

# Session 1-Abstract 1- Pascal Pedini : Confirmation du score multiparamétrique utilisant le cfDNA pour le diagnostic des événements après transplantation pulmonaire

---

Alizée Sebastian<sup>1</sup>, Christophe Picard<sup>1,2</sup>, Benjamin Coiffard<sup>3</sup>, Pauline Mioche<sup>3</sup>, Agnes Basire<sup>2</sup>, Jacques Chiaroni<sup>1,2</sup>, Martine Reynaud Gaubert<sup>3</sup>, **Pascal Pedini**<sup>1,2</sup>

1. Aix Marseille Univ, CNRS, EFS, ADES, Marseille
2. Laboratoire Biologie spécialisée greffe et médecine transfusionnelle, EFS, Marseille
3. Département de transplantation pulmonaire, APHM, Marseille

Certaines études montrent l'intérêt de l'ADNcf du donneur (dd-cfDNA) pour le diagnostic du rejet après transplantation rénale et cardiaque. Concernant la transplantation pulmonaire (TP), notre équipe a montré que le dd-cfDNA seul n'est pas spécifique pour discriminer le rejet aigu (RA) d'autres événements lésionnels précoces tels que l'infection (INF) à 30 jours (J30) après la TP. Nous avons démontré l'importance d'une étude multiparamétrique de l'ADNcf par un algorithme qui inclut, d'une part, le dd-cfDNA pour différencier les patients stables des patients non-stables, et d'autre part, l'étude de la taille des fragments de l'ADNcf pour discriminer le type de lésion (INF, RA). Les objectifs de cette nouvelle étude sont double ; confirmer ces résultats et ajuster les seuils publiés en utilisant une cohorte de réplication ; et d'évaluer l'intérêt du dd-cfDNA pour les événements plus tardifs. Il s'agit d'une étude prospective de 92 patients. Le dd-cfDNA est déterminé à J15, J30, J90, J180 et J365 par NGS (AlloSeqcfDNA, CareDx) et le profil de taille est évalué par BIABooster (Adelis). Une biopsie J30 groupe les patients : stables et non-stables (RA, INF et RA+INF).

Les résultats de cette nouvelle analyse sont cohérents avec les précédents avec des notions supplémentaires sur le lien avec les événements tardifs. Le dd-cfDNA est plus élevé chez les patients non-stables à J30 ( $p=0,001$ ). Le précédent seuil est ajusté à 2,20%, avec une VPN=85,0% pour identifier les patients stables. Parmi le groupe "non-stable", l'étude des petits fragments de cfDNA (80-120bp) permet l'identification des patients atteints d'INF. Le seuil initial est ajusté à 3,4% (VPP=88,9 %).

En conclusion, cette étude confirme que l'étude multiparamétrique de l'ADNcf permet de différencier le type de lésion du greffon. Les seuils précédemment établis ont été ajustés pour augmenter la fiabilité du test. Nous projetons d'ajouter l'étude épigénétique de l'ADNcf à cescore multiparamétrique.

## **Session 1-Abstract 2-Thomas Beaudrey: Cinétique des anticorps anti-MICA après injection d'implifidase pour une transplantation rénale à haut risque immunologique**

**Thomas Beaudrey**<sup>1,2,3,4</sup>, Marie-Joëlle Apithy<sup>5</sup>, Jérôme Olgne<sup>1,2,3,4</sup>, Lisa Lemonnier<sup>1,2,3,4</sup>, Peggy Perrin<sup>1,2,3,4</sup>, Gabriela Gautier Vargas<sup>1,2,3,4</sup>, Seiamak Bahram<sup>2,3,4,6</sup>, Raphaël Carapito<sup>2,3,4,6</sup>, Sophie Caillard<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Laboratoire d'ImmunoRhumatologie Moléculaire, INSERM UMR\_S1109, Fédération Hospitalo-Universitaire OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, France.

<sup>3</sup> Laboratoire d'Excellence (LabEx) TRANSPLANTEX, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>4</sup> Institut Thématique Interdisciplinaire (ITI) de Médecine de Précision de Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>5</sup> Laboratoire d'Histocompatibilité, Etablissement Français du Sang Grand-Est Strasbourg, France.

<sup>6</sup> Laboratoire d'Immunologie, Pôle de Biologie, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France.

**Introduction :** L'implifidase est une endopeptidase permettant le clivage des IgG. Elle cible notamment les anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon (DSA) et aboutit à la négativation du crossmatch, permettant la réalisation de transplantations rénales à haut risque immunologique. Cependant, il n'existe que peu de données concernant son effet sur les allo-anticorps ciblant d'autres antigènes d'histocompatibilité, tels que la protéine MHC class I chain-related A (MICA).

**Patient et méthodes :** Nous décrivons le cas d'un patient ayant bénéficié d'une seconde transplantation rénale à haut risque immunologique. Une injection pré-greffe d'implifidase a été réalisée suite à l'identification d'un DSA anti-HLA-A\*02:01. En raison d'un DSA anti-MICA\*002 dirigé contre le premier greffon rénal et d'un profil d'immunisation diffuse à l'encontre de MICA, nous avons réalisé un génotypage de *MICA* du nouveau donneur par séquençage Sanger ainsi qu'un dosage des anticorps anti-MICA à l'aide du kit Immucor LifeCodes LSA MIC sur différents sérums, pré-implifidase, post-implifidase, à J14 et à J45.

**Résultats :** Le greffon présentait deux mismatches MICA avec le receveur, dont l'un était la cible d'un DSA anti-MICA\*002 préformé avec une intensité de fluorescence moyenne (MFI) de 2178. De manière similaire à son impact sur les anticorps anti-HLA, l'implifidase a induit une réduction notable des anticorps anti-MICA, suivie d'un rebond du DSA anti-MICA\*002 après 14 jours, contemporain du rebond des anticorps anti-HLA. Suite à un rejet humoral actif précoce, l'utilisation conjointe de séances d'immunoabsorption et de perfusions de daratumumab s'est avérée efficace pour éliminer tous les anticorps anti-MICA au jour 60 après la transplantation.

**Discussion :** A travers ce cas clinique, nous décrivons la dynamique des anticorps anti-MICA et d'un DSA anti-MICA\*002 après l'administration d'implifidase et le traitement d'un rejet humoral. Cela souligne l'importance potentielle de ces traitements dans la gestion des allo-anticorps préformés et dirigés contre des cibles non-HLA en transplantation rénale.

**Session 1-Abstract 3-Florence Larnaud- Retour d'expérience de la recherche du phénomène HLA-loss :  
quels sont les axes d'améliorations en pratique quotidienne pour les laboratoires?**

Auteurs : Pierre Fournier 1 , Florence Larnaud 1 , Céline Dard 1 , Martin Carré 2 et Béatrice Bardy 1 . 1 Laboratoire d'histocompatibilité- Centre Donneurs de Moelle Osseuse., Établissement Français du sang (EFS). 29, avenue du maquis du Grésivaudan. BP 35-38701 LA TRONCHE 2Service d'hématologie clinique, CHU Grenoble Alpes, CS10217, 38043 Grenoble cedex 9.

**Introduction** Le phénomène HLA-loss est un mécanisme pouvant être une cause de rechute chez les patients allogreffés de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH), et sa recherche devrait donc être systématique. Elle est actuellement sous-effectuée, de par une connaissance encore limitée du phénomène, mais aussi en raison de différentes contraintes pratiques associées. Nous aborderons les points limitants au déploiement de cette analyse à travers l'étude de deux cohortes de patients. **Matériels et méthodes** Recherche par technique qPCR de chimérisme (kit QTRACE, et logiciel T-analysis) et de HLA-loss (HLA-TRACE, Jeta Molecular). Les deux cohortes étudiées correspondent à des patients d'hématologie rhônalpins (entre 2014 et 2021) et grenoblois (février à juillet 2024). **Résultats** Pour la 1<sup>e</sup> cohorte, 19 rechutes ont été identifiées. La recherche de HLA-loss n'a pas pu être effectuée pour 5 patients pour cause de chimérisme trop faible et/ou d'absence de marqueurs HLA discriminants. Seule 1 recherche s'est avérée positive pour les 14 patients restants. Pour la seconde cohorte (9 rechutes), 1 unique phénomène HLA-loss a été découvert, mais 8 recherches n'ont pu être effectuées pour cause d'absence de marqueurs discriminants commercialement disponibles (n=2), d'absence de mismatch (greffe 12/12) (n=3), de chimérisme sur sang total inférieur à 2% (n=1), ou simplement d'absence de prescription ou l'analyse non déployée (n=2). **Conclusion** Les axes d'améliorations pourraient être : -face au manque de marqueurs disponibles en qPCR : proposition de nouveaux marqueurs discriminatifs par les fournisseurs, ainsi que commercialisation de nouveaux kits en lien avec les nouvelles technologies disponibles (qPCR, NGS, Digital Droplet PCR). -dans les cas de chimérisme trop faible: un tri cellulaire pourrait être effectué systématiquement, et des prélèvements sur moelle osseuse pourraient être préférés. -pour la détection des patients à risque : instauration d'une réflexion commune avec les hématologues sur un dépistage systématique, qui pourrait figurer sur un contrat clinico-biologique

**Session 1-Abstract 4-Nicolas Congy :Du Luminex 200 au Flexmap 3D pour la recherche et l'identification des anticorps anti-HLA : Comparaison qualitative et quantitative.**

Jean Milhès<sup>1</sup>, Bouthemy Charlene<sup>1</sup>, Blavy Sarah, Duclerc Lucile, Congy-Jolivet Nicolas<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Immunology laboratory department, IFB Purpan, Toulouse University Hospital Center, Toulouse, France

<sup>4</sup> UMR 1037 INSERM Team 20 / Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse Cancerology Research center (CRCT), Toulouse, France

La nouvelle gamme d'automates Luminex® FlexMap 3D (FM3D) remplace progressivement la génération précédente (Luminex 200, LM200) dans les laboratoires HLA pour la recherche et l'identification des anticorps anti-HLA. Ces nouveaux automates sont plus rapides mais également plus sensibles, conférant des valeurs de fluorescence (MFI) potentiellement différentes selon les kits de réactifs utilisés. La comparaison de ces automates est un prérequis à leur utilisation en routine.

Les tests de dépistage et d'identification sur panels ou Ag isolées du fournisseur One Lambda Thermofisher® (LABScreen Mix, PRA class I/II, LABScreen Single Antigen class I/II) et les tests d'identification sur Ag isolés ID Lifecodes Class I/II d'Immucor® ont été évalués lors du changement d'automate. Après lecture sur les deux automates, l'assignation automatique des logiciels d'interprétation, et le résultat après validation biologique ont été comparés. Les variations de MFI ont été comparées sur les identifications réalisées avec les kits d'identification sur panels et sur Ag isolés.

La concordance des assignations automatiques par le logiciel (Fusion® ou MatchIt®) est supérieure à 90% (dépistage classe I), 95% (dépistage classe II, PRA) voire 99% (Single Antigen One Lambda et Immucor). Après validation biologique, la concordance est de 100%.

L'utilisation d'un diviseur informatique (quotient 1,67) garantit les mêmes valeurs de fluorescence sur les deux automates pour tous les kits One Lambda®. Les droites de régression tracées pour les techniques d'identification ont des pentes proches de 1. Pour les kits Immucor® les MFI des tests Single Antigen sont plus élevées sur le FM3D. Le calcul des coefficients de variation pour chaque bille indique toutefois que cette augmentation est régulière, et la régression linéaire des droites indique qu'elle est proportionnelle, avec une pente proche de 1,60 pour les deux classes.

Le passage du LM200 au FM3D donne des résultats identiques pour toute la gamme One Lambda® à condition d'appliquer le diviseur préconisé. Les valeurs de MFI obtenues avec les kits Single Antigen Immucor® sont plus élevées sur le FM3D, sans entraîner de modification majeure des intervalles de rendu des résultats par rapport au LM200. Le changement d'automate n'a donc aucune conséquence sur les résultats rendus aux cliniciens.

## Session 2-Abstract 1- Jean-Luc Taupin : Validation d'un éplet DQ incluant les deux chaînes alpha/béta.

**Magali Devriese**<sup>1,2</sup>, Diego Amaya-Ramirez<sup>3</sup>, Tina Meng<sup>4</sup>, Hiroko Miyadera<sup>5</sup>, Lisa Giraldo<sup>2</sup>, Laurie Toullec<sup>1</sup>, Cedric Usureau<sup>1,2</sup>, Olivier Toutirais<sup>6</sup>, Dave Lowe<sup>4</sup> and Jean Luc Taupin<sup>1,2</sup>.

### Affiliations :

1. Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, Paris, France
2. INSERM UMR976, Institut de Recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France
3. Université de Lorraine, CNRS, Inria, LORIA, F-54000 Nancy, France
4. Department of Research and Development, One Lambda, Inc. (a Part of Thermo Fisher Scientific Inc.), West Hills, California, USA
5. Department of Medical Genetics, Institute of Medicine, University of Tsukuba, Japan
6. Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, CHU de Caen, Caen, France

### Correspondance:

Magali Devriese

Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, Paris, France

Tel: +33 6 10 40 37 96

Email: [magali.devriese@aphp.fr](mailto:magali.devriese@aphp.fr)

## **ABSTRACT**

### **Introduction**

La cible réelle d'un anticorps anti-HLA est un épitope à la surface de l'antigène, et plus particulièrement l'éplet polymorphe en son cœur, qui lui confère sa spécificité. HLA Eplet Registry référence environ 550 eplets HLA déduits d'alignements de séquences des acides aminés à la surface des protéines HLA. Cependant, cette liste n'est pas exhaustive puisque par définition les éplets non linéaires ne sont pas répertoriés, notamment ceux dépendant des deux chaînes polymorphiques DQ $\alpha$  et DQ $\beta$ . Dans cette étude, nous explorons un de ces éplets chevauchants les chaînes DQA1\*03 et DQB1\*03.

### **Matériels et Méthodes**

Les sérums de patients ont été testés en Single antigen Luminex utilisant les kits LABScreen, Lifecodes et un nouveau kit de billes DQ. Les sérums ont également été adsorbés et élués à l'aide de cellules humaines mononuclées spléniques et de clones cellulaires murins transfectés avec HLA-DQ. Enfin, leur localisation par modélisation 3D a été analysé.

### **Résultats**

Nous avons identifié 7 patients dans notre base de données présentant des positivité sur 5 billes DQ spécifiques des combinaisons DQA1\*03/DQB1\*03, confirmé avec le kit complémentaire DQ. Un seul sérum sur les 7 étaient positifs avec le Lifecodes. Nous avons nommé cet éplet  $\alpha 76V\beta 55PP$ , qui correspond à l'association des eplets vérifiés  $\alpha 76V$  et  $\beta 55PP$  ciblant respectivement les allèles DQA1\*03 et DQB1\*03. Notamment, seuls 5 de ces patients avaient été transplantés et parmi eux, seul 1 présentait un DSA. Les 7 sérums de patients ont été adsorbés sur cellules et l'analyse 3D montre que l'éplet serait bien situé à cheval sur les chaînes DQA1\*03/DQB1\*03.

### **Conclusion**

Des cas cliniques ont été publiés décrivant des anticorps ciblant des combinaisons DQ $\alpha/\beta$  spécifiques. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a étudié expérimentalement ces éplets, notamment en combinant les données Single antigen, l'adsorption/élution cellulaire et la prédiction in silico de l'exposition de la surface de l'éplet.

**Session 2-Abstract 2-Severine Panel:Etude de la réponse humorale (DSA) de patients atteints de cancer traités par un vaccin cellulaire basé sur une lignée cellulaire dendritique allogénique, en combinaison ou non avec un anti-PD1**

**S. Planel**<sup>1</sup>, G. Vayssière<sup>1</sup>, C. Vichier<sup>2</sup>, C. Puget<sup>2</sup>, M. Gérard<sup>2</sup>, B. Devos<sup>1</sup>, F. Cantero<sup>1</sup>, A. Sibille<sup>3</sup>, I. Demedts<sup>4</sup>, E. Pons-Tostivint<sup>5</sup>, C. Van de Kerckhove<sup>6</sup>, S. Derijcke<sup>7</sup>, W. Theelen<sup>8</sup>, B. Biesma<sup>9</sup>, F. Borm<sup>10</sup>, E. Wauters<sup>11</sup>, B. Colinet<sup>12</sup>, D. Moro-Sibilot<sup>13</sup>, M. Perol<sup>14</sup>, E. Buchmeier<sup>15</sup>, M. Skrzypski<sup>16</sup>, K. Cuppens<sup>17</sup>, J. Vansteenkiste<sup>18</sup>, C. Debruyne<sup>1</sup>, B. Bardy<sup>2</sup>, G. Maggipinto<sup>19</sup>, J. Plumas<sup>1</sup>

**Affiliations:**<sup>1</sup>PDC\*line Pharma, Grenoble, France ; <sup>2</sup>Laboratoire d'histocompatibilité, EFS, Grenoble, France ; <sup>3</sup>Département de Pneumologie, Hôpital Universitaire de Liège, Liège, Belgique ; <sup>4</sup>Département des Maladies Pulmonaires, AZ Delta, Roulers, Belgique ; <sup>5</sup>Oncologie Médicale, Université de Nantes, Nantes, France ; <sup>6</sup>Département de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Vitz Sint-Niklaas, Sint-Niklaas, Belgique ; <sup>7</sup>Département d'Oncologie Thoracique/Pneumologie, AZ Groeninge, Courtrai, Belgique ; <sup>8</sup>Institut Kanker, Amsterdam, Pays-Bas ; <sup>9</sup>Jeroen Bosch Hôpital, GZ's-Hertogenbosch, Pays-Bas ; <sup>10</sup>Département des Maladies Pulmonaires, Université /Centre Médical de Leiden, Leiden, Pays-Bas ; <sup>11</sup>Département des Maladies Respiratoires, Hôpital Universitaire KU, Louvain, Belgique ; <sup>12</sup>Grand Hôpital de Charleroi, Charleroi, Belgique ; <sup>13</sup>Département de Pneumologie, Hôpital Universitaire Grenoble-Alpes, Grenoble, France ; <sup>14</sup>Département d'Oncologie Médicale, Centre Léon Bérard, Lyon, France ; <sup>15</sup>Clinique de la Ville, Koeln gGmbH, Lungenklinik Koeln-Merheim, Koeln-Merheim, Allemagne ; <sup>16</sup>Département d'Oncologie et Radiothérapie, Université Médicale de Gdansk, Gdansk, Pologne ; <sup>17</sup>Département de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Hôpital Jessa, Hasselt, Belgique, <sup>18</sup>Département d'Oncologie Respiratoire, Hôpitaux Universitaires KU, Louvain, Belgique ; <sup>19</sup>G.M. consultant company, Liège, Belgique

**Introduction:**Un vaccin thérapeutique PDC\*lung01, basé sur une lignée unique de cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC\*line) irradiées et chargées avec 7 peptides tumoraux, a été utilisé pour traiter des patients HLA-A\*02:01+ atteints de cancer du poumon, en association ou non à un traitement anti-PD1 (NCT03970746).

**Matériel et methods:** PDC\*lung01 a été injecté six fois par voie intraveineuse et sous-cutanée, à deux doses : 14 ou 140 millions de cellules, seul (6 et 12 patients, cohortes A1 et A2) ou en combinaison avec un anti-PD1 (6 et 38 patients, cohortes B1 et B2). La lignée PDC\*line exprime les molécules HLA-A\*02:01, B\*07:02, B\*44:02, DRB\*01:03, DRB\*08:01. La dynamique d'apparition des anticorps anti-HLA générés contre PDC\*line au cours du temps et leur cytotoxicité ont été analysées à l'aide du test LIFECODES® Single Antigen et d'un test de lymphocytotoxicité.

**Résultats:**Des anticorps anti- HLA-B7, -B44, -DR103 et/ou -DR8 (pouvant atteindre une MFI >20 000) ont été générés principalement chez les patients ayant reçu la plus forte dose du vaccin (100% et 38%, cohortes A2 et B2 respectivement). Ces anticorps apparaissaient chez 60% des patients après la 6 sixième injection, atteignant leur niveau maximal en un mois et diminuant progressivement dans les 2 ans. Les **spécificités** et la dynamique des anticorps sont variables et dépendent du génotype des patients. Les tests fonctionnels témoignent de la cytotoxicité des anticorps anti-classe II principalement, qui sont les plus nombreux, et de la présence d'IgM.

De façon intéressante, le traitement par anti-PD1 n'a pas montré d'impact sur la dynamique ou la fonctionnalité de ces anticorps.

**Conclusion:** Nous décrivons et caractérisons ici une situation sans précédent dans le contexte de la génération d'anticorps anti-HLA, chez des patients tous traités par une même cellule dendritique allogénique. Ces données seront particulièrement utiles pour l'étude de l'immunogénicité des épitopes à la fois B et T.

**Exploitation d'une cohorte unique de patients traités par un même vaccin cellulaire allogénique pour étudier l'immunogénicité des éplets DRB1**

M. Gérard<sup>1</sup> , C. Puget<sup>1</sup> , C. Vichier<sup>1</sup> , G. Vayssière<sup>2</sup> , G. Maggipinto<sup>3</sup> , J. Plumas<sup>2</sup> , S. Planel<sup>2</sup> , B. Bardy<sup>1</sup> <sup>1</sup>Laboratoire d'histocompatibilité, EFS, Grenoble, France <sup>2</sup>PDC\*line Pharma, Grenoble, France <sup>3</sup>G.M. Consultant compagny, Liège, Belgique Auteur correspondant : [marie.gerard@efs.sante.fr](mailto:marie.gerard@efs.sante.fr)

**INTRODUCTION** Grâce à un modèle d'immunisation à partir d'un unique donneur vis-à-vis d'un panel de receveurs, nous avons analysé l'immunogénicité d'éplets HLA-DRB1 en combinant plusieurs outils bio-informatiques. **MATERIELS ET METHODES** Une cohorte de onze patients traités avec le même vaccin cellulaire (PDC\*line, DRB1\*01:03, DRB1\*08:01) a été analysée par une nouvelle approche bio-informatique inspirée d'HLA Matchmaker et utilisant des programmes VBA (Visual Basic for Applications, Microsoft), la database EpRegistry, et le site pHLA3D. La stratégie d'analyse a été développée et testée en exploitant les pourcentages de positivité des éplets à partir des données des Single Antigen (kit LSA LIFECODES, logiciel Match It! Antibody) et des génotypes HLA des patients (NGS). **RESULTATS** Les patients présentaient tous deux mismatches HLA-DRB1 par rapport au vaccin cellulaire, et leurs typages HLADRB1 étaient différents entre eux. Ils ont tous développé des anticorps anti-HLA-DRB1\*08:01 et 9 patients sur 11 (82%) contre le DRB1\*01:03. A partir des deux molécules DRB1, 30 éplets mismatchés issus du vaccin ont été identifiés dans la cohorte. La première étape de notre stratégie d'analyse, basée sur l'utilisation des pourcentages de positivité des éplets sur les billes du kit LSA, a permis d'en identifier 16 potentiellement impliqués. L'analyse de la structure tri-dimensionnelle des molécules HLA-DRB1 et des variations de MFI en fonction des billes a réduit à 11 le nombre d'éplets potentiellement immunogènes. Parmi ceux-ci, l'éplet 16Y associé au DRB1\*08:01 a été retrouvé chez tous les patients, quel que soit leur typage mismatché. Les éplets 70DA et 96EV du DRB1\*01:03 ont également été retrouvés chez les patients mismatchés pour ces éplets. **CONCLUSION** Le modèle unique d'immunisation couplé à la nouvelle approche développée illustre l'importance de l'analyse des éplets dans le développement des anticorps anti-HLA. La méthodologie pourrait être utilisée pour estimer de manière plus précise la compatibilité entre donneur et receveur en greffe d'organes

**Session 2 abstract 3-Romain Lhotte: HaploDeep, un ensemble de cinq réseaux de neurones pour mieux prédire les typages HLA haute résolution**

**Romain Lhotte** Chloé Benbekrite, Xavier Daubonne, Cécilia Cappia, Cédric Usureau, Valentin Clichet, Lionel Gabet, Véronique Letort, et Jean-Luc Taupin

Hôpital Saint-Louis, [romain.lhotte@centralesupelec.fr](mailto:romain.lhotte@centralesupelec.fr)

Texte (300/300):

Introduction : Le typage HLA haute résolution pour évaluer la compatibilité HLA devient la norme pour la prise de décision clinique et la recherche en transplantation d'organes solides, devant l'utilisation croissante de méthodes évaluant l'alloréactivité T et B au niveau des acides aminés et épitopes de tous les gènes polymorphiques HLA. Les typages de résolution suffisamment élevée font toutefois encore défaut. Le biologiste peut extrapoler manuellement ou avec des outils en ligne le typage du patient sur la base des fréquences d'haplotypes mais prend des risques lorsqu'au moins un haplotype n'est pas assez commun.

Matériel et Méthodes

Pour prédire des typages HLA haute résolution à partir de typages potentiellement incomplets de basse résolution, nous avons développé en 2021 un outil (HaploSFHI) qui utilisait une méthode de Machine Learning en deux étapes (Iterative + Standard Maximum Likelihood Estimation). HaploSFHI s'était entraîné sur 61393 typages NGS. Nous présentons **HaploDeep**, un ensemble de cinq réseaux de neurones (chacun ayant 87 Millions de paramètres), entraîné sur 153952 typages NGS.

Résultats

La précision d'HaploDeep est supérieure aux outils standards sur 16 datasets de validation. Aucun de ces datasets n'avait été utilisé pour entraîner HaploDeep ou les autres outils. La plupart des ethnies sont représentées (France, Russie, Hong Kong, Londres White/Asian/Black/Other, Ecosse, Porto Portugal, Porto Alegre Brésil, São Paulo Brésil, Texas White/Hispanic/Black/Asian/Other).

HaploSFHI, comme les autres outils, n'était disponible qu'en ligne. Nous rendons public les 5 x 87 Millions de paramètres en **open source** (format standardisé Open Neural Network Exchange) pour permettre aux laboratoires d'installer HaploDeep localement et ainsi éviter le transit de données patients.

Conclusion

Merci aux laboratoires de Amiens, Angers, Besançon, Bordeaux, Brest, Caen, Clermont Ferrand, Créteil, Dijon, Grenoble, Lille, Limoges, Lyon, Marseille, Nancy, Nantes, Nice, Paris Saint-Louis, Paris Robert-Debré, Poitiers, Reims, Rouen, Saint-Etienne, Strasbourg, Toulouse, et Tours qui ont participé au recueil de données.



**Session 3-Abstract-1-Julien Lion:Impact de la présence des DSA anti-HLA sur la production de microvésicules endothéliales**

**Julien Lion**<sup>1,2</sup>, Myriam Dollerschell<sup>1,2</sup>, Valentine Jacob<sup>1,2</sup>, Judith Desoutter<sup>1</sup>, Nicolas Guillaume<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Histocompatibilité, CHU Amiens Picardie, France

<sup>2</sup>Hematim – UR UPJV 4666, Amiens Picardie France

**INTRODUCTION:**Le rejet chronique induit par les anticorps dirigés contre les molécules HLA reste la principale cause de perte du greffon rénal. Le diagnostic de rejet médié par les anticorps (ABMR) repose sur la présence d'anticorps spécifiques du donneur (DSA) dans le sérum du receveur et des lésions histologiques notamment endothéliales du greffon. La fixation des DSAs sur l'endothélium microvasculaire a également un impact sur la régulation de la réponse immunitaire allogénique par les cellules endothéliales.

Les vésicules extracellulaires (EVs) représentent une population hétérogène de vésicules produites par la majorité des types cellulaires. Des EVs sont généralement produites par les cellules du greffon. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) du receveur capturent ces vésicules et arborent par la suite des molécules HLA provenant du donneur à leur surface (alloreconnaissance semi-directe). Elles jouent ainsi un rôle important dans l'initiation de la réponse allogénique associée au rejet de greffe.

L'objectif de cette étude est de décrire l'impact de la présence de DSA anti-HLA sur la production d'EVs, et plus précisément des microvésicules ( $\mu$ EVs) (50nm-1000nm) d'origine endothéliale.

**MATERIELS ET METHODES :**Une lignée de cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1), cultivées en milieu de culture complet spécifique (EGM-2, Promocell) et exprimant constitutivement les molécules HLA de classe I, a été utilisée. Ces cellules ont été stimulées par de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  afin d'induire l'expression des molécules HLA de classe II. Cette lignée cellulaire a ensuite été cultivée en présence de sérums de patients immunisés présentant des DSA anti-HLA. La présence des  $\mu$ EVs issues des HMEC-1 dans les surnageants de culture a ensuite été étudiée en cytométrie de flux (Cytotflex, Beckam Coulter).

**RESULTATS ET CONCLUSIONS:** La valeur des MFI Luminex des DSAs ne permet pas de présumer de leur fixation/affinité à la surface des HMEC-1. L'incubation des HMEC-1 avec un pool de sérums de patients hyper-immunisés durant 24 et 48 heures a permis d'objectiver la production de  $\mu$ EVs. Toutefois, cette production semble inversement proportionnelle à la quantité de sérums présente dans le milieu de culture mais également inférieure à la production de  $\mu$ EVs sans incubation des HMEC-1 avec des DSAs. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus dans notre étude prospective réalisée sur une cohorte de patients transplantés rénaux (publication en cours) où la quantité des  $\mu$ EVs plasmatiques (Annexine V<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup>) est plus faible lors d'un rejet humoral qu'en absence de rejet. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés et complétés par une analyse qualitative des  $\mu$ EVs produites (contenu en miRNA, protéines...)

## **Session 3-Abstract 2- Xavier Charmetant: Impact de l'allo-reconnaissance innée médiée par les lymphocytes NK sur la génération de DSA précoces par la voie directe inversée après transplantation pulmonaire**

**SAISON Carole**  
**Établissement Français du Sang - Laboratoire HLA**  
**111 Rue Elisée Reclus - CS 20617**  
**69153 Décines Cedex**  
**04 78 65 64 25 [carole.saison@efs.sante.fr](mailto:carole.saison@efs.sante.fr)**

La transplantation est la meilleure option thérapeutique pour les patients avec une défaillance terminale d'un organe vital. Cependant, les différences génétiques entre donneur et receveur déclenchent diverses voies d'allo-reconnaissance (directe, semi-directe, indirecte) après la transplantation, provoquant le rejet d'allogreffe.

Récemment, notre équipe a identifié une nouvelle voie d'allo-reconnaissance: la voie directe inversée (1). Elle implique les lymphocytes T CD4+ « passagers » (provenant du donneur) présents dans les greffons qui reconnaissent les molécules d'HLA-II intactes à la surface des lymphocytes B allo-réactifs du receveur. Ce processus induit la génération de DSA précoces, responsables de rejets humoraux et est particulièrement fréquent après transplantation pulmonaire (32%) et intestinale (83%) (1).

Pourtant, certains greffés pulmonaires ne développent pas de DSA par la voie directe inversée. En se basant sur des expériences murines préliminaires, nous émettons l'hypothèse que les lymphocytes NK du receveur pourraient empêcher la production de DSA précoces en détruisant les lymphocytes T CD4+ du greffon.

Notre projet vise à valider cette hypothèse en démontrant que les patients avec des NK réactifs aux lymphocytes T du donneur ne développent pas de DSA précoces par la voie directe inversée, contrairement au receveur avec des NK permissifs (exposés au risque de DSA précoces).

Deux cohortes de patients transplantés pulmonaires seront étudiées, l'une rétrospective pour confirmer notre hypothèse génétiquement, et l'autre prospective pour renforcer les résultats et identifier des biomarqueurs prédictifs de DSA précoces.

Cette recherche permettra d'identifier les patients à risque de DSA précoces, facilitant la mise en place de stratégies de prévention spécifiques.

### Session 3-Abstract 3-Diego Amaya-Ramirez -Projet HLA3diff

**Diego Amaya-Ramirez** 1,\* , Louane, Sigrist 1 , Jean-Luc Taupin 2 , Marie-Dominique Devignes 1 1 LORIA, Université de Lorraine, CNRS, INRIA, Nancy, 54000, France 2 Hôpital Saint-Louis, Inserm, Paris, 75010, France \* Auteur correspondant : daamayr@gmail.com

**Introduction :** La diversité des antigènes HLA et leur rôle crucial dans la compatibilité des greffons rendent essentielle la compréhension de leurs structures tridimensionnelles (3D) pour mieux comprendre les motifs d'immunisation utilisés pour l'attribution des greffes. Le projet HLA-3D-Diff a été développé pour faciliter la comparaison structurale des antigènes HLA, en intégrant à la fois des données de séquences et des simulations de dynamique moléculaire (DM). **Méthodes :** HLA-3D-Diff se compose d'une base de données et d'une interface de visualisation. La base de données compile des informations provenant de sources publiques comme la « PDB » [1], l' « IPD-IMGT/HLA » [2], le « HLA Eplet Registry » [3], la base de données « Allele Frequency Net » [4] ainsi que des données générées localement par des simulations de DM. L'interface de visualisation permet la superposition et la comparaison des structures HLA en utilisant divers outils graphiques pour mettre en évidence les différences structurales. L'interface de la base de données a été implémentée avec phpMyAdmin tandis que l'interface de visualisation des structures 3D a été implémentée avec NGL viewer [5]. **Résultats :** Les cas d'utilisation montrent que HLA-3D-Diff permet d'identifier efficacement les épitopes partagés ou distincts entre différents allèles et de visualiser les variations de surface le long des simulations de DM. Par exemple, la superposition des antigènes A\*02:01 et A\*02:02 a révélé des différences significatives dans l'accessibilité au solvant au niveau de la chaîne latérale en position 43. **Conclusion :** HLA-3D-Diff constitue un outil puissant pour les chercheurs et cliniciens dans l'analyse structurale des antigènes HLA. En facilitant la visualisation et la compréhension des différences structurelles, cet outil contribue à une meilleure compréhension des motifs d'immunisation et ainsi à la gestion de la compatibilité des greffons. Le code source et les informations pour l'installation d'une image locale de HLA-3D-Diff sont disponibles dans le dépôt gitlab suivant : [https://gitlab.inria.fr/capsid.public.codes/hla-3d-diff\\_public](https://gitlab.inria.fr/capsid.public.codes/hla-3d-diff_public). **Format de présentation souhaité :** Présentation orale **Références :** [1] wwPDB consortium: Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Res.* (2019). <https://doi.org/10.1093/nar/gky949>. [2] Barker, D.J., Maccari, G., Georgiou, X., Cooper, M.A., Flicek, P., Robinson, J., Marsh, S.G.E.: The IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res.* (2023). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1011>. [3] Duquesnoy, R.J., Marrari, M., Sousa, L.C.D. da M., Barroso, J.R.P. de M., Aita, K.M. de S.U., da Silva, A.S., do Monte, S.J.H.: 16th IHIW: A Website for Antibody-Defined HLA Epitope Registry. *Int. J. Immunogenet.* (2013). <https://doi.org/10.1111/iji.12017>. [4] Gonzalez-Galarza, F.F., McCabe, A., Santos, E.J.M. dos, Jones, J., Takeshita, L., Ortega-Rivera, N.D., Cid-Pavon, G.M.D., Ramsbottom, K., Ghattaoraya, G., Alfirevic, A., Middleton, D., Jones, A.R.: Allele frequenc

**Session 4-Abstract 1-Anthony Desaegher:HLA B\*37:07 en urgence : retour aux fondements du typage HLA et impact en transplantation**

Intissar DALHOUMI<sup>1\*</sup>, Anthony DESAEGHER<sup>1\*</sup>, Linda DI MAGGIO<sup>1</sup>, Cécile BOUCHER<sup>1</sup>, Elodie WOJCIECHOWSKI<sup>1</sup>, Mamy RALAZAMAHALEO<sup>1</sup>, Gwendaline GUIDICELLI<sup>1</sup>, Marine CARGOU<sup>1</sup>, Jonathan VISENTIN<sup>1,2</sup> \*contribution équivalente 1 CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Immunologie et Immunogénétique, Hôpital Pellegrin, Place Amélie Raba Léon, F-33000 Bordeaux, France ; 2 Bordeaux University, CNRS, INSERM, ImmunoConcEpt, UMR 5164, ERL 1303, 146 rue Léo Saignat, F-33000 Bordeaux, France

Introduction : Un donneur d'organe exprimant un HLA-B\*37:07 a été typé au laboratoire. Etonnamment, il se différencie du HLA-B\*37:01 par 7 couples d'amorces de PCR de la technique LinkSeq<sup>TM</sup>. Notre exploration des caractéristiques du HLA-B\*37:07 nous plonge dans les fondements historiques du typage HLA. Le potentiel impact en transplantation d'organe du HLA-B\*37:07 a été étudié. Matériels et méthodes : Les séquences génomiques et peptidiques ont été obtenues sur l'IPDIMGT/HLA Database. La recherche d'allèles HLA de séquence génomique proche utilisait l'outil BLAST (NCBI). L'étude des eplets utilisait les données de l'HLA Eplet Registry. Résultats : L'alignement des séquences génomiques de HLA-B\*37:07 et HLA-B\*37:01 révèle une homologie de l'exon 1 jusqu'à une partie de l'intron 2, puis de nombreux mismatches. L'outil BLAST permet d'identifier l'allèle HLA-B\*07:02 comme étant homologue à HLA-B\*37:07 dans la deuxième partie de l'intron 2 jusqu'à l'exon 8. Le HLA-B\*37:07 correspond très probablement au produit d'une chimère HLA-B\*37:01/HLA-B\*07:02. L'analyse des eplets portés par HLA-B\*37:07 identifie 3 eplets communs à HLA-B\*37:01 et HLA-B\*07:02, 19 portés uniquement par HLA-B\*37:01, et 16 uniquement par HLA-B\*07:02. En cas de proposition de greffe d'un donneur HLA-B\*37:07, nous avons défini les profils d'immunisations Single Antigen devant alerter de la présence d'anticorps anti-HLA-B\*37:07. Conclusion : Le HLA-B\*37:07 est un antigène chimérique associant la chaîne alpha-1 du HLA-B\*37:01 puis les chaînes alpha-2/3 et suivantes du HLA-B\*07:02. En cas de transplantation avec un donneur HLA-B\*37:07, la présence d'une immunisation dirigée contre le donneur (DSA) ne peut être déterminée sur la seule réactivité de la bille Single Antigen HLA-B\*37:01. La réactivité de la bille HLA-B\*07:02 ainsi qu'une étude des eplets est nécessaire pour affirmer la présence de DSA. En cas de profil Single Antigen trop complexe, un crossmatch cellulaire peut être nécessaire

## **Session 4-Abstract-2-Cédric Usureau:Optimiser le calcul du cPRA pour améliorer l'évaluation de la compatibilité HLA en transplantation d'organes : une analyse détaillée de la liste d'attente d'Ile-de-France.**

**Cédric Usureau**, Romain Lhotte, Valentin Clichet, Alexandre Foroutan, Magali Devriese, Jean-Luc Taupin

Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, Paris, France.  
e-mail : cedric.usureau@aphp.fr

### **Introduction :**

Le Calculated Panel Reactive Antibodies (cPRA) évalue le pourcentage de donneurs potentiels incompatibles d'après une liste d'« antigènes HLA interdits », pour estimer l'accès à la greffe d'un patient. Ce critère est essentiel pour le dialogue clinico-biologique et pour prioriser les patients.

### **Matériels et Méthodes :**

Nous avons développé cPRAdictor, un outil en ligne s'appuyant sur une base de >150 000 typages HLA anonymisés et sans ambiguïtés issue de la récolte NGS nationale 2022. Cet outil permet de calculer un cPRA "national" intégrant l'ensemble des loci HLA en groupe sérologique ou en antigène (= résolution 2 champs). Nous avons comparé cPRAdictor aux outils existants (ABM/OPTN/Eurotransplant) sur la liste d'attente d'Ile-de-France (4106 patients immunisés), puis mesuré l'impact des anticorps anti-Cw/DP et spécifiques d'antigènes sur le cPRA.

### **Résultats :**

cPRAdictor est plus proche du TGI (Taux de greffons incompatibles) de l'ABM que les outils américain et européen. De plus, des variations importantes du cPRA sont révélées par l'intégration des anticorps anti-C/DP ou spécifiques d'antigènes. Notamment, 43% des patients immunisés voient leur cPRA augmenter d'au moins 1% et en tenant compte de l'ensemble de leurs anticorps, par rapport au mode de calcul du TGI. Pour plus d'un quart d'entre eux, l'accès à la greffe baisse de plus de 50%.

### **Conclusion :**

Ne pas intégrer l'ensemble des anticorps d'un patient en liste d'attente peut grandement sous-estimer son cPRA, induisant une inéquité d'accès aux greffons. Cela peut également restreindre l'accès à des protocoles de désensibilisation dépendants du TGI, essentiels pour les patients hautement sensibilisés.

## **Session 4-Abstract 3-Margot Lepage:Impact de l'immunisation anti-HLA-C et -DP sur l'accès à la transplantation rénale en France**

**Margot Lepage**<sup>1</sup>, Valérie Dubois<sup>1,3</sup>, Alice Koenig<sup>2,3,4</sup>

1. Laboratoire d'histocompatibilité, Etablissement Français du Sang (EFS) Auvergne-Rhône-Alpes, Lyon, France
2. Service de transplantation, néphrologie et immunologie clinique, Hospices Civils de Lyon, hôpital Edouard Herriot, Lyon, France
3. Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France
4. Faculté de Médecine Lyon-Est, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

Compte tenu du risque de rejet humoral, la plupart des programmes d'attribution des greffons permettent la saisie « d'antigènes inacceptables » afin d'éviter la transplantation rénale en présence d'un anticorps spécifique du donneur. Les anticorps anti-HLA-C et -DP (anti-C/DP) ne sont souvent pas pris en compte par ces programmes, tels que celui de l'Agence de la biomédecine en France. Cependant, de plus en plus d'études mettent en évidence la pathogénicité des anti-C/DP, conduisant de nombreuses équipes à les prendre en compte systématiquement lors de l'acceptation ou non d'un greffon pour leurs patients.

Afin d'évaluer l'impact de la non prise en compte des anti-C/DP dans l'attribution des greffons sur l'accès à la transplantation rénale des patients présentant de tels anticorps, nous avons mené une étude incluant 2205 patients en attente de transplantation rénale inscrits sur la liste d'attente nationale entre 2009 et 2018 à Lyon.

La prévalence des anti-C/DP était de 1.0% chez les patients non immunisés (NI) dans d'autres loci, 17.6% chez les immunisés (I), et 71.3% chez les hyperimmunisés (HI). La prise en compte des anti-C/DP augmentait le score « calculated panel reactive antibody » (cPRA) et on observait une médiane de temps d'attente plus élevée en présence d'anti-C/DP, indépendamment de l'immunisation associée (NI : 78 vs 23 mois,  $p < 0.01$  ; I : 55 vs 39 mois,  $p = 0.07$  ; HI : 117 vs 26 mois,  $p < 0.01$ ). Parmi les HI, la présence d'anti-C/DP impactait le temps d'attente y compris pour des valeurs de cPRA comparables (cPRA=[85-97] : 38 vs 19 mois,  $p = 0.05$ ). Bien qu'ils augmentaient moins le cPRA que les anti-DP, les anti-C semblaient allonger d'avantage le temps d'attente.

Cette étude montre une diminution de l'accès à la transplantation rénale en présence d'anti-C/DP. La possibilité d'intégrer ces anticorps dans les algorithmes d'attribution pourrait permettre d'améliorer l'équité entre les receveurs.

Session Poster :

## **Outil informatique pour la recherche de receveurs lors d'une proposition d'organe**

**Dany Wong Cheng**\*, Ophelie Ferrary\*, Anne Laffont\*, Julien Eperonnier\*, Pr Henri Vacher Coponat\*\*

Laboratoire HLA\*, Service de Néphrologie\*\* (CHU de la Réunion)

Devant la demande clinique de faciliter la recherche de receveurs potentiels, nous avons développé au laboratoire HLA de La Réunion un outil informatique.

Cet outil est utilisé par le biologiste de garde HLA, et la source de données principale est un export de la liste Cristal des receveurs en attente de greffe.

Il permet de sélectionner des receveurs potentiels selon différents critères immunologiques ou non, préalablement établis en coopération avec les médecins néphrologues et en tenant compte des critères de répartition et d'attribution des greffons par l'Agence de Biomédecine :

- différence d'âge
- délai d'attente
- groupe sanguin
- mismatches sur les loci HLA -A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1
- prise en compte des broads
- présence de DSA (-C et -DPB1 inclus)

Un système de points est attribué à chacun de ces critères. Les receveurs sont ainsi classés selon un score global et un score immunologique.

Une fois le typage en urgence validé et saisi sur Cristal, le biologiste renseigne dans l'outil :

- le typage du donneur
- l'âge du donneur
- le groupe sanguin du donneur

Cela génère l'ouverture de 3 tableaux Excel proposant des noms de receveurs :

- receveurs hyperimmunisés
- receveurs potentiels sans DSA
- repêchage de receveurs avec au maximum 1 DSA (faux positifs)

A partir de ces listes, le biologiste HLA peut étudier les dossiers des différents receveurs (profils immunologiques, suivi transfusionnel...) et communiquer ces informations au clinicien.

Cet outil informatique facilite et renforce le rôle de conseil immunologique du biologiste HLA. De plus, il permet d'obtenir localement des noms de receveurs potentiels avec un meilleur appariement HLA que cristal, en toute autonomie et ainsi de gagner du temps dans le processus de greffe.

## Quelle place pour l'Adsorb™ et le Presorb™ face aux profils aspécifiques de Single Antigen ?

Guilaine Hell<sup>1</sup>, Aurélien Mariotte<sup>1</sup>, Baptiste Panaget<sup>1</sup>, Marie-Joelle Apithy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'histocompatibilité, Etablissement Français du Sang Grand Est

### Introduction

Le Single Antigen (SA) Luminex® est la technique de référence pour l'analyse des anticorps anti-HLA. Des critères de validité sont définis, incluant une bille contrôle négatif (NC) avec une MFI (Mean Fluorescence Intensity) inférieure à 500. Divers profils aspécifiques sont décrits, et des solutions de prétraitement des sérums sont proposées par les fournisseurs pour améliorer les résultats. Actuellement, un prétraitement par Adsorb™ est réalisé en cas de NC > 500, tandis que l'utilisation du Presorb™ est réservée à la résolution des profils Pan-DR. Dans cette étude, nous visons à déterminer la place du Presorb™ par rapport à l'Adsorb™.

### Matériel et méthode

L'identification des anticorps anti-HLA a été réalisée par SA One Lambda LABScreen®, avant et après traitement par Adsorb™ et Presorb™. Les échantillons analysés étaient suspectés de présenter des profils non spécifiques, incluant Pan-Cw, traitement par immunoglobuline, DP1/DP5/DR53, pan-DR, et NC > 500. Des profils de patients hyperimmunisés ont été analysés pour évaluer l'absence d'interférences sur les réelles immunisations.

### Résultats

Pour les Pan-Cw, une amélioration a été observée après traitement par Presorb™, contrairement à l'Adsorb™. Concernant le traitement par immunoglobuline et les DP1/DP5/DR53, aucune amélioration n'a été constatée avec les deux prétraitements. Pour les profils Pan-DR, une négativation du profil est observée après traitement par Presorb™. Concernant les échantillons avec NC > 500, l'efficacité des deux prétraitements s'est révélée comparable. Pour les hyperimmunisés, aucune différence significative de MFI n'a été observée après prétraitement.

### Discussion

En cas de suspicion d'anticorps dirigés contre des antigènes dénaturés (par exemple, Pan-Cw, Pan-DQ), l'utilisation du Presorb™ peut être une option intéressante. Nous confirmons l'intérêt du Presorb™ pour la résolution des profils Pan-DR. De plus, nous avons observé une équivalence d'efficacité entre le Presorb™ et l'Adsorb™ devant une bille NC > 500. À la vue de nos résultats, en cas de demande urgente, l'utilisation du Presorb™ peut représenter une alternative judicieuse.



## **Suivi post-injection des CAR-T CD19 dans le traitement des hémopathies lymphoïdes : PCR quantitative versus cytométrie de flux**

Judith Desoutter<sup>1</sup>, **Julien Lion**<sup>1</sup>, Lucie Thirache<sup>1</sup>, Cécilia Da Costa<sup>1</sup>, Magalie Joris<sup>2</sup>, Lavinia Merlusca<sup>2</sup>, Lina Mustapha<sup>3</sup>, Christelle Ossart<sup>4</sup>, Nicolas Guillaume<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Histocompatibilité, CHU Amiens Picardie, France; <sup>2</sup>Service d'Hématologie Clinique, CHU Amiens Picardie, France; <sup>3</sup> Pharmacie à usage intérieur, CHU Amiens Picardie, France; <sup>4</sup> Laboratoire de Thérapie Cellulaire, CHU Amiens Picardie, France

### INTRODUCTION

Les CAR-T cells constituent une thérapie innovante indiquée pour le traitement de certaines hémopathies lymphoïdes. Lors de la fabrication de Yescarta® et Tecartus®, les cellules T autologues du patient sont transduites avec un vecteur viral (MSCV) porteur du récepteur antigénique chimérique (CAR) ciblant spécifiquement le CD19 porté par les cellules tumorales. Le suivi post-injection des CAR-T cells au CHU Amiens-Picardie est basé sur la cytométrie de flux (CMF). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'intérêt du suivi par PCR quantitative (qPCR).

### MATERIELS ET METHODES

Vingt-deux patients de notre centre ont été inclus de novembre 2021 à juillet 2023. La technique de qPCR développée (méthode  $\Delta\Delta C_t$ ) amplifie la région 5'LTR du MSCV, introduite simultanément au CAR dans le génome, permettant la quantification du CAR-T cells circulants chez le patient. L'ensemble des points de suivi de l'expansion/persistance du CAR-T cells (J1 à J90) sont analysées parallèlement en CMF et en qPCR. La technique de CMF consiste en un marquage sur sang total avec du 7AAD, des anticorps anti-CD45/CD14/CD3/CD4/CD8 et une protéine recombinante à base d'antigène biotinylé spécifique des CAR-T cells et détectée par un anticorps anti-biotine.

### RESULTATS ET CONCLUSION

De J1 à J30, nous observons une excellente corrélation entre les deux méthodes, notamment en comparant le pourcentage de CAR-T cells dans les lymphocytes totaux au fold-change obtenu par qPCR. Les résultats des 2 techniques sur l'ensemble de la cohorte, montrent une cinétique similaire avec un pic d'expansion des CAR-T cells de J7 à J12, suivi d'une décroissance. Au-delà de J30, les CAR-T cells sont quasiment indétectables en CMF et bien que les fold-change soient à des taux très faibles, ils sont encore détectés en qPCR chez la plupart de nos patients.

La qPCR est une méthode simple et précise pour le suivi des patients traités avec des CAR-T cells. Les résultats de la qPCR sont corrélés avec ceux de la CMF et semblent être plus sensibles pour le suivi des patients au-delà de J30 post injection.

## **Optimisation du tri lymphocytaire sur automate Robo-Sep™ pour le cross match en cytométrie de flux.**

**JB. Baudey** 1, A. Basire 1, T. Thorrignac 1, C. Picard 1,2, P. Pardini 1,2, L. Hubert 1,2

1 Laboratoire d'immunogénétique et histocompatibilité, EFS PACC, Marseille, France

2 « Biologie des groupes sanguins », UMR 7268 ADÉS Aix-Marseille Université /EFS /CNRS, Marseille, France

**INTRODUCTION :** Le cross-match en cytométrie de flux (CMF) permet d'évaluer, in vitro et avec une bonne sensibilité, la fixation des anticorps du receveur sur les cellules du donneur potentiel. Il est réalisé sur lymphocytes totaux isolés par tri négatif. Dans la perspective d'automatiser l'étape de tri à l'aide du RoboSep™, cette première étude en collaboration avec le fournisseur a deux objectifs ; d'une part, l'optimisation du protocole de l'automate afin d'améliorer la pureté du tri et d'autre part, l'évaluation de l'impact de la méthode de tri sur les résultats du cross-match.

**MATERIELS ET METHODES :** Les lymphocytes totaux sont isolés à partir du sang total de donneurs sains, à l'aide du kit de tri négatif EasySep™ Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit (StemCell), à la fois manuellement et sur automate Robo-Sep™ (StemCell). La pureté des tris est évaluée en cytométrie de flux après marquage CD45-CD3-CD19. Le protocole par défaut et 3 protocoles sur-mesure (utilisation de deux aimants ; modification de la technique de pipetage de l'automate ; augmentation du volume de billes magnétiques) sont évalués.

**RESULTATS :** Alors que la pureté lymphocytaire obtenue avec le protocole par défaut de l'automate est inférieure à celle obtenue en technique manuelle (contamination échantillon-dépendante par des globules rouges résiduels), les 3 nouveaux protocoles améliorent nettement la pureté du tri automatisé. La méthode de tri utilisée n'a pas d'impact sur les résultats du cross-match en CMF ni sur les MFI ou les ratios de positivité observés.

**CONCLUSION :** L'automatisation du tri permet d'améliorer l'organisation du laboratoire. Après optimisation en partenariat avec le fournisseur, la pureté obtenue est similaire à celle obtenue en tri manuel. Le protocole 2 ne consomme pas de réactif supplémentaire et ne mobilise qu'un seul aimant. Le passage d'une méthode de tri à l'autre est sans impact sur les résultats des cross-matches.

## **Extraction d'ADN libre circulant dérivé du donneur par le kit d'extraction Promega® (RSC ccfDNA LV Plasma Kit)**

Jean Milhès<sup>1</sup>, Bouthemy Charlene<sup>1</sup>, Blazi Thierry, Congy-Jolivet Nicolas<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Immunology laboratory department, IFB Purpan, Toulouse University Hospital Center, Toulouse, France

<sup>4</sup> UMR 1037 INSERM Team 20 / Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse Cancerology Research center (CRCT), Toulouse, France

La détection précoce de d'ADN libre circulant dérivé du donneur (dd cfDNA) dans le plasma des receveurs d'organes suite à une transplantation, pourrait permettre d'une part une surveillance accrue du rejet et d'autre part de réduire la réalisation de ce geste invasif qu'est la biopsie rénale. Les kits Alloseq cfDNA (CareDX®) préconisent la réalisation d'une extraction par le kit manuel QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen®). Nous avons testé le kit semi-automatisé RSC ccfDNA LV Plasma Kit (Maxwell®) afin de vérifier la qualité des fragments d'ADN extraits, ainsi que leur concentration.

Trois échantillons de sujets sains ont été extraits en parallèle par les deux kits (RSC ccfDNA LV Plasma Kit et QIAamp Circulating Nucleic Acid). Le protocole du kit RSC ccfDNA LV Plasma a ensuite été optimisé sur 8 prélèvements réalisés chez des sujets sains, pour valider l'obtention d'une concentration et d'une pureté satisfaisantes. Le protocole optimisé a ensuite été employé pour extraire le cfDNA de 13 échantillons de receveurs de rein prélevés 3 ou 6 mois après la transplantation. Les concentrations de cfDNA ont été mesurées par le kit Quantif ADN db HS (Qubit®), et la taille évaluée par migration sur gel (TapeStation, Agilent®).

Une concentration plus élevée de cfDNA a été obtenue avec le kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (0,075 vs 0,211 ng/μL). Les profils de migration ont révélé la présence d'un pic d'ADN de 170pb avec les deux techniques. L'extraction par le kit RSC ccfDNA LV Plasma a permis d'obtenir des concentrations de cfDNA similaires après ultracentrifugation des tubes primaires (0,092 ng/μL) ou incubation en présence de protéinase K (0,075 ng/μL). Les échantillons de patients ont été analysés avec le protocole optimisé (ultracentrifugation + protéinase K), permettant d'obtenir des concentrations plus élevées que chez les sujets sains (0,873 ng/μL) et des pics de cfDNA de 170pb après migration sur gel. 96% (23/24) des échantillons ont permis d'obtenir des résultats interprétables sur le kit Alloseq cfDNA.

L'extraction de cfDNA avec le kit semi-automatisé RSC ccfDNA LV Plasma Kit semble donner des concentrations et une qualité d'ADN satisfaisantes pour employer la technique Alloseq cfDNA.

## **Technologie Luminex® pour la recherche des anticorps anti-HLA: Que faire face aux interférences analytiques ?**

**Hajer Lamari**, D. Krir, S. Ben Boujema, R. Nabli, I. Karaa, T. Dhaouadi, C. Kallala, T. Ben Abdallah, Y. Gorgi, I. Sfar

### **Introduction :**

L'interprétation des anticorps anti-HLA recherchés par la technologie Luminex peut être parfois difficile notamment en présence d'IgM anti-HLA, d'effet prozone ou d'anticorps anti-HLA dénaturés (d-HLA).

Ce travail visait à tester l'intérêt de solutions techniques simples et peu onéreuses dans la résolution de ces interférences.

### **Matériel et Méthodes :**

L'efficacité de la dithiothréitol (DTT) dans la réduction du bruit de fond des billes contrôle négatif (BCN) dû aux IgM anti-HLA a été testé sur des échantillons ayant des MFI >500 des BCN. Des échantillons positifs uniquement aux anti-HLA de classe I par le test Mix LUMINEX® ont été repassés à une dilution de 1:100 pour neutraliser l'effet prozone.

Pour limiter la détection des d-HLA, de nouveaux seuils de positivité ont été calculés via une analyse ROC des résultats des prélèvements de 12 receveurs de greffe rénale positifs aux anti-HLA reconstruits.

### **Résultats :**

Le traitement par la DTT a permis une diminution statistiquement significative des MFI des BCN ( $n=4; p=0,046$ ) sans effets sur la bille contrôle positif ( $p=0,317$ ).

Deux des dix échantillons initialement négatifs pour le dépistage des anticorps anti-HLA de classe II et MICA se sont révélés positifs après dilution.

Comparés aux patients ayant des contrôles négatifs, les patients persistant positifs avaient des médianes MFI significativement plus élevées aussi bien pour les spécificités anti-HLA classe I que HLA classe II ( $p<0,001$ ). En augmentant le cut-off MFI à 2278 pour la classe I et à 1710 pour la classe II, la sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 80% et 86.4% pour la classe I et de 82.6% et 92.9% pour la classe II avec des AUC > 0,8.

### **Conclusions :**

L'identification des interférences lors de la recherche d'anti-HLA nécessite une collaboration clinico-biologique. La résolution de ces interférences permet une meilleure prise en charge des patients greffés ou en attente de greffe.