

Chapitre 11

Exploration du complexe majeur d'histocompatibilité

Le premier produit du complexe immunogénétique *HLA* (*Human Leucocyte Antigens*), *HLA-A2*, a été individualisé en 1958 par Jean Dausset qui a reçu le prix Nobel en 1980 pour cette découverte. En raison de l'importance de ce complexe dans la greffe d'organe, le système *HLA* a été initialement perçu comme le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'homme. Il s'agit d'un système multigénique, multi-allélique et d'expression codominante. En dehors du contexte de la greffe d'organes ou de tissus entre individus différents, la fonction majeure des produits du CMH, découverte partagée entre deux autres lauréats Nobel, Ralf Zinkernagel et Peter Doherty (1986), est de permettre des interactions cellulaires, en tout premier lieu la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T. En effet, ces cellules reconnaissent, de manière spécifique par leur récepteur T (TCR), l'association d'un peptide et de la molécule CMH qui le présente. Les lymphocytes T CD4⁺ ne reconnaissent que des peptides, en majorité exogènes, présentés par des molécules CMH de classe II exprimées de façon constitutive sur les cellules présentatrices d'antigènes (*e.g.* cellules dendritiques, monocytes/macrophages, lymphocytes B). Les lymphocytes T CD8⁺ ne reconnaissent que les peptides, majoritairement d'origine endogène, présentés par les molécules CMH de classe I

exprimées sur toutes les cellules nucléées de l'organisme. Ces peptides provenant de la dégradation de molécules du soi dans les conditions physiologiques correspondent à des peptides viraux ou tumoraux en pathologie.

Ce système de reconnaissance des vertébrés supérieurs a été progressivement identifié. Chez la souris, le CMH est le système H-2. Les molécules de classe I sont codées par les gènes *H-2K*, *H-2D* et *H-2L* (*e.g.* H2^k, H2^d) et les molécules de classe II par les gènes I-E et I-A. Il existe également un CMH chez le chien (DL-A) ou le cheval (EL-A), par exemple. La compatibilité ou l'incompatibilité du CMH doit être prise en compte dans les expérimentations impliquant des animaux de fonds génétiques différents.

Les produits du CMH sont des glycoprotéines membranaires qui peuvent donc être identifiées à la surface des cellules. Elles présentent des épitopes spécifiques reconnaissables par des anticorps qui permettent de les typer de manière générique. Du fait de leur extrême variabilité au sein d'une même espèce, et en particulier chez l'homme, la caractérisation des allèles codant pour ces molécules ne peut être réalisée que par biologie moléculaire.

En raison de leur implication majeure dans la tolérance ou le rejet de greffe, les molécules *HLA* de l'homme sont principalement caractérisées dans le domaine de la transplantation d'organes.

Typage du HLA en sérologie

Le typage d'un locus en sérologie repose sur la reconnaissance des molécules *HLA* membranaires par des anticorps anti-*HLA* spécifiques de familles d'allèles en présence de complément. La fixation des anticorps sur leur cible entraîne une activation du complément et la lyse de la cellule exprimant le CMH reconnu. Cette réaction, qui utilise du complément de lapin, est mise à profit dans la microlymphocytotoxicité utilisée pour les typages *HLA* de l'homme. Les panels d'anticorps utilisés sont soit des anticorps polyclonaux provenant de femmes multipares ou de sujets polytransfusés, soit des anticorps monoclonaux activateurs du complément. Les cellules testées, issues de l'individu dont on cherche à connaître le typage *HLA* de classe I, sont des lymphocytes totaux isolés sur gradient de Ficoll®, le plus souvent à partir d'un prélèvement sanguin. Cette technique est moins utilisée pour les molécules de classe II, car elle requiert des lymphocytes B purifiés.

Pour typer les cellules issues d'animaux, des anticorps monoclonaux spécifiques permettent de reconnaître des motifs spécifiques des motifs spécifiques d'allèles (*e.g.* H-2^d ou H-2^b chez la souris), le plus souvent par cytométrie en flux. Toutefois, les lignées syngéniques ne nécessitent pas de vérifier le CMH des animaux.

Typage du HLA par biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire identifiant le génotype CMH utilisent actuellement la PCR-SSO (*PCR using Sequence Specific Oligonucleotides*), la PCR-SSP (*PCR using Sequence Specific Primers*) ou le séquençage. Les méthodes basées sur les fragments de restriction enzymatique de l'ADN (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP) sont de moins en moins utilisées. La PCR-SSO est automatisée pour le typage HLA dans le système multiplex Luminex®. Des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'amplicons biotinylés

ont été fixées à la surface de microsphères dont la fluorescence intrinsèque est spécifique de la sonde oligonucléotidique qu'elles portent. Après fixation des amplicons, la fluorescence de chaque bille du mélange est mesurée et l'analyse du profil de l'ensemble des billes permet de déterminer l'haplotype HLA d'un individu. La PCR-SSP utilise des amorces spécifiques d'allèle ou d'un groupe d'allèles en fonction du degré de résolution de l'amorce (typage générique). Le séquençage nucléotidique des exons 2 et 3 des gènes de classe I (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) et de l'exon 2 des gènes de classe II (*HLA-DRB1*, *HLA-DPBI*, *HLA-DQB1*) permet un typage de haute résolution. Lorsqu'il porte sur la totalité des exons et des introns, ce séquençage parvient à un véritable typage allélique.

Avantages/inconvénients

	Avantages	Inconvénients
Typage sérologique	Atteste de l'expression membranaire des molécules du CMH et lève ainsi certaines ambiguïtés portant sur des allèles nuls.	Typage générique Allèles rares pour lesquels il n'existe pas d'anticorps spécifiques Le typage <i>HLA</i> sérologique peut être difficile voire impossible en cas de lymphopénie sévère Réaction croisée des anticorps vis-à-vis de certains allèles
Typage en biologie moléculaire	<i>Screening</i> haut débit Spécificité du typage allélique Typage de haute résolution indispensable dans les allogreffes de cellules souches hématopoïétiques avec donneurs non apparentés Typage <i>HLA-DP</i>	Résultat dépendant de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait Réaction de séquençage sujette aux contaminations

Exemples d'applications

- En recherche : il est important de connaître le CMH des animaux d'expérimentation ou de lignées cellulaires lorsque les fonctions de ces

molécules peuvent être impliquées dans le modèle mis en place.

- En clinique, les indications principales du typage *HLA* sont les suivantes :
 - les transplantations d'organes pour lesquelles un typage générique des loci *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DR* et *HLA-DQ* suffit dans la majorité des cas;
 - les greffes de cellules souches hématopoïétiques où en dehors de greffes familiales, où les quatre haplotypes parentaux ont pu être établis, un typage exhaustif et de haute résolution des gènes *HLA* de classe I et de classe II est requis pour s'assurer du maximum de compatibilité *HLA* entre le donneur et le receveur (idéalement 10/10; *i.e.* *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DR*, *HLA-DQ* sur les deux allèles en raison de la codominance qui fait que tous les gènes sont exprimés).
 - certaines pathologies dans lesquelles une liaison ou une association *HLA*-maladie est décrite. Dans ce cas, le typage *HLA* est ciblé sur le locus *HLA* incriminé.

Épreuves de compatibilité tissulaire

La décision de transplantation met en œuvre des examens d'urgence visant à garantir la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur. La préexistence chez le receveur d'anticorps anti-*HLA* spécifiques des molécules *HLA* du donneur entraîne un risque de rejet hyperaigu (cytotoxicité dépendant du complément). Ces anticorps peuvent résulter d'une grossesse, d'une transfusion sanguine ou d'une première transplantation avec un donneur non *HLA* identique.

Le *cross-match* lymphocytaire est une épreuve de compatibilité ultime. Toute transplantation devient contre-indiquée lorsque n'importe lequel des sérums historiques du receveur produit une réaction positive en présence des lymphocytes ganglionnaires ou spléniques du donneur potentiel. Le *cross-match* en cytométrie en flux (CMF) est plus sensible et très fortement recommandé en prégreffe rénale avec donneur vivant.

Étude du chimérisme donneur–receveur après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'analyse du chimérisme chez les patients allogreffés consiste à quantifier la part relative des cellules du donneur et du receveur au sein des populations cellulaires du sang périphérique ou de la moelle osseuse. Le chimérisme est qualifié de : total quand seules les cellules du donneur sont détectées chez le receveur ; partiel ou mixte quand des cellules du donneur et du receveur sont présentes de façon concomitante au sein de l'échantillon étudié ; absent en cas d'absence totale de cellules du donneur.

Le principe d'analyse du chimérisme hématopoïétique consiste à utiliser des marqueurs génétiques informatifs propres au donneur et au receveur. L'étude du chimérisme est réalisée dans les premiers mois post-greffe pour rechercher la prise du greffon ou le rejet de greffe, puis de façon plus espacée pour détecter la rechute et évaluer la maladie résiduelle en l'absence de marqueurs hématologiques classiques.

L'analyse est fondée sur les marqueurs génétiques du polymorphisme humain de type microsatellites ou STR (courtes séquences répétées, *Short Tandem Repeats*) ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). La première étape est la caractérisation des marqueurs génétiques spécifiques du donneur et du receveur les plus informatifs. L'examen du chimérisme lui-même quantifie les marqueurs donneurs-spécifiques sélectionnés par amplification quantitative qPCR.

Tétramères CMH-peptides

La reconnaissance des antigènes peptidiques par les lymphocytes T repose sur leur présentation restreinte par des molécules du CMH. Le développement de molécules CMH recombinantes chargées en peptides, constituant des ligands spécifiques de TCR, permet d'identifier la fréquence de lymphocytes T spécifiques de l'antigène peptidique au sein d'une population lymphocytaire

hétérogène. Cette technologie a essentiellement été développée chez l'homme. En pratique, des molécules CMH de classe I recombinantes, correspondant aux allèles les plus fréquemment exprimés, sont biotinylées et chargées du peptide cible. Ce complexe est marqué par de la streptavidine conjuguée à un fluorochrome. La fixation

des tétramères streptavidine-CMH-peptide aux lymphocytes T spécifiques du peptide antigène est mesurée par la fluorescence cellulaire en cytométrie en flux. Le système se développe aussi pour des peptides restreints par les produits de classe II. Il est applicable à des expérimentations animales.