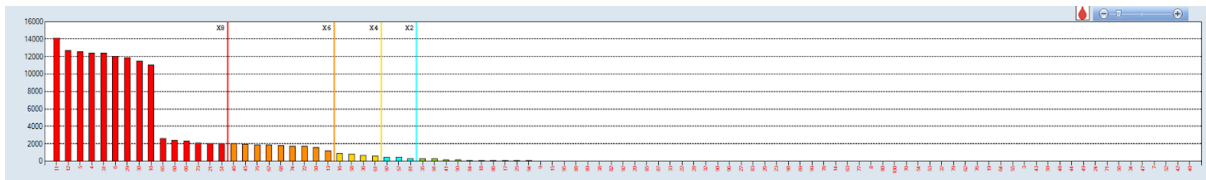


Figure 5: Patient 11: Fusion Patient 11 profile copy showing quite consistent MFI value for the beads with MFI over the 2000 cut-off.

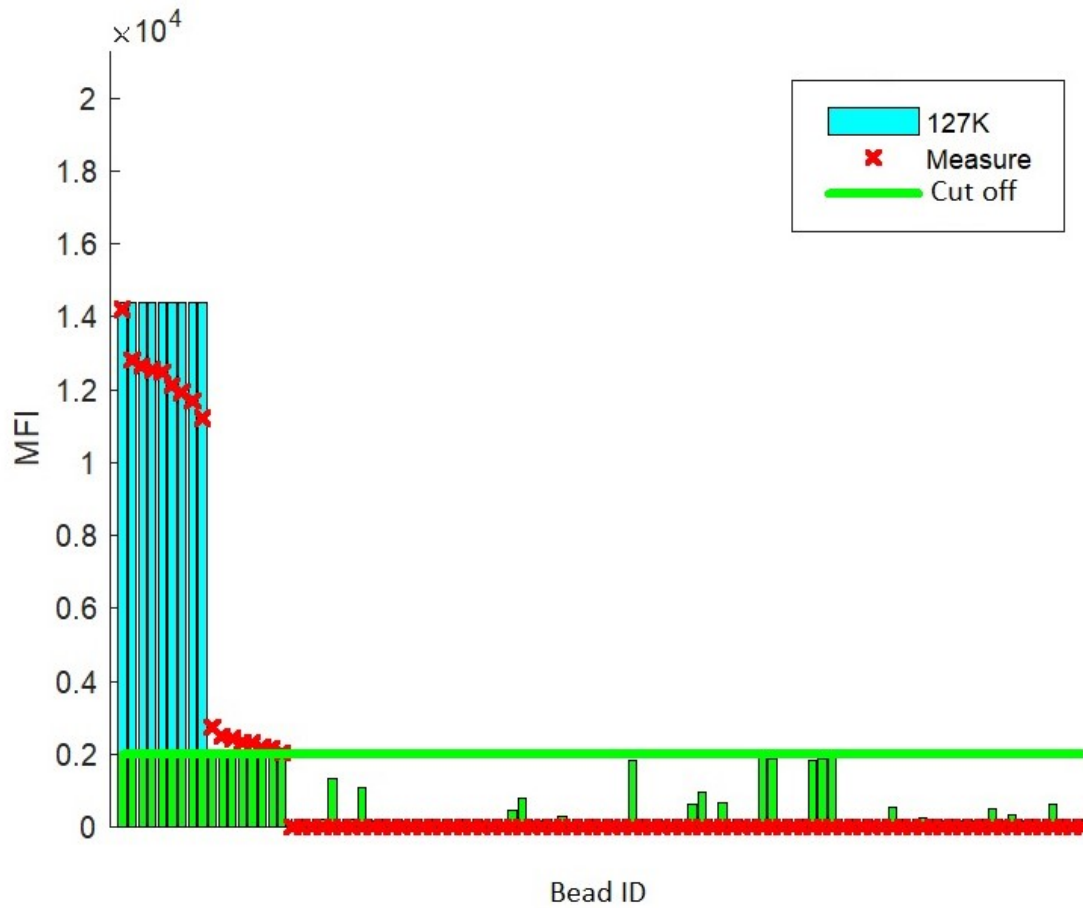


Figure 6: Patient 11: Our algorithm results of the Patient 11 profile showing that the constant MFI results can be explained by the sharing of the 127K eplet between the beads with positive MFI results. Those results let suspect a patient specific immunization against this eplet.

Tableau VI: Patient 11: HLAMatchmaker connected to the fusion 4.2 Version Patient 11 profile analysis results showing the sharing between the beads with positive MFI results of the 127K eplet but also reporting as potentially implicated a lot of other eplets which do not seem pertinent in this case.

Allele	Bead ID	Raw MFI	Rxn	Eplets Ab verified
A*24:02	011	14204	POS	65GK, 66KAH, 127K, 144KR+127K, 151AHV, 163TG
A*24:03	012	12804	POS	65GK, 66KAH, 127K, 144KR+127K, 151AHV
A*02:03	005	12644	POS	43Q+62GER, 62GK2, 66KAH, 94TV, 107W, 127K, 144TKH, 145HT
A*02:01	004	12533	POS	43Q+62GER, 62GK2, 66KAH, 94TV, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 151AHV

A*69:01	031	12469	POS	94TV, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 151AHV
A*02:06	006	12111	POS	43Q+62GER, 62GK2, 66KAH, 94TV, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 151AHV
A*68:01	029	11912	POS	127K, 144TKH, 145KHA, 151AHV, 245VA
A*68:02	030	11684	POS	11SM, 127K, 144TKH, 145KHA, 151AHV, 245VA
A*23:01	010	11207	POS	65GK, 66KAH, 127K, 163TG
B*51:01	065	2730	POS	
B*49:01	060	2488	POS	
B*51:02	066	2419	POS	
B*15:16	046	2333	POS	
B*57:03	073	2310	POS	
A*32:01	021	2176	POS	
B*38:01	051	2151	POS	
B*15:13	045	2036	POS	
B*59:01	075	1991	NEG	
B*52:01	067	1972	NEG	

4 - Discussion:

The Model and the assumptions:

In order to fit with a mathematical approach of this problem we have to make some compromises. The first one is the assumptions used for the formulation. Those ones seems realistic and coherent with the data provided. They also give interesting results as presented. One of this work major difficulties is to modelize the complexity of the alloantibody immunization and of the luminex single antigen tests all in one. MFI results variations can be due to a lot of variables like the density differences of the HLA molecule coated on beads during the fabrication process, the proportion of undenatured/denatured HLA molecules presents on the bead surface, eplets steric microenvironment which could influence the antibody affinity and the unspecific fixation. This tool can be abused as HLAMatchmaker by false positive MFI results due to unspecified fixation or fixation on denatured HLA molecules. Those kind of variations because of their unpredictability and the fact that they are still not well understood aren't yet handled by our model.

The ability of the algorithm to let the reader fix a cut off and the statistical base avoid some of those deceptions.

We also remind that the Luminex MFI interassay results variability is about 20% (Visentin, Guidicelli, Bachelet et al., 2014). It adds some difficulties for the application of a mathematical approach.

Results discussion:

All of the sera used for the realization of the single antigen tests presented in this paper have had a heat treatment in order to avoid the prozone effect before testing (56°C for 30 min).

The results presented in this paper were obtained on a Luminex and with Single Antigen Class I, One Lambda, ThermoFisher reagent sets.

For the presented patients eplets sharing can explain the positive results observed. Our tool allows to find those eplets easily. It's longer to analyze the HLAMatchmaker results.

Unfortunately, we can't provide the four digit HLA typing of the immunizer for our examples. Those patients have been selected because of the consistency of their Single antigen results. It lets suspect real immunizations.

The interest of our results is the consistency with the HLAMatchmaker latest version ones. Eplets presented as reactive in our results are present in the HLAMatchmaker ones and our tool allows to highlight them without any effort. It's a time saving approach which can be used in routine.

Perspectives:

The mathematical treatment of the data is strong and interesting. Unfortunately, the One Lambda Class I Single Antigen reagent set panel design limits our work because of eplet masking as in the following example.

This patient 12 is a 59 years old woman. She was transplanted with a A24 A02 kidney in 1992 but because of graft failure this kidney has been removed in 1993 and this immunization profile appear after. We don't have the four digits HLA typing of the kidney transplanted but most of the A24 alleles carry at the same time the 144K and the 144KR eplets. The only exception is the A*24:94 which only carry the 144K eplet and not the 144KR one.



Figure 7: Patient 12: Fusion Patient 12 profile copy showing a demarcation in the MFI value for the beads with MFI over the 2000 cut-off.

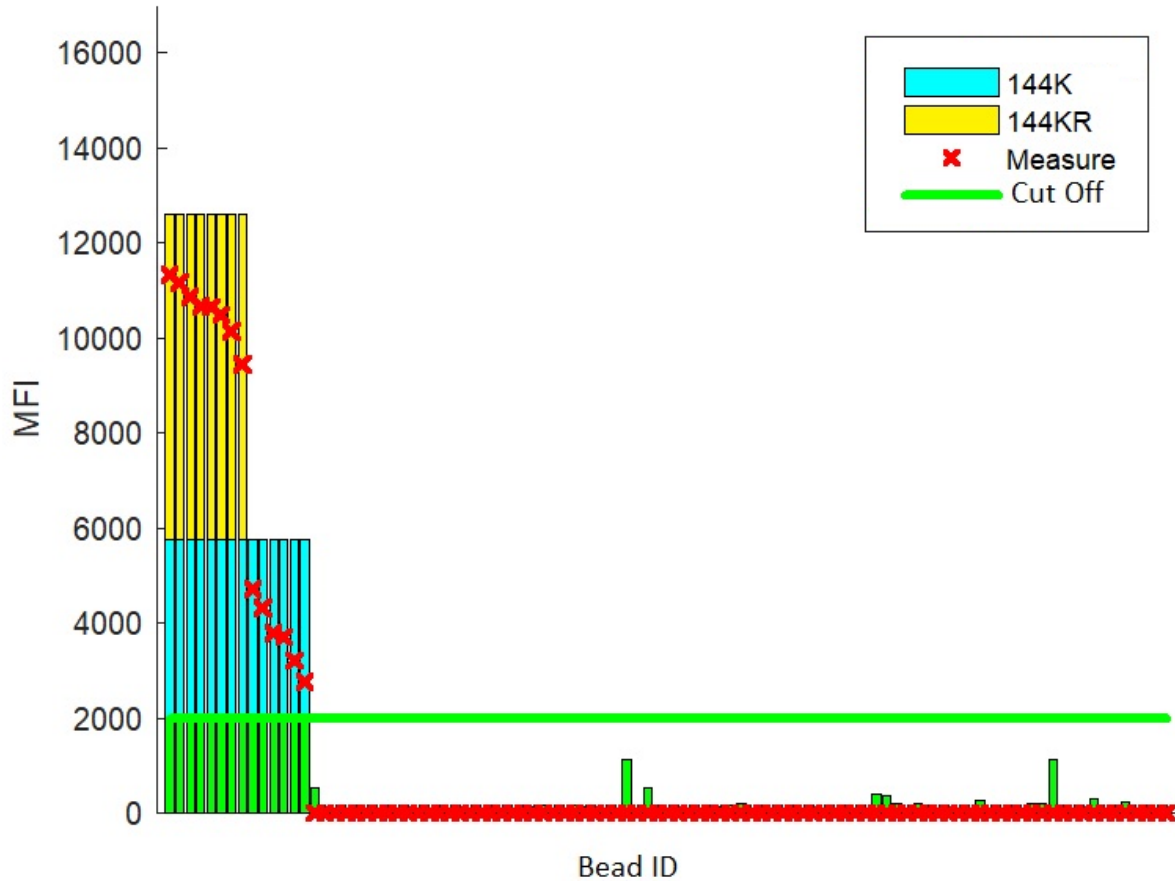


Figure 8: Patient 12: Our algorithm results of the Patient 12 profile showing that the MFI results can be explained by immunization against the 144K and the 144KR eplets.

Tableau VII: Patient 12: HLAMatchmaker connected to the fusion 4.2 Version Patient 12 profile analysis results. We find the same eplets as the one presented in our tool analysis. This case is presented in order to show the kind of matters that we could be confronted to in order to establish a discussion and highlight our work limits and the interest to compare the HLAMatchmaker results with our in those kinds of cases.

Allele	Bead ID	Raw MFI	Rxn	Eplets Ab verified
A*01:01	3	11329	POS	44KM3, 144K, 144KA, 144KR, 144KR+151H, 149AH, 152HA, 163RG
A*24:03	12	11158	POS	144K, 144KA, 144KR, 144KR+127K, 144KR+151H, 149AH, 150AAH, 151AHV
A*24:02	11	10856	POS	144K, 144KA, 144KR, 144KR+127K, 144KR+151H, 149AH, 150AAH, 151AHV
A*80:01	33	10660	POS	56E4, 144K, 144KA, 144KR
A*11:02	9	10651	POS	144K, 144KA, 144KR, 144KR+151H, 149AH, 150AAH, 151AHA, 152HA

A*36:01	25	10482	POS	44KM3, 144K, 144KA, 144KR, 144KR+151H, 149AH, 152HA
A*11:01	8	10141	POS	144K, 144KA, 144KR, 144KR+151H, 149AH, 150AAH, 151AHA, 152HA
A*03:01	7	9445	POS	144K, 144KA, 144KR, 144KR+151H, 149AH, 150AAH, 161D
A*68:01	29	4709	POS	144K, 144KA, 144TKH, 145KHA, 149AH, 150AAH, 151AHV, 245VA
A*02:01	4	4310	POS	43Q+62GER, 62GK2, 94TV, 107W, 144K, 144KA, 144TKH, 145KHA, 149AH, 150AAH, 151AHV
A*02:06	6	3790	POS	43Q+62GER, 62GK2, 94TV, 107W, 144K, 144KA, 144TKH, 145KHA, 149AH, 150AAH, 151AHV
A*02:03	5	3698	POS	43Q+62GER, 62GK2, 94TV, 107W, 144K, 144TKH, 145HT
A*68:02	30	3212	POS	11SM, 144K, 144KA, 144TKH, 145KHA, 149AH, 150AAH, 151AHV, 245VA
A*69:01	31	2758	POS	94TV, 107W, 144K, 144KA, 144TKH, 145KHA, 149AH, 150AAH, 151AHV
B*27:08	48	1116	NEG	
C*07:02	89	1113	NEG	

Our tool, because of our formulation report as potentially implicated the 144K and 144KR eplets. We drive the reader attention on the fact that most of the A02 carry the 144TKH eplet. In this case, because of the immunologic patient story with an A02 kidney, it's impossible to conclude on the implication of the 144KR and 144TKH eplet in the positive results or if those positives results came from antibody fixation on the three following eplets (144K, 144TKH and 144KR).

In this case, a matrix with beads carrying one of the eplet of interest and not the other ones eplet will lead to great conclusion. We made the theoretical work of building one with the data extracted from the HLA ep registry website. It's possible to make one for the verified eplets and the MFI results provided by that kind of matrix could be interpreted by our model in its actual form. It would represent a real optimization because it could allow to better interpret the possibility of an eplet specific immunization implication in the MFI positives results even in poly immunizations cases. It also could allow to confirm eplet specific immunization suspected on the actual techniques results. We can imagine to test sera with a complementary panel and combine the results with the one obtained with the actual reagents sets in order to approach those conditions.

Our tool is actually designed to work with the One lambda reagents sets results but an adaptation will allow to work with the Immucor ones.

In the future we want to refine our work. We may adapt our tool to treat the HLA class 2 single antigen tests results.

We already add the unverified eplets in another version of the system. It gives interesting results and allow us to find two case report of specific unverified eplet immunization (Report submitted). We have to define the most interesting interpretation strategy to use between the insertion of the unverified eplet in the actual matrix or sequential treatment with the verified eplet first and the unverified then. It's an interesting way to explore big data bases for immunization against unverified eplet research because of the analysis rapidity.

It could be great to treat all the MFI result obtained for a patient together and to add to this system the date of the immunizing event and their specificity.

The major difficulty of this work is to find a way to include the MFI modifications due to antibodies affinity differences and their competition.

We are probably in front of steric encombrement matters for the eplets separated with less than 10-15 Angstroms.

All those kinds of interactions are not yet well understood and a lot of work has to be done in order to better understand those phenomenons.

5 - Conclusion:

In conclusion we present a mathematical model able to highlight the most probable eplets involved in MFI results.

Those results are consistent with the HLAMatchmaker ones.

We have to better explore the result obtained in poly eplets immunizations cases in order to better understand the MFI modification induced. Literature is nonexistent on this point.

The major interest of this tool is it analyze rapidity. It allows the screening of big data bases and the routine use.

The conclusion of an eplet implication in an immunization cases and the HLA four digit donor typing could allow to predict the immunity reaction against HLA alleles untested with the actual methods. Those ideas may allow to reconsider the donor-receiver actual attributions to benefit the graft outcomes.

6 – References:

The references of this article have been added to the end with the whole references of this work.

III – Discussion

1 - Capacité de l'algorithme présenté

Les résultats des analyses réalisées par notre algorithme ainsi que sa facilité d'utilisation sont intéressants. Il permet de rapidement savoir si la présence d'un épitope commun entre différentes molécules HLA pourrait permettre d'expliquer les résultats de MFI positifs observés.

Nous avons contacté l'équipe de Frans Claas (Leiden, Pays Bas) experte sur le sujet en vue d'obtenir des profils à analyser avec des immunisations spécifiques de certains épitopes déjà mises en évidence par leur travail afin de constituer une vérité terrain. Nous avons obtenu 20 profils à analyser et malgré des résultats intéressants, cette équipe n'a pas pu nous fournir des typages 4 digits d'immunisants potentiels qui nous auraient permis de conclure l'interprétation de nos résultats. En effet, l'obtention des typages en 4 digits des patients ainsi que des immunisants potentiels est indispensable à l'interprétation des études épitopiques. Bien que ces informations ne soient pas toujours disponibles pour les cas anciens, elles seront facilement accessibles pour les cas plus récents grâce à la généralisation de la technique de NGS (Next Generation Sequencing) pour la réalisation des typages HLA.

La stratégie de validation que nous avons tenté de mettre en place est intéressante pour faire face au manque de données disponibles dans la littérature sur le sujet. Nous continuons nos investigations de manière à repérer des cas d'immunisation spécifique et avérée d'un ou plusieurs épitopes afin de pouvoir analyser les résultats de SAG qui en découlent et encore conforter la validité de notre travail.

L'absence de données sur le sujet dans la littérature est le principal frein de ce type d'étude. Il est nécessaire de recenser les cas d'immunisation spécifique d'un ou plusieurs épitopes ainsi que les données qui en découlent de manière à en permettre l'étude. Ces cas peuvent être repérés par analyse fine des résultats du logiciel HLAMatchmaker mais aussi par l'utilisation de notre méthode. Ces travaux permettront de mieux comprendre les limites de la technique de SAG et de combler le manque de littérature notamment dans le domaine des modifications de MFI induites par la fixation d'anticorps sur plusieurs eplets présents sur une même molécule HLA dans les tests de Single Antigen.

2 - Problème de matrice

Nous avons vérifié la composition des panels des tests de Single Antigen Classe I Luminex One lambda qui est constante depuis les lots 5 jusqu'à nos jours. L'ordre des allèles varie légèrement mais il est très simple de contrer ces différences en reclassant les résultats de MFI de manière concordante avec l'ordre de notre matrice via une simple feuille Excel pour permettre l'application de notre traitement. Les résultats issus des lots 8 jusqu'à ceux utilisés de nos jours ne nécessitent aucune modification pour être interprétés par notre travail.

Il est important de noter que les panels de test de SAG classe I Luminex One lambda présentent une difficulté majeure. En effet, ils ne permettent pas toujours de conclure sur l'implication d'un épitope dans les résultats de fluorescence positifs par absence de bille portant l'épitope pour lequel des doutes persistent et aucun des autres potentiellement impliqués comme c'est le cas pour le Patient 12 de l'article présentant notre travail.

Nous avons exploré la possibilité de sélectionner des allèles permettant de créer un panel théorique qui supprime ces problèmes à la fois pour les épitopes vérifiés et les non vérifiés.

Après extraction de toutes les compositions épitopiques d'allèles présentes sur le site de référence HLAepregistry, nous avons sélectionné 222 allèles permettant de répondre à ces critères (sélectionnés pour constituer une matrice de rang complet). À ces 222 allèles présélectionnés nous avons décidé de rajouter 35 allèles supplémentaires de manière à disposer dans ce panel théorique de 3 répétitions de chaque eplets lorsque c'était possible.

En effet, il est important de supprimer au maximum les épitopes présents une seule fois sur le panel car une MFI positive de la bille qui les porte ne présente pas un argument suffisant pour conclure sur leur implication dans les résultats positifs. Le fait de disposer de trois billes portant cet épitope est statistiquement plus significatif en cas de positivité

Les résultats de MFI obtenus via ce type de panel pourraient être interprétés par la méthode que nous avons présentée et en optimiseraient le fonctionnement.

3 - Utilisation de la notion d'épitope pour conclure sur la positivité des billes dont la MFI est légèrement inférieure au seuil de positivité

Le consensus actuel en France est de considérer comme positifs tout résultat de MFI supérieur à 2000 (Agence de la Biomédecine - Compte rendu de la réunion Nationale des laboratoires HLA du Mardi 22 Novembre 2016). Notre outil permet de détecter facilement la présence d'un épitope commun entre les billes à MFI positives et celles légèrement inférieures au seuil. Dans ces cas, il apparait pertinent de conclure à la positivité des billes légèrement inférieures au seuil de positivité pour éviter de futures déconvenues immunologiques.

4 - Stratégie actuelle d'attribution des greffons

L'attribution des greffons disponibles se fait actuellement par l'Agence de la Biomédecine via le site CRISTAL. Dans ce logiciel sont référencés toutes les receveuses et tous les receveurs inscrits en France ainsi que leurs spécificités HLA interdites. Celles-ci sont renseignées par les laboratoires HLA en fonction des résultats de tests de Single Antigen. Ainsi, tout résultat de MFI supérieur à 2000 pour une spécificité entraîne son passage, après traduction en équivalent sérologique, en spécificité interdite pour la greffe. Dans le cas des greffes ou le pronostic vital n'est pas engagé (par exemple rein et poumon dans les schémas classiques), les greffons présentant une spécificité interdite pour un patient ne lui sont pas proposés. Dans des cas de mauvais pronostic vital, ces règles peuvent ne pas être respectées. C'est notamment le cas pour les greffes cardiaques en urgence. Les règles d'attributions des greffons varient parfois en fonction des centres ainsi que des organes. On sait par exemple que les reins et les poumons sont plus sensibles aux réponses immunologiques que les cœurs ou les foies. Ces phénomènes sont encore mal compris et sont probablement liés à la nature intrinsèque différente des organes.

Nous précisons que le mode de fonctionnement actuel de CRISTAL nécessite la traduction en équivalent sérologique des spécificités interdites obtenues via les tests de Single Antigen pour des raisons historiques. Cette traduction entraîne une perte d'information non négligeable dans le contexte actuel tendu par le manque d'organes disponibles et le nombre toujours plus importants de receveurs potentiels. En effet, la positivité d'une des trois billes A02 présente dans les tests de Single Antigen One Lambda entraîne la contre-indication de tous les greffons A02. Cette stratégie, bien que sécuritaire n'apparait pas optimale. Une des explications à la positivité d'une seule des billes A02 sur les trois présentes dans le test peut être un partage d'eplet avec les autres billes positives de l'expérience.

La capacité à mettre en évidence des immunisations spécifiques d'éplets apporterait deux notions particulièrement intéressantes que la stratégie de matchs sérologiques actuelle ne prend pas toujours en compte.

D'abord, en cas d'immunisation épitopique avérée, il apparaîtrait intéressant d'interdire à la greffe tous les allèles qui portent cet eplet. Ce qui n'est pas le cas via la stratégie sérologique actuelle. Par exemple, une immunisation spécifique contre l'éplet 80K porté dans les tests de Single Antigen One Lambda par les allèles C*02:02, C*04:01, C*05:01, C*06:02, C*15:02, C*17:01 et C*18:02. Entraîne après traduction sérologique une incompatibilité avec les greffons Cw2, Cw4, Cw5, Cw6 et les C15, C17 et C18 même s'ils n'ont pas d'équivalent sérologiques. À noter que les immunisation anti-C sont ajoutées dans un champ libre et non prises en compte par CRISTAL pour l'attribution des greffons. Les tests effectués, sans analyses épitopiques précises, ne laissent pas présager de réaction contre d'autres molécules HLA alors que le B*41:05 ou encore le C*16:02 portent ce même eplet 80K. Nous avons pu illustrer cette notion avec le case report N°3 présenté dans les travaux annexes ou une étude épitopique attentive nous a permis de suspecter une immunisation épitopique spécifique confirmée par des analyses complémentaires. Ce travail a permis d'interdire à la greffe pour ce patient un allèle que le système actuel d'analyse laissait disponible. Cet exemple est à la fois une démonstration de certaines des limites des tests et des stratégies actuelles ainsi que de l'intérêt de réaliser des analyses épitopiques précises afin d'éviter des déconvenues immunologiques.

Ensuite, il pourrait être intéressant de discuter de la possibilité de ne pas interdire à la greffe les allèles que la stratégie de match sérologique excluait mais qui ne portent pas les épitopes contre lesquels une réaction immunitaire a été mise en évidence. Cette stratégie pourrait être particulièrement bénéfique aux patients hyperimmunisés pour lesquels très peu de solutions peuvent actuellement être proposées. Pour reprendre notre exemple d'une immunisation spécifique contre l'épitope 80K entraîne une interdiction de tous les greffons Cw4 alors que le C*04:09 ou le C*04:11 ne porte pas l'éplet 80K.

La mise en place de telles stratégies nécessite encore beaucoup de travail de validation mais sont des pistes d'optimisation notamment pour les greffes de patients hyperimmunisés.

Forces et limites de ce travail

Ce travail s'appuie sur une idée originale visant à optimiser les compatibilités hôte-greffons ainsi que des collaborations dont certaines internationales. Une partie de ce travail est rédigée en Anglais sous la forme d'un article scientifique et les travaux annexes présentent 3 cases reports rapportant des cas d'immunisation contre des épitopes qui étaient jusque-là « non vérifiés ».

Malheureusement, il nous a été impossible de démontrer expérimentalement l'intérêt de nos travaux. En effet, nous ne disposons pas dans nos laboratoires de cellules de typage adéquat pour réaliser des essais. Nous allons, néanmoins, détailler tous les éléments nécessaires pour tenter d'y parvenir dans la partie Perspective de notre travail.

V – Conclusion

En conclusion, nous présentons un outil fonctionnel, utilisable en routine, et capable de faciliter la réalisation d'analyses épitopiques. La rapidité d'obtention des résultats au regard des autres moyens actuellement disponibles est une avancée. La facilité et l'accessibilité de ces informations va permettre d'augmenter le nombre de données traitées et donc les connaissances sur ce sujet notamment pour en développer l'utilisation et l'intérêt pratique.

Les prochaines avancées dans le domaine de l'immunogénétique et de la compatibilité de greffe passeront, très probablement et entre autres avancées scientifiques, par une meilleure compréhension de ces phénomènes couplée à la mise à disposition des typages 4 digits des donneurs.

VI – Perspectives

1 - Applications de l'algorithme à la recherche d'épitopes non vérifiés

L'analyse d'un grand nombre de résultats de test de Single Antigen nous a permis de rapporter trois Cases Reports d'immunisation spécifiques dirigées contre des épitopes qui étaient jusque-là non vérifiés. Ces cases reports sont présentés dans les Travaux annexes. Pour chacun de ces cases reports toutes les billes du test qui portent l'épitope non vérifié présentent des résultats de MFI positifs. Notre algorithme, par sa conception, peut repérer ces cas. Du travail est encore nécessaire pour définir quelle est la meilleure stratégie à adopter pour ces recherches. Plusieurs options sont possibles : nous pouvons intégrer tous les épitopes non vérifiés au fonctionnement global ou créer un module secondaire dédié à cet exercice. Cette seconde option semble plus intéressante et pourra permettre l'exploitation rapide de grandes bases de données.

2 – Utilisation de ce travail pour repérer des profils d'intérêts et proposition de travaux expérimentaux à réaliser

L'utilisation de notre programme permet de repérer et de rassembler des profils d'immunisation épitopique spécifique. De manière générale, des échantillons des sérums ayant conduit aux résultats de tests de Single Antigen sont disponibles dans les laboratoires pour réalisation d'analyses complémentaires. La disponibilité de ces échantillons permet d'envisager la réalisation de crossmatch cytométrie et de crossmatch LCT avec des cellules d'intérêt pour explorer les conséquences de mismatches épitopiques caractérisés. Il est possible de tester des associations entre des cellules et des sérums que le système actuel d'attribution des greffons autorise mais qui présentent des mismatch épitopiques. Ces expériences permettront de statuer sur l'intérêt ou non de modifier les stratégies actuelles en vue d'éviter ces mismatches.

La réalisation de ces expériences nécessite l'accès à des cellules de typages variés et rares. Une mise en commun des ressources Nationale est un moyen d'y accéder. Une autre des pistes à explorer est le dépôt auprès des Comité de Protection des Personnes d'un projet expérimental. L'accord de ces Organismes permettra d'accéder à la possibilité de contacter les Donneurs Volontaires de Moelle Osseuse pour obtention de cellules (Lymphocytes T et B). Ces registres recensent de nombreux individus déjà HLA typés qui permettent de répondre aux nécessités expérimentales. Dans l'idéal, il faudrait respecter toutes les spécificités interdites rapportées pour un patient de manière à se placer exactement dans les conditions d'attribution d'un greffon. Ces contraintes diminuent les possibilités de compatibilité ce qui augmente la difficulté à trouver du matériel pour réaliser les expériences. Ces précautions sont prises pour éviter la réactivation immunitaire de certaines spécificités, in vivo, chez le patient à la faveur de restimulation. Le travail sur sérum, qui représente une situation immunologique fixe, ne nécessite pas ces précautions. La prise en compte des spécificités détectées au sein de l'échantillon uniquement semble être une stratégie pertinente pour permettre la réalisation des tests d'intérêt.

Une autre piste à évoquer dans l'objectif de la réalisation de ce genre d'expérience est la possibilité d'avoir recours à des cellules génétiquement modifiées pour exprimer à leur surface un seul type de molécule HLA. Bien que cela représente un budget et un travail important cette stratégie permettrait de se soustraire aux problèmes de compatibilité.

VII – Travaux Annexes

Nous présentons trois case reports d'immunisation contre des épitopes non vérifiés rapportés au cours de ce travail. Ces cas sont des éléments probants en faveur du changement de statut de ces épitopes dans les référentiels internationaux (passage de « Non vérifiés » vers le statut « Vérifiés »). La méthode présentée dans ce travail permet notamment le screening de grandes bases de données à la recherche de ce type de cas.

Received: 17 May 2018 | Revised: 19 June 2018 | Accepted: 28 June 2018
DOI: 10.1111/tan.13331

WILEY HLA
Immune Response Genetics

BRIEF COMMUNICATION

Case report: A transplant candidate with unexpected serum reactivity against the 45KE eplet on HLA-B alleles

Bastien Cauquil¹ | Guillaume Dautin¹ | Rene J. Duquesnoy²

¹EFS Bourgogne Franche-Comté, Laboratoire d'immunogénétique, Dijon, France

²Division of Transplant Pathology, Thomas E. Starzl Transplantation Institute, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, Pennsylvania

Correspondence

Bastien Cauquil, EFS Bourgogne Franche-Comté, Laboratoire d'immunogénétique, Dijon, France.
Email: bastien.c@hotmail.fr

This case report describes the serum antibody specificity against the 45KE eplet which had not been yet shown to be antibody-verified. This antibody was produced by a 41-year-old European male with Berger's disease. His serum had HLA class I antibody reactivity as determined in IgG binding assays with single allele panels (OneLambda, ThermoFisher, Lot 8 and Lot 9). The HLAMatchmaker analysis revealed reproducible serum reactivity only with alleles carrying the 45KE eplet. The cause of this 45KE-specific immunization is unknown because this male patient had never been transfused nor received a previous transplant. Moreover, his mother's HLA type did not have any 45KE-carrying allele. This finding might be related to observations reported in the literature about the appearance of HLA-reactive antibodies following influenza vaccination but this possibility could not be investigated.

KEYWORDS

45KE, Eplet, HLAMatchmaker

The International Registry of HLA Epitopes established in 2013 as a website (<http://www.epregistry.com.br>) has been recognized as an information resource about HLA epitopes reacting with antibodies associated with transplant rejection and platelet transfusion refractoriness.^{1,2} The registry has epitope repertoires on alleles encoded by HLA-ABC, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP and MICA. So-called eplets are considered essential components of HLA epitopes and they can be defined by molecular modeling and amino acid sequence comparisons within a 3 Ångstrom radius of polymorphic residues on the HLA molecular surface.³ The primary goal of the Registry is to identify epitopes that are verified experimentally with specific antibodies. Such epitopes correspond to individual eplets or to eplets paired with other amino acid configurations shared between reactive alleles.² The repertoires of antibody verified epitopes must still be considered incomplete and HLA professionals have been invited to submit informative serum antibody reactivity patterns associated with newly antibody-verified eplets.

This case report demonstrates the serum antibody specificity against the 45KE eplet which had not been yet shown to be antibody-verified. This antibody was produced by a 41-year-old European male with Berger's disease. His renal

biopsy showed segmental and focal glomerulopathy with IgA and C3 deposits. Since January 2015 he has been on renal dialysis and he has also been placed as a candidate for a kidney transplant.

His HLA type was A*26:01, A*68:01; B*27:05, B*35:01; C*01:02, C*04:01. Although this patient had never been transfused nor received a previous transplant, his serum had HLA class I antibody reactivity as determined in IgG binding assays with single allele panels (OneLambda, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, Lot 8 and Lot 9). The HLAMatchmaker (Version 2.0) analysis revealed reproducible serum reactivity only with alleles carrying the 45KE eplet (Table 1).

These reactivity patterns suggest the presence of antibodies specific for 45KE. This was a surprising finding because the patient is male and had never received blood transfusions nor a transplant. In other words, we could not identify a specific sensitization event leading to these antibodies. We considered the possibility that he during fetal life, might have become sensitized to maternal HLA alleles. However, the mother's HLA type: A*02:01, A*68:01; B*27:05, B*35:01; C*01:02, C*04:01 showed that none of her alleles carried 45KE.

TABLE 1 Patient single allele panels tests MFI results (OneLambda, ThermoFisher, Lot 8 and Lot 9). Serum reactivity with 45KE-carrying alleles

Allele	1-Dec-14 MFI	26-janv-16 MFI	Eplet
Pos control	9577	14 266	
Neg control	64	107	
<i>B*40:01</i>	3962	11 555	45KE-positive
<i>B*40:02</i>	6106	8825	45KE-positive
<i>B*40:06</i>	5748	8296	45KE-positive
<i>B*41:01</i>	4514	7011	45KE-positive
<i>B*44:02</i>	7619	11 289	45KE-positive
<i>B*44:03</i>	1916	6583	45KE-positive
<i>B*45:01</i>	4532	10 322	45KE-positive
<i>B*47:01</i>	4940	11 783	45KE-positive
<i>B*49:01</i>	2888	6523	45KE-positive
<i>B*50:01</i>	4448	11 430	45KE-positive
Self HLA	143 ± 83	156 ± 22	45KE-negative
81 Other alleles	203 ± 302	270 ± 324	45KE-negative

Altogether, we could not identify the immunizing event that led to the presence of 45KE-specific antibodies in sera from this patient. Several reports have describe the appearance of HLA antibodies following vaccination against influenza and other viruses.⁴⁻⁶ Although such vaccinations are common in France we cannot determine if they played a role in the 45KE-specific antibody formation in this patient. We raise the question if other patients can be identified who develop HLA epitope-specific antibodies in the absence of known causes of HLA alloimmunization.

Conflict of interests

The authors have declare no conflicting interests.

ORCID

Bastien Cauquil  <http://orcid.org/0000-0002-6565-7607>

REFERENCES

- Duquesnoy RJ, Marrari M, da Sousa LCDM, et al. 16th IHIW: a website for antibody-defined HLA epitope registry. *Int J Immunogenet.* 2013;40(1): 54-59. <https://doi.org/10.1111/iji.12017>.
- Duquesnoy RJ. Update of the HLA class I eplet database in the website based registry of antibody-defined HLA epitopes. *Tissue Antigens.* 2014;83(6): 382-390. <https://doi.org/10.1111/tan.12322>.
- Duquesnoy RJ. A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level. *Hum Immunol.* 2006;67(11):847-862. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.08.001>.
- Candon S, Thervet E, Lebon P, et al. Humoral and cellular immune responses after influenza vaccination in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9:2346-2354.
- Danziger-Isakov L, Cherkassky L, Siegel H, et al. Effects of influenza immunization on humoral and cellular alloreactivity in humans. *Transplantation.* 2010;89:838-844.
- Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R, et al. De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2011;11(8):1727-1733. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03604.x>.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Cauquil B, Dautin G, Duquesnoy RJ. Case report: A transplant candidate with unexpected serum reactivity against the 45KE eplet on HLA-B alleles. *HLA.* 2018;1-2. <https://doi.org/10.1111/tan.13331>

Case report: a transplant candidate with unexpected serum reactivity against the 193AV eplet on HLA-A alleles.

Bastien CAUQUIL, EFS Alsace, Laboratoire d'Immunogénétique, Strasbourg, France

Corresponding author Bastien CAUQUIL: bastien.c@hotmail.fr

Conflicts of interest notification:

The authors declare no conflict of interest.

Abstract: This case report describes the serum antibody specificity against the 193AV eplet which had not been yet shown to be antibody-verified. This antibody was produced by a kidney polytransplanted 57-year-old European women with membranoproliferative glomerulonephritis. Her serum had HLA class I antibody reactivity as determined in IgG binding assays with single allele panels (OneLambda, ThermoFisher, Lot 10). The HLAMatchmaker analysis revealed reproducible serum reactivity with alleles carrying the 193AV eplet. The cause of this 193AV-specific immunization is probably the first kidney transplant received in 1989.

The International Registry of HLA Epitopes established in 2013 as a website (<http://www.epregistry.com.br>) has been recognized as an information resource about HLA epitopes reacting with antibodies associated with transplant rejection and platelet transfusion refractoriness (Duquesnoy, 2013; Duquesnoy, 2014). The registry has epitope repertoires on alleles encoded by HLA-ABC, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP and MICA. So-called eplets are considered essential components of HLA epitopes and they can be defined by molecular modeling and amino acid sequence comparisons within a 3 Ångstrom radius of polymorphic residues on the HLA molecular surface (Duquesnoy, 2006). The primary goal of the Registry is to identify epitopes that are verified experimentally with specific antibodies. Such epitopes correspond to individual eplets or to eplets paired with other amino acid configurations shared between reactive alleles (Duquesnoy, 2014). The repertoires of antibody verified epitopes must still be considered incomplete and HLA professionals have been invited to submit informative serum antibody reactivity patterns associated with newly antibody-verified eplets.

This case report demonstrates the serum antibody specificity against the 193AV eplet which had not been yet shown to be antibody-verified. This antibody was produced by 57-year-old European women with membranoproliferative glomerulonephritis.

This woman does not have children. We do not have information about pregnancy that would not come to an end.

Since July 1988, she has been on renal dialysis and she has also been placed as a candidate for kidney transplant.

Her HLA type was A*01:01, A*03:01; B*35:01, B*35:03; C*04:01, C*04:01; DRB1*01:01, DRB1*13:02; DQB1*06:04, DQB1*05:01; DQA1*01:01, DQA1*01:02; DPB1*04:01,

DPB1*04:01. This patient had been transplanted with a first kidney typed A3, A28, B7, B35, DR1, DR3 in January 1989.

This first kidney had been removed in July 1990 because of an immunologic reject and she was retransplanted in July 2000 with a kidney typed A3, A23, B44, B35, DR1, DR7.

We lost view of this patient after the second transplant. She came back in 2019 and we discovered her class one immunization.

The HLAMatchmaker (Version 2.0) analysis revealed reproducible serum reactivity with alleles carrying the 193AV eplet (Tableau VIII).

These reactivity patterns suggest the presence of antibodies specific for 193AV probably due to immunization against the first kidney typed A28.

Unfortunately, we can't verify this hypothesis because of first transplant sample unavailability.

Tableau VIII: Patient single antigen tests MFI results (OneLambda, ThermoFisher, Lot 10). Serum reactivity with 193AV-carrying alleles.

	14/02/2019	04/04/2019	
	MFI	MFI	
Neg Control	43	60	
Pos Control	12396	10808	
			eplets
A*02:06	14342	7713	193AV-positive
A*33:01	14151	8149	193AV-positive
A*66:01	13759	8959	193AV-positive
A*69:01	13318	7012	193AV-positive
A*31:01	13113	7486	193AV-positive
A*29:01	12692	7482	193AV-positive
A*68:01	12685	7259	193AV-positive
A*02:03	12576	6869	193AV-positive
A*34:01	12556	8085	193AV-positive
A*66:02	12222	7916	193AV-positive
A*02:01	12083	7973	193AV-positive
A*29:02	11901	6931	193AV-positive
A*74:01	11880	7275	193AV-positive
A*33:03	11456	5723	193AV-positive
A*32:01	11421	6854	193AV-positive
A*68:02	11315	5705	193AV-positive
A*26:01	10935	6162	193AV-positive
A*34:02	10736	6161	193AV-positive
A*43:01	10630	7094	193AV-positive
A*25:01	10302	5641	193AV-positive
C*16:01	13000	10297	193LV-positive
Self HLA	144±111	163±128	193AV-negative
72 Others alleles	373±342	303±269	193AV-negative

Case report: a transplant candidate with unexpected serum reactivity against the 162GLS eplet.

Bastien CAUQUIL, EFS Alsace, Laboratoire d'Immunogénétique, Strasbourg, France

Corresponding author Bastien CAUQUIL: bastien.c@hotmail.fr

Conflicts of interest notification:

The authors declare no conflict of interest.

Abstract: This case report describes serum antibody specificity against the 162GLS eplet which had not been yet shown to be antibody-verified. This antibody was produced by a 73-year-old European man with diabetic and vascular nephropathy conducting to his inscription on the renal graft waiting list. His sera had HLA class I antibody reactivity as determined in IgG binding assays with single allele. Ours analysis lets suspect reproducible serum reactivity with alleles carrying the 162GLS eplet and this supposition had been confirmed by sera testing with another reagent set (Immucor Tableau X). The cause of this 162GLS-specific immunization can't be argued. The patient presents those immunization profiles seems 2010 and his first transfusions reported were in 2014. An analysis of the single antigen tests results at the epitopic level allow to conclude on an eplet implication and in the interdiction of the HLA B*82:02 of the potential donor while this HLA allele is not present in the OneLambda ThermoFisher reagent sets used classically in our laboratory. This case is a great example for the interest of eplet analysis.

The International Registry of HLA Epitopes established in 2013 as a website (<http://www.epregistry.com.br>) has been recognized as an information resource about HLA epitopes reacting with antibodies associated with transplant rejection and platelet transfusion refractoriness (Duquesnoy, 2013; Duquesnoy, 2014). The registry has epitope repertoires on alleles encoded by HLA-ABC, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP and MICA. So-called eplets are considered essential components of HLA epitopes and they can be defined by molecular modeling and amino acid sequence comparisons within a 3 Ångstrom radius of polymorphic residues on the HLA molecular surface (Duquesnoy, 2006). The primary goal of the Registry is to identify epitopes that are verified experimentally with specific antibodies. Such epitopes correspond to individual eplets or to eplets paired with other amino acid configurations shared between reactive alleles (Duquesnoy, 2014). The repertoires of antibody verified epitopes must still be considered incomplete and HLA professionals have been invited to submit informative serum antibody reactivity patterns associated with newly antibody-verified eplets.

This case report demonstrates the serum antibody specificity against the 162GLS eplet which had not been yet shown to be antibody-verified. This antibody was produced by 73-year-old European man with diabetic and vascular nephropathy conducting to his inscription on the graft waiting list.

This man has one child and a granddaughter. He lost his wife in 2016 and had a double coronary bypass in 2014. During this operation he had been transfused. He also had two toe amputations due to diabetes in 2016.

Since July 2013, he has been on renal dialysis and he has also been placed as a candidate on the waiting list for kidney transplant.

His HLA type is A24, A26, B15, B35, Cw03, Cw04, DRB1*01, DRB1*13, DQB1*06, DQB1*05.

The HLAMatchmaker (Version 2.0) analysis revealed reproducible sera reactivity with alleles carrying the 162GLS eplet (Tableau IX).

In order to confirm this supposition, we test with the Immucor reagent kit the sera of the 22/07/16. We choose this serum because it presents an MFI of 1131 for the beads carrying the B*82:01. In the Immucor reagent set the HLA B*82:02 carrying the 162GLS eplet is tested. This HLA alleles B*82:02 is not tested in the OneLambda ThermoFischer single antigen Class I reagent sets.

A positivity for this allele with our sera is a good argument on the implication of the 162 GLS eplet in the positives results and the HLA B*82:02 must be avoided for the potential renal graft.

In conclusion, this case is an example of the eplet analysis interest in order to benefit patients graft outcomes.

Tableau IX: Patient single antigen tests MFI results (OneLambda, ThermoFisher). Serum reactivity with 162GLS-carrying alleles.

Date of sample collection	05/10/10	27/10/11	13/06/13	26/06/14	26/06/14	02/12/14	11/04/16	22/07/16	13/02/17	15/07/17	16/05/18
Positive Control	16389	16795	15672	14750	14896	12210	10196	12801	6739	8617	6170
Negative Control	45	56	45	39	25	19	69	48	54	75	24

Eplet	
B*44:02 (B44)	10783 10469 11469 12359 10590 8676 8884 8572 11989 12575 12491
B*44:03 (B44)	13568 12636 14489 16284 14372 13137 11742 12072 13943 15359 14435
B*45:01 (B45)	15426 15254 16489 16337 14854 12667 12300 13086 16651 17774 17681
	162GLS Positive
	162GLS Positive
	162GLS Positive

All the others beads 162GLS Negative MFI results have always been inferior to 1200 on all the samples tests.

Tableau X: 22/07/2016 Sera testing with the Immucor reagent sets confirming the implication of the 162GLS eplet in the positives results.

Class I Single Antigen Results

Batch ID: 110619-Isa1-3007543-vw

Patient Name: Patient DOB: Draw Date: 07/15/17 Donor Number: Expiration Date: 09/15/19
 Sample ID: 016938275 Lot ID: 3007543 3007525-SA1 Donor Center #: Accession #:
 Patient HLA Type: Report By:

Method Type: Standard Calculation

Positive CON MFI: 19079
 Negative CON MFI: 228

Analysis Mode:
 Manual

% PRA:
 4

Antigen ID	Raw Value	MFI/LRA	A	B	C	Cut-off	Assignment	Bw	B Serology	RAD	Epitopes
160	9810	132.56		B*44:02		4.45	Positive	Bw4	B44	1.0020	162GLS
161	9656	130.48		B*44:03		4.74	Positive	Bw4	B44	1.0400	162GLS
162	9058	122.41		B*45:01		4.42	Positive	Bw6	B45	0.9030	162GLS
181	6043	81.66		B*82:02		4.48	Positive	Bw6	B82	1.0760	162GLS
186	243	1.97			C*04:01	4.07	Negative			0.3030	
120	225	2.38	A*31:01			4.57	Negative			0.8860	
145	224	3.02		B*15:16		5.04	Negative	Bw4	B63	1.0410	
115	222	2.35	A*25:01			4.32	Negative	Bw4		1.0680	
111	222	2.34	A*11:02			4.76	Negative			0.9990	
191	220	1.79			C*07:02	3.66	Negative			0.5640	
131	217	2.30	A*69:01			4.85	Negative			0.7250	
183	217	1.76			C*02:02	3.57	Negative			0.5470	
195	213	1.73			C*14:02	3.66	Negative			0.8470	
182	205	1.66			C*01:02	3.61	Negative			0.7570	
198	203	1.65			C*17:01	3.87	Negative			0.5140	
188	199	1.62			C*05:01	3.73	Negative			0.5160	
197	199	1.62			C*16:01	3.72	Negative			0.6630	
139	195	2.63		B*14:02		5.29	Negative	Bw6	B65	0.9330	
134	194	2.62		B*07:02		4.90	Negative	Bw6	B7	1.0560	
189	189	1.54			C*06:02	3.28	Negative			0.7790	
194	187	1.52			C*12:02	3.64	Negative			0.8120	
199	187	1.52			C*18:01	3.81	Negative			0.5740	
150	184	2.49		B*27:08		4.13	Negative	Bw6	B27	1.2350	
163	184	2.49		B*46:01		5.73	Negative		B46	0.7210	
190	176	1.43			C*07:01	3.74	Negative			0.4990	
159	174	2.35		B*42:01		4.77	Negative	Bw6	B42	1.0030	
184	174	1.41			C*03:03	3.52	Negative			0.7050	
119	171	1.81	A*30:01			4.38	Negative			0.8700	
185	166	1.35			C*03:04	3.69	Negative			0.8260	
126	165	1.75	A*43:01			4.38	Negative			0.8920	
164	164	2.22		B*47:01		4.44	Negative	Bw4	B47	1.0680	
108	162	1.71	A*02:05			4.13	Negative			0.9450	
152	160	2.16		B*35:08		4.66	Negative	Bw6	B35	0.7660	
128	158	1.67	A*66:02			3.68	Negative			1.0190	
135	155	2.09		B*07:03		4.32	Negative	Bw6	B7	0.9280	
124	154	1.63	A*34:02			4.06	Negative			0.9110	
127	153	1.61	A*66:01			3.90	Negative			1.0420	
141	152	2.05		B*15:02		4.31	Negative	Bw6	B75	0.9940	
123	151	1.60	A*33:03			4.41	Negative			0.9080	
169	151	2.04		B*52:01		4.90	Negative	Bw4	B52	0.8790	
178	151	2.04		B*73:01		4.80	Negative		B73	0.9430	
129	150	1.59	A*68:01			3.96	Negative			0.9360	
192	150	1.22			C*08:01	3.24	Negative			0.7920	
179	149	2.01		B*78:01		4.62	Negative	Bw6	B78	0.9630	
137	148	2.00		B*13:02		4.73	Negative	Bw4	B13	0.8420	
157	147	1.98		B*40:02		4.23	Negative	Bw6	B61	1.1020	
125	145	1.53	A*36:01			4.27	Negative			0.9830	
122	144	1.52	A*33:01			4.17	Negative			0.8980	
171	143	1.93		B*54:01		4.33	Negative	Bw6	B54	1.0460	
168	142	1.92		B*51:01		4.72	Negative	Bw4	B51	0.9800	
146	140	1.89		B*15:18		4.07	Negative	Bw6	B71	1.0610	
196	138	1.12			C*15:02	3.54	Negative			0.7400	
151	137	1.85		B*35:01		4.50	Negative	Bw6	B35	0.9830	

Sample ID: 016938275

Patient Name:

Draw Date: 07/15/17

Report Date: 06/13/19

117	135	1.42	A*29:01			4.25	Negative			0.9100
175	134	1.80		B*58:01		4.53	Negative	Bw4	B58	0.9540
103	133	1.41	A*01:01			4.02	Negative			0.9990
138	133	1.80		B*14:01		4.28	Negative	Bw6	B64	0.9410
153	133	1.80		B*37:01		4.21	Negative	Bw4	B37	0.9930
104	133	1.40	A*02:01			4.01	Negative			0.8370
155	132	1.78		B*39:01		3.96	Negative	Bw6	B39	1.1080
170	132	1.78		B*53:01		4.38	Negative	Bw4	B53	0.9980
172	132	1.78		B*55:01		4.66	Negative	Bw6	B55	0.9280
113	130	1.38	A*24:02			4.10	Negative	Bw4		0.9760
107	130	1.37	A*02:03			3.92	Negative			0.9470
193	127	1.03			C*08:02	3.50	Negative			0.5510
154	126	1.70		B*38:01		3.92	Negative	Bw4	B38	1.0840
176	123	1.66		B*59:01		4.17	Negative	Bw4	B59	1.0080
187	123	1.00			C*04:03	3.48	Negative			0.6920
132	123	1.30	A*74:01			4.03	Negative			0.8560
116	122	1.29	A*26:01			3.93	Negative			0.9810
106	122	1.29	A*02:02			3.99	Negative			0.9540
110	121	1.28	A*11:01			3.59	Negative			1.0790
144	120	1.62		B*15:13		4.19	Negative	Bw4	B77	0.8940
173	120	1.61		B*56:01		4.18	Negative	Bw6	B56	1.0490
147	119	1.61		B*18:01		4.34	Negative	Bw6	B18	1.0580
180	117	1.58		B*81:01		4.39	Negative	Bw6	B81	0.9570
109	117	1.23	A*03:01			3.93	Negative			1.0750
167	116	1.57		B*50:01		4.17	Negative	Bw6	B50	1.0890
114	115	1.21	A*24:03			4.12	Negative	Bw4		1.0460
165	114	1.53		B*48:01		5.13	Negative	Bw6	B48	0.7940
149	112	1.51		B*27:05		4.18	Negative	Bw4	B27	1.1040
140	111	1.50		B*15:01		4.02	Negative	Bw6	B62	1.1010
142	111	1.50		B*15:03		4.03	Negative	Bw6	B72	1.0800
166	111	1.50		B*49:01		3.92	Negative	Bw4	B49	1.0800
121	110	1.16	A*32:01			3.90	Negative	Bw4		0.9690
118	108	1.14	A*29:02			4.06	Negative			0.9900
143	108	1.46		B*15:12		4.17	Negative	Bw6	B76	1.1090
158	107	1.45		B*41:01		4.53	Negative	Bw6	B41	1.0220
156	107	1.44		B*40:01		4.09	Negative	Bw6	B60	0.9850
130	104	1.10	A*68:02			3.81	Negative			0.9610
177	102	1.38		B*67:01		3.57	Negative	Bw6	B67	1.2010
112	98	1.04	A*23:01			3.84	Negative	Bw4		0.9850
136	95	1.28		B*08:01		4.06	Negative	Bw6	B8	1.0900
174	95	1.28		B*57:01		4.08	Negative	Bw4	B57	1.1460
133	95	1.00	A*80:01			3.95	Negative			0.9300
148	74	1.00		B*27:03		4.20	Negative	Bw4	B27	1.1380

Reviewer Comment:

Date: 06/11/19

Completed By:

Date: 06/13/19

Approved By:

Date:

Reviewed By:

Immucor, Inc.

MATCH IT! v1.31

Sample ID: 016938275

Patient Name:

Draw Date: 07/15/17

Report Date: 06/13/19

Page 2 of 2

VIII – Références

ABUL K., ANDREW H., Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, Traduction de la 4^{ème} édition Anglaise, Elsevier Masson SAS, Issy-les-Moulineaux, France, 2013, 278 p.

Agence de la Biomédecine - Compte rendu de la réunion Nationale des laboratoires HLA du Mardi 22 Novembre 2016.

Agence de la Biomédecine - Recommandations concernant le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes ou greffes Agence de la Biomédecine Novembre 2010.

CIONI M, ARCANGELO N, INNOCENTE A, TAGLIAMACCO A, TRIVELLI A, BASSO S, QUARTUCCIO G, De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Developing Early or Late after Transplant Are Associated with the Same Risk of Graft Damage and Loss in Nonsensitized Kidney Recipients. *Journal of Immunology Research.*, 2017 (online)

DAUSSET J., Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematologica.*, 1958, 20 (1–4), pp. 156–166.

DELBOS F, CESBRON A, Caractérisation de l'allo-immunisation anti-HLA et impact clinique en transfusion et en transplantation d'organe. *Transfusion Clinique et Biologique.*, 2017, 24 (3), pp. 131–137.

DOXIADIS I, ROELEN D, CLAAS F, Mature Wines Are Better: CDC as the Leading Method to Define Highly Sensitized Patients. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 2010, 15 (6), pp. 716–719.

DUQUESNOY R, HLAMATCHMAKER: a molecularly based donor selection algorithm for highly alloimmunized patients. In *Transplantation proceedings.* Elsevier., 2001, 33, pp. 493–497.

DUQUESNOY R, A Structurally Based Approach to Determine HLA Compatibility at the Humoral Immune Level. *Human Immunology.*, 2006, 67 (11), pp. 847–862.

DUQUESNOY R, Clinical Usefulness of HLAMatchmaker in HLA Epitope Matching for Organ Transplantation. *Current Opinion in Immunology.*, 2008, 20 (5), pp. 594–601

DUQUESNOY R, Antibody-Reactive Epitope Determination with HLAMatchmaker and Its Clinical Applications. *Tissue Antigens.*, 2011, 77 (6), pp. 525–534.

DUQUESNOY R, HLA Matching at the Epitope Level: The Way to Go, *Clinical Transplant.*, 2013, 53 (2), pp. 441-453.

DUQUESNOY R, Update of the HLA Class I Eplet Database in the Website Based Registry of Antibody-Defined HLA Epitopes. *Tissue Antigens.*, 2014, 83 (6), pp. 382–390.

DUQUESNOY R, ASKAR M, HLAMatchmaker: A Molecularly Based Algorithm for Histocompatibility Determination. V. Eplet Matching for HLA-DR, HLA-DQ, and HLA-DP. *Human Immunology.*, 2007, 68 (1), pp. 12–25.

DUQUESNOY R, CLAAS F, Is the Application of HLAMatchmaker Relevant in Kidney Transplantation? *Transplantation.*, 2005, 79 (2), pp. 250–251.

- DUQUESNOY R, HÖNGER G, HÖSLI I, MARRARI M, SCHAUB S, Detection of Newly Antibody-Defined Epitopes on HLA Class I Alleles Reacting with Antibodies Induced during Pregnancy. *International Journal of Immunogenetics.*, 2016, 43 (4), pp. 200–208.
- DUQUESNOY R, MARRARI M, Detection of Antibodies against HLA-C Epitopes in Patients with Rejected Kidney Transplants. *Transplant Immunology.*, 2011, 24 (3), pp. 164–171.
- DUQUESNOY R, MARRARI M, DA M SOUSA L, DE M BARROSO J, DE S U AITA K, DA SILVA A, DO MONTE S, 16th IHIW: A Website for Antibody-Defined HLA Epitope Registry. *International Journal of Immunogenetics.*, 2013, 40 (1), pp. 54–59.
- EL-AWAR N, TERASAKI P, NGUYEN A, LIAS M, CONGER N, 2010, New HLA Class I Epitopes Defined by Murine Monoclonal Antibodies. *Human Immunology.*, 2010, 71 (5), pp. 456–461.
- EVERETT E, KAO K, SCORNIK S, Class I HLA Molecules on Human Erythrocytes. Quantitation and Transfusion Effects. *Transplantation.*, 1987, 44 (1), pp. 123–129.
- EVERLY M, MATTHEW J, REBELLATO M, HAISCH C, OZAWA M, PARKER K, BRILEY K, CATROU P, Incidence and Impact of de Novo Donor-Specific Alloantibody in Primary Renal Allografts. *Transplantation.*, 2013, 95 (3), pp. 410–417.
- GUIDICELLI G, GUERVILLE F, LEPREUX S, WIEBE C, THAUNAT O, DUBOIS V, VISENTIN J, Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. *Journal of the American Society of Nephrology.*, 2016, 27 (2), pp. 615–625.
- HIRATA A, TERASAKI P, Cross-Reactions between Streptococcal M Proteins and Human Transplantation Antigens. *Science.*, 1970, 168 (3935), pp. 1095–1096.
- HLA EpRegistry website - <http://epregistry.com.br> - Juillet 2019.
- HYUN J, PARK K, YOO Y, LEE B, HAN Y, SONG Y, PARK M, Effects of Different Sensitization Events on HLA Alloimmunization in Solid Organ Transplantation Patients. *Transplantation Proceedings.*, 2012, 44 (1), pp. 222–225.
- KOKKO K, BRAY R, NICKERSON K, GEBEL H, Proinflammatory Events and HLA Antibodies: Nothing to Sneeze At. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.*, 2009, 9 (9), pp. 1971–1972.
- LIWSKI R, GREENSHIELDS A, CONRAD D, MURPHEY C, BRAY R, NEUMANN J, GEBEL H, Rapid Optimized Flow Cytometric Crossmatch (FCXM) Assays: The Halifax and Halifaster Protocols. *Human Immunology.*, 2018, 79 (1), pp. 28–38.
- LO Y, LO M, WATSON L, NOAKES I, SARGENT B, THILAGANATHAN B, WAINSCOAT J, Two-Way Cell Traffic between Mother and Fetus: Biologic and Clinical Implications. *Blood.*, 1996, 88 (11), pp. 4390–4395.
- MASSON E, VIDAL C, DESCHAMPS M, BONGAIN S, THEVENIN C, DUPONT I, RIETMULHER D, Incidence and Risk Factors of Anti-HLA Immunization after Pregnancy. *Human Immunology.*, 2013, 74 (8), pp. 946–951.

MATZINGER P., Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology.*, 1994, 12, pp. 991–1045.

MORALES-BUENROSTRO L, TERASAKI P, LLUVIA A, MARINO-VAZQUEZ L, JAR-HOW L, EL-AWAR N, ALBERU J, “Natural” Human Leukocyte Antigen Antibodies Found in Nonalloimmunized Healthy Males. *Transplantation.*, 2008, 86 (8), pp. 1111–1115.

OTTEN H, VERHAAR M, BORST H, VAN ECK M, VAN GINKEL W, HENE R, VAN ZUILEN A, The Significance of Pretransplant Donor-Specific Antibodies Reactive with Intact or Denatured Human Leucocyte Antigen in Kidney Transplantation. *Clinical and Experimental Immunology.*, 2013, 173 (3), pp. 536–543.

RIVERA R, SCORNIK J, HLA Antigens on Red Cells. Implications for Achieving Low HLA Antigen Content in Blood Transfusions. *Transfusion.*, 1986, 26 (4), pp. 375–381.

SCORNIK J, PFAFF W, HOWARD R, FENNEL R, RAMOS E, PETERSON J, NEIBERGER R, Increased Antibody Responsiveness to Blood Transfusions in Pediatric Patients. *Transplantation.*, 1994, 58 (12), pp. 1361–1365.

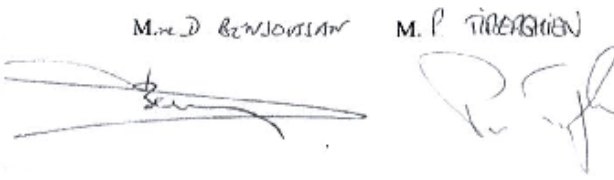


TAIT B, 2016, Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients – Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Frontiers in Immunology.*, 2016, 14 (2), pp. 247-254.

VISENTIN J, GUIDICELLI G, BACHELET T, JACQUELINET C, AUDRY B, NONG T, DUBOIS V, Denatured Class I Human Leukocyte Antigen Antibodies in Sensitized Kidney Recipients: Prevalence, Relevance, and Impact on Organ Allocation. *Transplantation.*, 2014, 98 (7), pp. 738–744.

VISENTIN J, GUIDICELLI G, COUZI L, MERVILLE P, LEE J, DI PRIMO C, TAUPIN JL, Deciphering IgM Interference in IgG Anti-HLA Antibody Detection with Flow Beads Assays. *Human Immunology.*, 2016, 77 (11), pp. 1048–1054.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 27/11/2019

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Bastien CAUQUIL</p> <p><u>Sujet</u> : Développement d'un outil d'aide à l'interprétation des résultats de Single Antigen HLA dans le cadre de la greffe d'organes.</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Mme, Danièle BENSOUSSAN, PU-PH Directeur : M. Pierre TIBERGHIEN, PU-PII Juges : M. Guillaume DAUTIN, Pharmacien M. Arnaud DUPUIS, Pharmacien</p>	<p align="right">Vu,</p> <p align="right">Nancy, le 03/10/19</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">M. D. BENSOUSSAN M. P. TIBERGHIEN</p> 
<p align="center">Vu et approuvé,</p> <p align="center">Nancy, le 12.11.2019</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> 	<p align="right">Vu,</p> <p align="right">Nancy, le 19 NOV. 2019</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Pierre MUTZENHARDT</p> <p>N° d'enregistrement : 11005 -</p>

N° d'identification :

TITRE

Développement d'un outil d'aide à l'interprétation des résultats de tests de Single Antigen HLA dans le cadre de la greffe d'organes.

Thèse soutenue le 27 Novembre 2019

Par Bastien CAUQUIL

RESUME :

The determination of the HLA compatibility at the structural level has proven its usefulness in donor/recipient matching and graft outcomes domains. The release of the HLAMatchmaker computer program has been one of the most substantial contributions in this field. HLAMatchmaker program allows one to obtain an exhaustive list of potential reactive eplets through a two-step approach: (i) emitting beads, referred to as *positive* beads, are identified using MFI (Mean Fluorescent Intensity) value thresholding and (ii) eplets which belong to all positive beads and do not belong to *negative* beads are reported as *reactive*. Such a technique has shown to perform well and extensive validations are reported in the literature but the results interpretations are time consuming because of their presentation even more when a lot of positivity are found in profiles. This paper consists in the presentation of a novel non negative least squares based method to facilitate the identification of the most probably HLA eplets involved in the positive results of single antigen class I tests. Such a model allows one to express the list of potential reactive eplets as a non negative least squares solution making use of all the MFI measurements simultaneously in a single step approach. A validation of the model has been conducted over three patients data. The obtained non negative least squares solutions delivers coherent reactive eplets with the one obtained using HLAMatchmaker (Version connected to the Fusion V4.2). The obtained results therefore suggest that our analysis method may complement the HLAMatchmaker program in order to make eplets analysis easier in a less time consuming and more pertinent/efficient way.

MOTS CLES : HLAMatchmaker, Eplet, Linear Least Squares

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr Pierre Tiberghien et Pr Danièle Bensoussan	UMR 1098 Inserm EFS Université de Franche-Comté, Besançon et UMR 7365 CNRS Université de Lorraine, Nancy	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle