

Discordance LSM Et SA A Propos D'une Série De Cas

S. Bakkali^{1*}, O. Atouf¹, I. Yakhlef, K. Morabit, K Ait Ifiss, M. Essakalli¹

UPR d'Immunologie, Faculté De Médecine Et De Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat. Maroc

Résumé :

L'étude des anticorps anti-HLA est d'une importance ultime dans le bilan pré-greffe rénale. La technologie Luminex a dépassé de loin les anciennes techniques pour la recherche et l'identification des anticorps anti-HLA cependant, elle n'est pas dénuée de limites vu qu'elle est soumise à de nombreux artefacts qui rendent difficile l'interprétation des résultats.

Ce travail s'est intéressé à comparer les résultats du dépistage et de l'identification des Ac anti-HLA pratiqués par la technique Luminex.

En effet, cette analyse constitue l'un des piliers du bilan immunologique pré-greffe rénale, vu son impact sur la sélection d'un donneur potentiel et donc sur la greffe du patient.

Mots clés : LSM, SA, interférences

Date of Submission: 16-10-2024

Date of Acceptance: 26-10-2024

I. Introduction:

La transplantation rénale est considérée comme la meilleure option thérapeutique pour pallier l'insuffisance rénale terminale. Elle peut impliquer la greffe d'un rein provenant d'un donneur vivant ou décédé, et pour cela, chaque candidat doit bénéficier une évaluation clinique, biologique et immunologique avant la greffe. Le bilan immunologique est indispensable pour l'accès à cette thérapeutique. Le dépistage et l'identification des Ac anti-HLA permettent en plus le suivi de l'évolution post-greffe.

En effet, l'analyse des Ac anti-HLA est cruciale dans le cadre de l'évaluation immunologique pré-greffe pour assurer l'éligibilité à la greffe et la sécurité du don, et optimiser les chances de succès de la transplantation rénale en réduisant le risque de rejet et en préservant la qualité du greffon. Il est important de souligner que la recherche de ces Ac est indispensable et fait partie des critères d'inscription sur la liste d'attente de greffe à partir d'un donneur cadavérique.

Par ailleurs, cette analyse est également essentielle dans le suivi post-greffe. Ces anticorps peuvent apparaître après une immunisation par une grossesse, un avortement, une transfusion ou transplantation.

Le luminex est une technique qui existe depuis de nombreuses années et qui a révolutionné la prise en charge immunologique des candidats à la greffe. Elle est utilisée pour l'étude des anticorps anti-HLA y compris leur dépistage et leur identification. Son principal intérêt est la détection chez le receveur d'anticorps qui seraient dirigés contre un antigène du donneur appelés DSA (*Donor Specific Antibody*) [1].

En effet, la survie du greffon est conditionnée par la présence de DSA : dans l'étude de Aubert et al. , 8 ans après le diagnostic de l'ABMR (*Antibody-mediated rejection*), la survie des greffons était de 63% pour les ABMR avec DSA préformés alors qu'elle n'était que de 34% en cas d'ABMR avec DSA de novo[2].

Cette technologie implique un ensemble de système analytique multiplex. Elle est basée sur le principe de la cytométrie en flux couplée à la détection de fluorescence en impliquant 2 lasers [3,4], et utilisant des microbilles de polystyrène contenant un mélange de deux fluorochromes. [5]

Pour la recherche des anticorps (LSM), plusieurs molécules HLA différentes sont fixées à la surface des billes tandis que, pour l'identification (SA), une seule spécificité antigénique est présente à la surface de la bille.

Pour le test du dépistage, les microbilles sont recouvertes d'antigènes HLA purifiés de Classe I ou de Classe II. Le test Mixte détecte la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA de Classe I et/ou de Classe II. Le test Single Antigen permet de confirmer la spécificité car les réactions sur les billes utilisées concernent un seul antigène. Un Sérum Contrôle Négatif est utilisé pour déterminer la valeur du bruit de fond de chaque bille dans la série testée.

Dans ce travail, nous avons comparé les résultats du dépistage et de l'identification des Ac anti-HLA pratiqués par la technique Luminex dans les sérums des patients candidats à une greffe rénale

II. Patients Et Méthodes :

Patients :

Notre travail se présente comme une étude rétrospective, il a été mené au sein du service d'Immunologie à l'Hôpital d'enfant de Rabat.

Cette étude s'étale sur une période d'un an et demi allant de janvier 2022 à juin 2023, portant sur des sérums de candidats à une greffe rénale dans le cadre du bilan et suivi immunologique.

Méthodes :

En suivant la stratégie adoptée, un dépistage est systématiquement pratiqué sur tous les sérums. Alors que l'identification est réalisée en cas de résultat positif au dépistage ou chez les patients ayant des antécédents d'événements immunisants même en cas de dépistage négatif.

Ces tests ont été effectués en utilisant la technologie Luminex avec le réactif Labscreen mixte (LSM) et Singl Antigen (SA) de One Lambda*.

Le principe de la méthode consiste en l'incubation des billes avec le sérum du patient, la présence de complexes immuns Ag-Ac est révélée par ajout d'un Ac anti-immunoglobuline humaine couplé à un fluorochrome la phycoérythrine, ensuite la fluorescence est mesurée [6]. L'analyse des données obtenues à la fin de l'acquisition sur Luminex est effectuée par le logiciel Fusion1 version 4.2.

Les résultats des tests LSM sont exprimés en ratios, tandis que ceux du test SA par l'intensité moyenne de fluorescence (MFI : Mean Fluorescence Intensity).

Les seuils de positivité établis par notre laboratoire sont : un ratio à 3 pour LSM et une MFI de 1000 pour SA.

Les résultats sont comparés par le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

III. Résultats:

Durant la période d'étude, nous avons effectué un dépistage des anticorps anti-HLA sur 522 échantillons. Parmi les 522 sérums, il a été constaté que 492 étaient négatifs et 30 étaient positifs.

L'identification s'est portée sur 30 sérums positifs ainsi que sur 318 sérums négatifs (tableau 1). Nos résultats montrent une positivité de 27 sur 30 sérums dont le dépistage était positif. Parmi les sérums ayant un résultat négatif en dépistage, 30 se sont révélés positif en identification. Nous nous sommes intéressés à analyser les résultats qui ont donné des discordances entre LSM et SA. Il en ressort 33 sérums (9.5%) dont 3 sont LSM+/SA- et 30 sont LSM-/SA+.

Tableau 1 : Résultats du dépistage et de l'identification des anticorps anti-HLA

	LSM positif N=30	LSM négatif N=318
SA POSITIF	27 (90%)	30 (9.43%)
SA NEGATIF	3 (10%)	288(90.56%)

L'étude de cet échantillon montre que 50% sont des femmes et 50% sont des hommes, avec une moyenne d'âge de 33 ans. En ce qui concerne les événements immunisants, la transfusion était le principal facteur chez 14 patients, tandis que 4 avaient bénéficié d'une greffe, et 2 avaient eu à la fois une transplantation rénale antérieure et une transfusion. Quatre patientes avaient la grossesse comme un événement immunisant, dont l'une été greffée. Pour les patients qui ont un résultat négatif pour LSM et positif pour SA, le ratio le plus élevé pour la classe I était de 2,35 et celui de la classe II était de 2,88. La moyenne des MFI étaient respectivement de 2500 de MFI pour la classe I et de 2352 pour la classe II. En ce qui concerne les trois patients ayant LSM positif mais SA négatif, le ratio le plus élevé pour la classe I était de 6,42 et celui de la classe II était de 3,53. Les moyennes de MFI étaient respectivement de 834 pour la classe I et de 870 pour la classe II.

IV. Discussion:

Le luminex présente de nombreux avantages, il est plus sensible pour la détection des anticorps anti-HLA par rapport aux autres techniques utilisées comme la lymphocytotoxicité complément dépendante (LCT), la technique Elisa ou la cytométrie en flux. En effet, il permet une meilleure analyse des sérums des patients fortement immunisés et aussi d'identifier plus précisément des spécificités d'anticorps [7,8]. Cependant, bien qu'elle soit la plus sensible des techniques décrites dans la littérature pour la détection des Ac anti-HLA [9], l'interprétation des résultats dépend de plusieurs paramètres notamment des antécédents d'immunisation et elle doit tenir compte des antécédents des autres sérums.

Le dépistage des Anticorps anti-HLA par LSM consiste à utiliser un mélange de plusieurs billes couplées avec des antigènes purifiés tandis que l'identification utilise des billes portant chacune un allèle de spécificité antigénique déterminée. Le LSM présente l'avantage d'être plus facile à réaliser et d'être moins coûteux par rapport au SA. [10]

Dans notre étude, parmi les hypothèses qui pourraient expliquer la discordance retrouvée chez le premier groupe LSM – SA + est que le SA détecte des anticorps reconnaissant des molécules HLA dénaturées, sans signification clinique apparente. [11] Ces anticorps seraient dirigés contre des antigènes d'origine exogène comme des bactéries, virus, des protéines d'origine alimentaire voire même des allergènes présentant des motifs peptidiques communs avec les molécules HLA [12,13]. En effet, des molécules HLA dites dénaturées se caractérisent par une conformation anormale et seraient présentes en quantité significative à la surface des billes SA. L'origine de cette dénaturation serait due aux procédés de purification et de fixation des antigènes à la surface des billes.

L'absence de standardisation et de consensus entre les différents laboratoires d'histocompatibilité rend l'interprétation des résultats difficile [14].

En effet, chaque laboratoire adopte un seuil particulier peut être faut-il revoir les notes.

Pour ce qui est du SA, en situation pré-greffe, l'agence de Biomédecine a établi un seuil de MFI inférieure à 500 obtenue avec la technique One Lambda pour définir les antigènes permis c'est-à-dire antigènes considérés comme non délétères pour les patients candidats à une greffe rénale. Par ailleurs, une valeur de MFI supérieur à 1000 est souvent considérée par la majorité des laboratoires, comme positive et permet de définir les antigènes interdits c'est-à-dire antigènes à risque immunologique pour le patient DSA [15,16]

Un autre paramètre est la densité antigénique à la surface de la bille notamment du SA qui ne correspond pas forcément à celle à la surface des cellules ce qui impacte l'affinité et l'avidité des anticorps, chose qui peut donner des résultats positifs à l'identification. [17]

Concernant la deuxième catégorie de notre étude LSM+/SA-. Il a été démontré que l'interférence serait liée à l'accumulation des produits d'activation des facteurs du complément C4 et C3 à la surface des billes, cachant ainsi le fragment Fc de l'Ac anti-HLA du patient au conjugué.

V. Conclusion:

La recherche des anticorps anti-HLA comprend le dépistage et l'identification des ac anti-HLA. L'analyse des discordances entre les 2 permettra d'aider à l'interprétation des résultats et leur validation. En effet, cette analyse est cruciale pour la sélection du donneur et la greffe du patient puisque le résultat peut modifier la prise en charge des patients immunisés, leur aptitude à recevoir un greffon et leur suivi post-greffe.

Références

- [1] Ann Biol Clin 2014 ; 72 (2) : 178-84 Pièges De L'interprétation Des Anticorps Anti-Hla Par Technologie Luminextm In Interpreting Anti-Hla Antibodies By Luminextm technology (Mail)
- [2] Aubert O, Loupy A, Hidalgo L, Duong Van Huyen J-P, Higgins S, Viglietti D, Et Al. Antibody-mediated Rejection Due To Preexisting Versus De Novo Donor-Specific Antibodies In Kidney Allograft Recipients. J Am Soc Nephrol. 2017 Jun;28(6):1912–23.
- [3] Cytotoxicité Des Anticorps Anti-Hla Naturels Chez Des Patients Marocains Candidats A` La Greffe Re`nale Cytotoxicity Of Natural Anti-Hla Antibodies In Moroccan Patients Awaiting For Kidney Transplantation Nadia Benseffaj A, *, B, Sanae Ouadghiri A, Asmaa Drissi Bourhanbour A, Asmae Noor Zerrouki B, Malika Essakallia, B
- [4] Enhancing Precision Of The Single-Antigen Bead (Sab) Assay: Considerations And Challenges Vikash Chandra Mishra* And Vimarsh Raina Author Information Journal Of Clinical And Translational Pathology 2024;4(1):12-17 [4] 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 P28
- [5] 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 P28
- [6] Procartaplex Multiplex Immunoassay par Juliette Mairesse, 2024
- [7] Tait Bd, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid Phase Hla Antibody Detection Technology—Challenges In Interpretation. Tissue Antigens 2010 ; 76 : 87-95.
- [8] Donor Specific Hla Antibodies For Organ Transplantation Hidenori Tanaka 2016 Volume 51 Issue 6 Pages 429-437
- [9] Ann Biol Clin 2014 ; 72 (6) : 739-42 Détection Des Anticorps Anti-Hla Par Luminex Et Décision De Transplantation Rénale : À Propos D'un Cas Detection Of Hla Antibodies By Luminex And Kidney Transplantation Decision Making: A Case Report Ouafa Atoufl Chehrzade Brickl Malika Essakalli 1,2 1 Unité D'histocompatibilité, Service De Transfusion Sanguine Et D'hémovigilance, Centre Hospitalier Ibn Sina, Rabat, Maroc 2 Upr D'immunologie, Faculté De Médecine Et De Pharmacie De Rabat, Université Mohamed V, Maroc
- [10] Luminex Screening First Vs. Direct Single Antigen Bead Assays: Different Strategies For Hla Antibody Monitoring After Kidney Transplantation Carla Burballaa , María José Pérez-Saéza , Dolores Redondo-Pachóna , Carme Garcíab , Marisa Mira , Carlos Arias-Cabralesa , Nicole M. Valenzuelac , Elaine F. Reedc , Julio Pascuala,* , Marta Crespoa,*
- [11] Limites Des Méthodes De Recherche Des Anticorps Anti-Hla Par Technique Luminex® “Single Antigen” Limits Of The Methods Detecting Anti-Hla Antibodies with Single Antigen Luminex® Technology
- [12] “Natural” Human Leukocyte Antigen Antibodies Found In Nonalloimmunized Healthy Males Luis E. Morales-Buenrostro, 1,2 Paul I. Terasaki, 2,5 Lluvia A. Marino-Vázquez, 1 Jar-How Lee, 3 Nadim El-Awar, 3 And Josefina Alberu 4
- [13] Cytotoxicité Des Anticorps Anti-Hla Naturels Chez Des Patients Marocains candidats A` La Greffe Re`nale Cytotoxicity Of Natural Anti-Hla Antibodies In Moroccan Patients Awaiting For Kidney Transplantation Nadia Benseffaj A, *, B, Sanae Ouadghiria, Asmaa Drissi Bourhanboura, Asmae Noor Zerrouki B, Malika Essakallia, B

- [14] Limites Des Méthodes De Recherche Des Anticorps Anti-Hla Par Technique Luminex® "Single Antigen" Limits Of The Methods Detecting Anti-Hla Antibodies With Single Antigen Luminex® Technology Isabelle Jollet¹, Alice Aarink², Jonathan Visentin^{3,4}
- [15] Inter And Intra Laboratory Concordance Of Hla Antibody Results Obtained By Single Antigen Bead-Based Assay Manish J. Gandhi A, [†], Steven DeGoey A, Deborah Falbo A, Sarah Jenkins F, James R. Stubbs A, Harriet Noreen B, David F. Lorentzen C, Jarhow Lee D, Mark Stegall
- [16] Élodie Wojciechowski. Étude De L'évolution Du Profil D'immunisation Des Patients Hyper Immunisés Enattente De Transplantation Rénale. Sciences Du Vivant [Q-Bio]. 2020. Ffdumas-02973829
- [17] Donor-Specific Antibody Levels And Three Generations Of Crossmatches To Predict Antibody-Mediated Rejection In Kidney Transplantation Sebastian Riethmüller ¹, Sylvie Ferrari-Lacraz, Markus K Müller, Dimitri A Raptis, Karine Hadaya, Barbara Rüsi, Guido Laube, Gregory Schneider, Thomas Fehr, Jean Villard affiliationsexpand