

Présentation antigénique et système HLA = complexe majeur d'histocompatibilité

Plan du cours

I. Organisation génétique du système HLA.....	2
A. Chromosome 6p21.3.....	2
B. Cartographie.....	2
1) CMH-I.....	2
2) CMH-II.....	3
3) CMH-III.....	4
C. Transmission et polymorphisme.....	4
1) Le polymorphisme allélique.....	4
2) 2ème cause de polymorphisme : l'haplotype = les combinaisons alléliques.....	5
3) 3ème source de diversité : transmission co-dominante en bloc.....	6
4) Déséquilibre de liaison.....	6
D. Nomenclature.....	7
II. Structure générale, Expression et Biosynthèse.....	8
A. Structure générale.....	8
B. Expression.....	10
C. Biosynthèse.....	11
1) CMH-I.....	11
2) CMH-II.....	12
III- Applications pratiques.....	13
A. Le typage HLA.....	13
1) Analyse sérologique.....	13
2) Biologie moléculaire.....	14
a) CMH-I.....	14
b) CMH-II.....	14
3) Typage HLA et pathologies.....	15
B. Allo-immunisation.....	16
C. Greffe.....	16
Conclusion :.....	17

Fait intervenir les lymphocytes T et la reconnaissance par ces lymphocytes T d'un complexe particulier : le système HLA qui est chargé de la présentation antigénique
HLA = Human Leucocyte Antigen

Le système HLA fait intervenir **la réponse immunitaire spécifique** qui se distingue de la réponse immunitaire innée par différents critères, elle nécessite :

1. Délai de réponse relativement lent : va mettre **plusieurs jours** à se mettre en place (contre quelques minutes pour le système inné)
2. Fait intervenir particulièrement un type de cellules : les **lymphocytes T** qui sont capables de reconnaître un antigène spécifique qui n'est pas libre, pas dans la nature, il doit être présenté par des cellules particulières et par un complexe protéique particulier : **HLA = CMH de l'Homme** (CMH = Complexe Majeur d'Histocompatibilité)
3. On va distinguer 2 types de présentation antigénique puisque sous la rubrique de CMH ou d'HLA il existe en fait 2 systèmes très proches mais relativement distincts avec des fonctionnalités différentes :

– **LT CD8+** qui reconnaissent un CMH particulier = **CMH de classe 1** qui est présent à la surface de **toutes les cellules** de l'organisme

– **LT CD4+** qui reconnaissent le 2^{ème} groupe du CMH = **CMH de classe 2** qui n'est pas présent à la surface de toutes les cellules mais est présent sur certains partenaires cellulaires spécifiques que sont les **cellules présentatrices d'antigènes (CPA)**
Trois types de cellules possèdent constitutionnellement des capacités de CPA :
les cellules dendritiques (CD), les macrophages et les lymphocytes B

=> Donc 2 grands groupes : CMH-I et CMH-II, avec 2 fonctionnalités différentes, ne sont pas exprimés par les mêmes cellules et ne sont pas reconnus par les mêmes cellules

La découverte du système CMH est liée à la découverte du phénomène de rejet de greffe, et non à la fonction principale du CMH qui est de présenter l'antigène. Prix Nobel français : Jean Dausset

I. Organisation génétique du système HLA

A. Chromosome 6p21.3

Le système HLA est présent chez l'Homme sur le bras court p du chr 6, position **6p21.3**

Il s'agit d'un **super locus** donc une région très importante qui fait 4 millions de bases = 1 millième de l'ensemble du génome humain.

Sur le super locus on va retrouver 200 gènes et pseudogènes.

Il existe 80 gènes fonctionnels (tout le reste c'est des pseudogènes), dont 40 ont des propriétés de présentation antigénique et vont coder pour des molécules HLA ou CMH.

L'organisation du CMH est constante entre les espèces, et ceci traduit un rôle fondamental du CMH pour la vie.

B. Cartographie



On va détailler ce super locus. Si on part de la partie télomérique donc tout à droite, on peut distinguer ce super locus en 3 zones :

- CMH de classe 1 ; partie télomérique
- CMH de classe 2 à gauche donc dans la partie centromérique, centrale ; et
- CMH de classe 3 au milieu

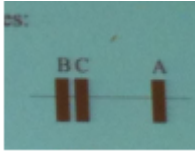
1) CMH-I

Le CMH-I occupe la moitié du superlocus : 2 mégabases (Mb).

On y retrouve une 20^{aine} de gènes et pseudogènes.

Ces gènes et pseudogènes sont regroupés en 3 grandes familles :

- Gènes HLA I classiques (1a)** (ceux qu'on détaillera pour la suite du cours)
Il y en a 3 qui sont à noter et qui sont dans l'ordre suivant : **B,C,A** (**à retenir**)



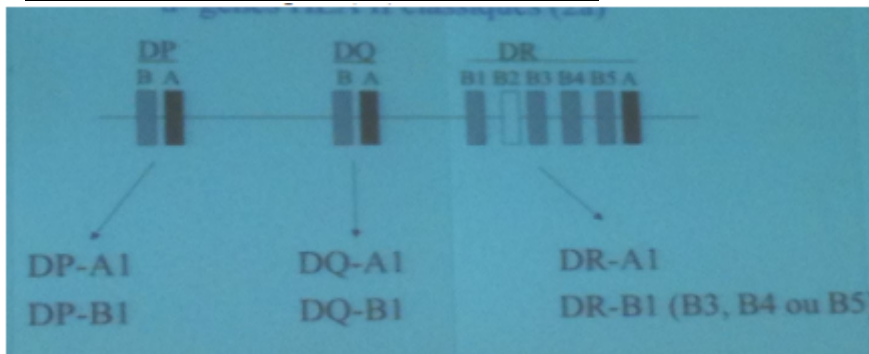
b. Gènes HLA 1 non classiques (1b) On va retrouver des systèmes HLA-E, -F, -G, le système MIC, ils ont une expression particulière restreinte à certains types cellulaires, et en particulier au niveau du fœtus : ce système HLA non classique participe à la tolérance materno-fœtale.

c. Gènes non HLA hébergés dans cette région, en particulier le gène de l'hémochromatose : gène HFE. L'hémochromatose est une maladie pour laquelle on a une accumulation de fer dans l'organisme liée à une mutation de ce gène.

2) CMH-II

Le CMH-II est une région de 1 mégabase (Mb) Il y a une 20aine de gènes et pseudogènes On a la même organisation où on distingue :

a. Gènes CMH-II classiques (2a) : DP, DQ, DR



Ces gènes sont en double, on a un gène α A (DP-A1) et un gène β B (DP-B1), chaque gène codant pour 1 protéine : la protéine α et la protéine β , et ces 2 protéines vont s'associer pour former la molécule HLA de classe 2.

Pour DP et DQ c'est relativement simple, il y a 2 molécules :

- 1 gène qui va coder pour la chaîne α : DP-A1 ou DQ-A1
- 1 gène qui va coder pour la chaîne β : DP-B1 ou DQ-B1

Pour DR c'est un petit peu plus compliqué :

- on a le gène qui va coder pour la chaîne α : DR-A1
- pour la chaîne β il y a plusieurs gènes :
 - DR-B1 qui codera pour la chaîne β 1, cette chaîne β 1 est toujours exprimée.
 - le gène β 2 est un pseudogène qui n'est jamais exprimé.
 - pour B3, B4 ou B5 l'expression est facultative (B1 peut être associé avec B3, B4 ou B5) et exclusive (si on a B3, on n'a pas B4 ou B5).

b. Gènes CMH-II non classiques (2b) : DN et DO, qui sont relativement peu explorés

- c. Gènes non CMH, mais qui vont être impliqués dans le traitement intracellulaire de l'antigène, qui sont indispensables pour que l'antigène aille se placer au niveau des molécules du CMH :
- gènes TAP1, TAP2 (Transporter Associated with Antigen Processing) : molécules de transport
 - gènes LMP2, LMP7 (Low Molecular weight Proteins) : molécules du protéasome
 - gènes DMA, DMB : impliqués dans la maturation des peptides qui s'insèrent dans le CMH
 - (et COL)

3) Le CMH-III

Le CMH-III est une région de 1 mégabase (Mb) Il y a 30 gènes et pseudogènes Il n'y a pas de molécules présentatrices d'antigène dans la région du CMH-III Mais par contre on va y distinguer :

- a. des gènes impliqués dans la fonction immunitaire, en particulier au niveau du complément : pour la voie classique les fractions C2 et C4, et pour la voie alternative le facteur B, également des cytokines : TNF (Tumor Necrosis Factor)
- b. des gènes « hébergés » codant pour : la protéine 21-hydroxylase, et des protéines de stress : HSP (Heat Shock Proteins)



C. Transmission et polymorphisme

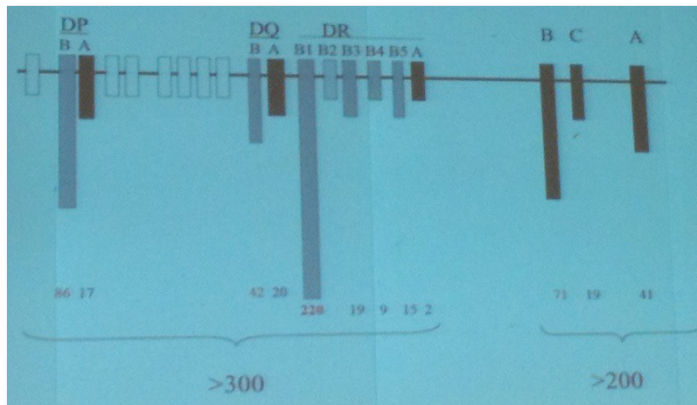
Le système HLA est le système le plus polymorphe de l'organisme, et il y a au moins 3 facteurs qui vont concourir au polymorphisme du système HLA :

1. La 1ère cause de polymorphisme du système HLA est la présence de gènes multialléliques, de polymorphisme allélique très important.
2. 2ème cause de polymorphisme : la présence de combinaisons alléliques importantes = l'haplotype (mot à retenir)
3. 3ème cause : le mode de transmission : co-dominante et en bloc

1) Le polymorphisme allélique

Définition : on définit un allèle quand on distingue plus de 1% de différence entre 2 individus pour un même locus, un même gène

Il existe pour l'espèce humaine de très nombreux allèles pour les gènes HLA :

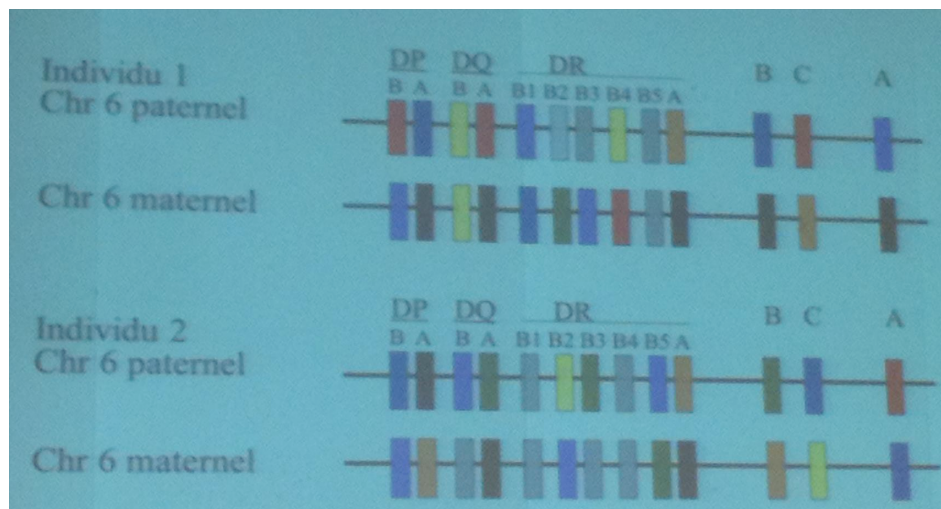


Pour HLA-I : B C A : il y a plus de 200 allèles différents qui se répartissent surtout au niveau du gène B, et également de façon moindre pour C et A.

Pour HLA-II : le polymorphisme touche surtout le gène β B1, un peu moins le gène α A, et on a plus de 300 à 400 allèles différents pour ces différents gènes HLA-II.

Retenir qu'il y a un polymorphisme important.

2) 2^{ème} cause de polymorphisme : l'haplotype = les combinaisons alléliques



Un individu a 2 chromosomes : 1 chromosome (chr) paternel et 1 chr maternel

Pour chaque gène DP, DQ, DR, B, C, A, on a un allèle particulier qu'on va apporter par notre père ou notre mère, et pour chaque chr, la combinaison DP, DQ, DR, B, C, et A, va définir un haplotype et celui-ci nous sera propre.

Vu le nombre d'allèles très important, on a un effet des combinaisons qui sont relativement importantes et à l'échelle de l'humanité il existe plus de 10^{10} combinaisons différentes.

Donc le nombre de combinaisons possibles pour un individu, son haplotype, est de 10^{10} .

Donc la probabilité pour 2 individus qui ne sont pas issus de la même fratrie d'avoir exactement le même système HLA est quasiment nulle.

C'est l'une des raisons pour lesquelles en greffes, pour lesquelles on a besoin d'avoir un système HLA le plus compatible possible, on fait des requêtes à l'échelle mondiale pour essayer de s'approcher d'un haplotype quasi identique, ce qui n'arrive quasiment jamais, c'est le seul moyen pour espérer avoir un haplotype qui est à peu près équivalent à l'haplotype du receveur. La combinaison allélique des différents gènes HLA définit un haplotype qui va être particulier pour chaque chromosome.

La probabilité est supérieure à 10^{10} pour avoir des haplotypes équivalents entre 2 individus.

3) 3^{ème} source de diversité : transmission co-dominante en bloc

Transmission co-dominante : ça signifie que les gènes présents sur le chromosome du père sont exprimés, mais également que ceux présents sur le chromosome de la mère sont exprimés, donc les gènes du père et de la mère sont exprimés.

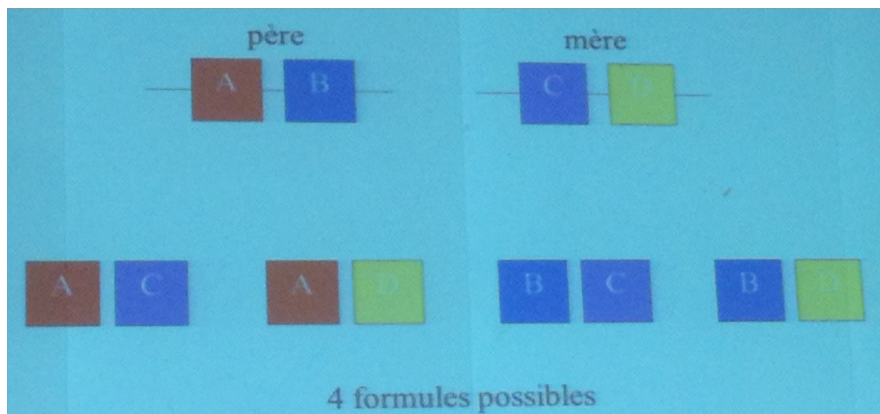
Transmission en bloc : les gènes de 98% des cas, il y a un père et une mère, les gènes HLA de classes 1 et 2 sont transmis en bloc, c'est-à-dire qu'ils sont transmis ensemble sans recombinaison chromosomique, il n'y a pas de crossing-over chromosomique.

Il va y avoir une recombinaison de l'haplotype du père avec l'haplotype

recombinaisons sont les suivantes :

otype A et un haplotype B,
et l'haplotype D qui est

de la mère, les différentes



Si on doit greffer quelqu'un, le meilleur moyen pour greffer c'est d'essayer d'avoir un système HLA compatible, donc on va rechercher en priorité dans la famille.

Si on fait entre un enfant et ses parents, quelle est la probabilité, compte-tenu du système de transmission, d'avoir les mêmes haplotypes chez l'enfant par rapport à ses parents ?

Compte-tenu de cette recombinaison, la probabilité d'avoir le même système HLA entre un enfant et ses parents est de 1 chance sur 10^5 , donc ça ne sert à rien d'aller chercher chez les parents.

Par contre au sein de la fratrie, la probabilité d'avoir le même haplotype est de 1 chance sur 4, et si on a des jumeaux homozygotes (1 naissance sur 500), c'est 100%.

4) Déséquilibre de liaison

Si on est statisticien (statistiques), on a différents gènes qui sont associés les uns aux autres, et si normalement les gènes n'étaient pas liés entre eux, statistiquement on devrait avoir un brassage homogène de l'ensemble des gènes HLA au niveau de la population.

Mais quand on a commencé à étudier les gènes HLA, soit de façon unique en s'intéressant seulement à un gène, ou en regardant plusieurs gènes associés, on s'est aperçu que la distribution des gènes HLA n'était pas homogène au sein de la population, et que généralement il y a des associations de gènes qui sont observées.

Exemple : association entre les gènes HLA-A1 et B8 :

Si on reprend la probabilité de chaque gène : pour HLA-A1 c'est 16% de la population, et pour HLA-B8 c'est 9% de la population

HLA-A1 et B8 : théorie ($0,16 \times 0,09 = 1,4\%$) réalité 8,8%

Donc statistiquement si les deux gènes étaient totalement indépendants on devrait les retrouver sur à peu près 1% de la population

Dans la vraie vie, quand on regarde en Europe l'association des 2, HLA-A1 et B8, on observe que la prévalence est beaucoup plus élevée, elle est de 8,8%

Autres déséquilibres de liaisons fréquemment retrouvés :

HLA-B7, -DR2

HLA-B8, -DR3

HLA-DR2, DQ1

HLA-DR4, DQ3

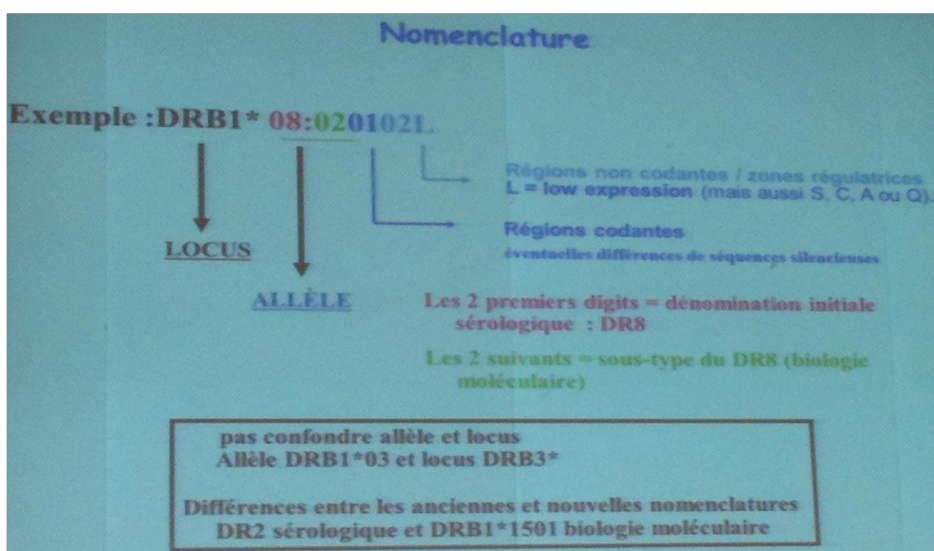
Il existe d'autres associations qui sont également importantes, et l'origine de ces associations est qu'on a un biais de sélection puisque l'association HLA-A1 et B8 va nous aider et va nous protéger contre certains agents pathogènes, et donc au cours de l'évolution les personnes qui ont cette association A1 et B8 vont mieux répondre à ce pathogène, et in fine ne vont pas mourir donc ils auront une descendance, et on va retrouver au fil des générations une augmentation de cette association.

Donc ce déséquilibre de liaison présente un avantage : une réponse accrue aux infections.

A l'inverse dans certains cas certaines associations peuvent être un désavantage : peut donner des maladies auto-immunes, et, dans ces cas-là, la probabilité d'avoir cette association va être réduite puisque ça va conduire à certaines pathologies délétères.

La nomenclature du système HLA a été révisée en 2010

D. Nomenclature



Au niveau de la classification, on va décrire en 1^{er} le nom du gène, le locus : DRB1.

Ensuite on va indiquer les numéros qui définissent la famille allélique : d'un point de vue technologique, il y a 2 grands systèmes de technologie :

- les systèmes qui utilisent des anticorps, c'est les 1^{ers} systèmes utilisés qui s'appellent les systèmes sérologiques

- et puis on a gagné en sensibilité, on utilise depuis les systèmes de biologie moléculaire

Les 2 premiers digits = dénomination initiale sérologique : ici 08 qu'on appelait avant DR8

Et puis on note ensuite le sous-type de DR8 donc les variants alléliques

Et lorsqu'il y a une technologie de biologie moléculaire on va rajouter le petit astérisque en haut * qui permet d'indiquer qu'on a utilisé une technologie de biologie moléculaire pour identifier l'allèle du système HLA.

Après, on peut rajouter des informations pour savoir si la mutation, polymorphisme, est liée à une région codante, généralement dans l'exon 2, ou à des régions non codantes qui vont agir sur le niveau d'expression généralement de la molécule HLA.

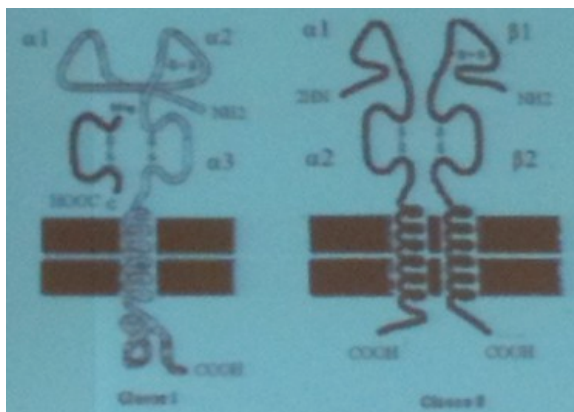
Ne pas confondre allèle et locus :

Locus = la région du gène : B, C ou A pour HLA-I ; DQA, DQB pour le gène de classe 2

Allèle : polymorphisme : ce polymorphisme a une classification très particulière qui tient à la fois de la sérologie et puis maintenant de la biologie moléculaire, et cette biologie moléculaire est capable de distinguer entre les régions codantes et non codantes.

II. Structure générale, Expression et Biosynthèse

A. Structure générale



Sur l'image, le complexe HLA de classe 1 est à gauche, celui de classe 2 à droite.

Pour le complexe **HLA de classe 1** (abrégé HLA-I ou CMH-I), les gènes **A, B et C du chromosome 6** codent pour la **grande chaîne α** (partie claire sur l'image) qui s'associe avec une petite chaîne appelée **microglobuline β2** (partie noire) codée par le **chromosome 15**.

Pour le complexe **HLA de classe 2**, on a une **chaîne α** (codée par le gène DPA par exemple) et une **chaîne β** (codée par le gène DPB par exemple).

Points communs entre les 2 grands types: ce sont des **glycoprotéines transmembranaires**, des **hétérodimères** (association de 2 mlc différentes) liés par des **liaisons non covalentes**,

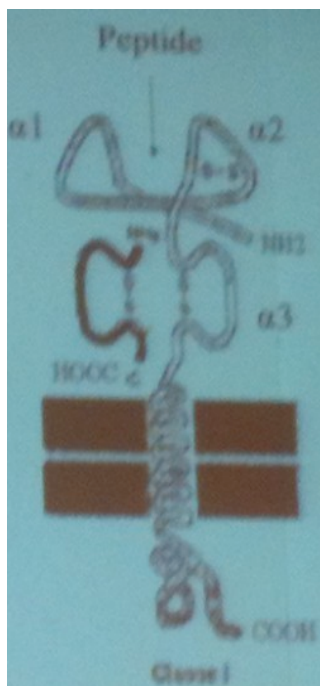
l'appariement des 2 dimères définit **un sillon médian qui sert à accueillir l'Ag** qui se fixe de façon **non covalente** (HLA-II a une disposition plus ouverte que HLA-I)

Différences (important, les questions types pour l'examen tombent souvent là-dessus, et aussi pour l'ECN):

-CMH-I est codé par les chromosomes 6 et 15.

La taille de la chaîne α est de 44 kDa, celle de la β 2 est de 12 kDa (leur association est non covalente), au sein de la chaîne α on distingue une région extramembranaire où se trouvent des domaines α 1, α 2, et α 3; une région transmembranaire et une courte portion intracytoplasmique.

La majeure partie de la variabilité allélique se situe au niveau des domaines α 1 et α 2 ce qui est compréhensible car ce sont les domaines impliqués dans l'accueil de l'Ag. La portion constante a peu de polymorphisme, la β 2 microglobuline se lie de façon non covalente avec le domaine α 3 qui est également capable de lier la mlc CD8 des lymphocytes T.



Gènes principaux	HLA-A, B et C β 2 microglobuline (chr 15)
Chaînes	α : 44kDa β 2 microglobuline 12kDa
Liaison	Non covalente
Régions et domaines	Extramembranaire : 3 domaines α 1, α 2, et α 3 (90aa) Transmembranaire Intracytoplasmique
Partie extramembranaire -Variable -Constante	- α 1 et 2 (25% variabilité allélique) - α 3 lie β 2 microglobuline et CD8 du LT

-CMH-II: les gènes DP, DQ et DR codent pour les 2 chaînes: la chaîne α fait 32kDa et est codée par les gènes DPA, DQA et DRA; la chaîne β fait 29 kDa et est codée par DPB, DRB, DQB1 (et éventuellement B3, B4 ou B5).

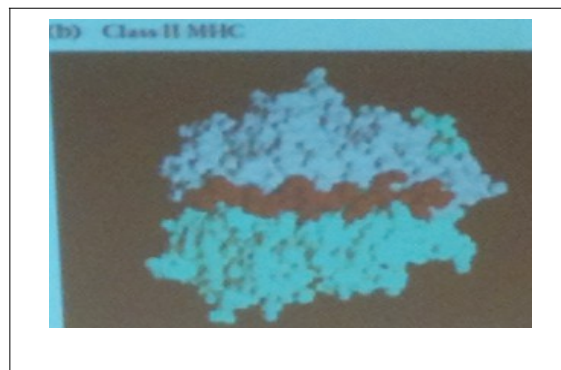
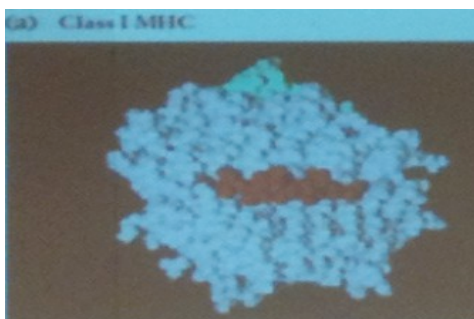
Les 2 chaînes ont une structure relativement voisine et sont liées de façon non covalente. Chacune a une chaîne distale (α 1 ou β 1) qui est destinée à l'accueil de l'Ag; une zone constante (α 2 ou β 2), une zone transmembranaire et une portion intracytoplasmique.

L'interaction entre la mlc CD4 du LT et le CMH2 se fait au niveau du domaine constant de la chaîne β (cad β 2).

Gènes principaux	HLA-DP,DQ et DR (Aet B)
chaines	alpha:32kDa (DPA, DRA, DQA)
Liaison	non covalente
domaines	extramembranaire alpha, 2 domaines (90aa) beta, idem transmembranaire intracytoplasmique (courte)
partie extraMb	
variable	alpha 1 et beta 1
constante	alpha 2 et beta 2 interaction beta 2 avec CD4 du LT

B. Expression

L'expression des gènes du CMH va dépendre de **sa classe, du type de cellules et de facteurs extérieurs qui vont influencer les mlc du CMH, en particulier les cytokines inflammatoires.**



***CMH-I: toutes les cellules de l'organisme l'expriment(sauf les os, le cartilage et le SNC) mais il y a des variations entre les différentes cellules de l'organisme au niveau de la **densité** (l'abondance) des molécules du CMH-I:**

- Elle est très élevée (10^5 mlc/cellule) dans les cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes(dans le sang), cellules dendritiques).
- Elle est intermédiaire (10^4 mlc/cellule) dans les cellules épithéliales et endothéliales.
- Elle est très faible au niveau du pancréas, des glandes salivaires, du foie (hépatocytes), de la cornée et des hématies.
- Elle est nulle au niveau du cerveau (du SNC), du cartilage et des os (en gros CMH-I n'y est pas exprimé).

L'expression augmente fortement en contexte inflammatoire (les cytokines inflammatoires augmentent l'expression du CMH-I et du CMH-II).

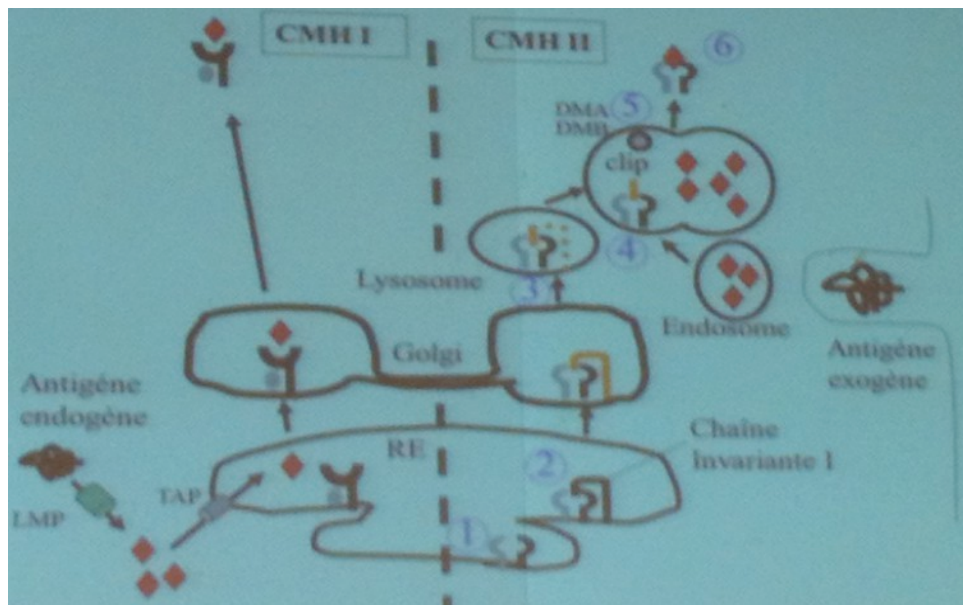
Le peptide (l'Ag)(en rouge) qui s'insère au niveau du CMH-I est petit (9aa), est **intracellulaire** dans le sens où il est produit par la cellule. Sur une cellule normale, il dérive de protéines normales (dérivées du "soi"), sur une cellule infectée par un virus ou transformée par processus de cancérogenèse, il y aura des peptides viraux ou tumoraux dans le CMH-I.

***CMH-II:** L'expression est **limitée** (sans activation) à la surface des **cellules présentatrices d'Ag** (cad les **cellules dendritiques**, les **macrophages**(= les monocytes mais dans les tissus) et les **lymphocytes B**); après l'activation des cellules, on retrouve le CMH-II sur des **cellules épithéliales**, **endothéliales** et sur certains lymphocytes T (**LT activés**).

Le peptide qui s'insère au niveau de CMH-II fait 13 à 18 aa (en moyenne 15) et est d'origine **extracellulaire** (les cellules présentatrices **phagocytent des Ag extérieurs** (parasites, bactéries...)).

C. Biosynthèse

Il y a 2 grands systèmes de biosynthèse ayant des peptides d'origines différentes. **L'expression à la surface des cellules des mlc du CMH-I et du CMH-II est liée à l'enchâssement d'un peptide dans ces mlc** (ainsi, quasi aucune mlc de CMH est vide à la surface des cellules).



1) CMH-I

Les peptides présentés sont **endogènes** et sont issus de protéines synthétisées dans le cytosol. Ces protéines cytosoliques proviennent **du soi** (des protéines dégradées ou en fin de vie) ou du **non soi** (protéines générées dans une cellule maligne ou infectée par un virus).

Les protéines cytosoliques rentrent dans le **protéasome**, un système de dégradation des peptides (une sorte de système de tri sélectif) faisant intervenir différentes protéines et en particulier la **protéine LMP** (low molecular weight protein, codée par les gènes LMP2 et LMP7) **qui dégrade ces protéines cytosoliques en petits peptides**.

Ces peptides sont pour la plupart dégradés à nouveau mais 1/1000 gagnent à la place le **réticulum endoplasmique** (le RE) par le système de transport des mlc **TAP1 et TAP2** (les gènes

TAP1, TAP2, LMP2 et LMP7 sont hébergés parmi les gènes de CMH-II) qui les font passer du cytosol vers le RE. (TAP= transporters associated with antigen processing)

Dans le RE, le peptide est capable de s'enchâsser dans **le sillon de la chaîne α du CMH-I, l'ensemble forme un complexe stable avec la β 2 microglobuline**, le complexe se dirige dans l'appareil de Golgi pour subir une glycosylation et peut ensuite migrer à la surface de la cellule.

Ce processus est favorisé par les **cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'interféron γ qui agit à plusieurs niveaux**: il augmente la fixation du peptide dans le complexe et l'expression de la chaîne α du CMH-I.

Pour une cellule (par exemple un leucocyte où se trouve 10^5 mlc (ou récepteurs) du CMH-I), **la majorité de ces récepteurs sont constitués de peptides du soi. Il faut que plus de 50 récepteurs expriment des peptides viraux ou tumoraux pour que la cellule soit reconnue par le système immunitaire (via les LTCD8).**

2) CMH-II

L'Ag présenté est exogène, il provient de la phagocytose.

6 étapes

- 1) Les 2 chaînes α et β CMH-II sont synthétisées dans le **RE puis**
- 2) **l'hétérodimère (toujours dans le RE) va s'associer avec une protéine invariante appelée "I" qui s'enroule à la manière d'un serpent autour de l'hétéro chromatine, ce qui empêche l'incorporation d'un peptide endogène en obstruant le sillon de présentation de l'Ag et qui stabilise le complexe des 2 chaînes.**
- 3) **Le complexe stabilisé peut alors migrer dans l'appareil de Golgi puis dans un lysosome et pendant cette migration, la chaîne invariante est progressivement dégradée** et au final il n'en reste qu'un petit peptide situé entre les 2 chaînes appelé le **"clip"** qui bloque encore l'enchâssement d'Ag.
- 4) **En parallèle à cette synthèse, un processus d'endocytose capte des Ag exogènes (bactéries, parasites, champignons...) au niveau de l'endosome où l'action des protéases et du pH acide provoque la dégradation de ces Ag.**
- 5) **Puis il y a fusions des lysosomes contenant le CMH-II couplé au peptide clip avec les endosomes composés de peptides issus des Ag exogènes. Dans la vésicule de fusion, le clip est remplacé par les peptides d'origine exogène, puis**
- 6) **le complexe CMH-II associé au peptide exogène peut migrer à la surface de la cellule.**

III- Applications pratiques

En terme d'applications pratiques, on va voir le typage HLA. On l'a vu dans la classification : il y a 2 grands systèmes de typage HLA. Il y a un typage qui repose sur une analyse sérologique et un autre qui repose sur la biologie moléculaire. Puis on verra les 2 grandes applications de l'étude du système HLA que sont l'allo-immunisation et la greffe.

A. LetypageHLA

1) Analyse sérologique

Elle repose sur une technique relativement ancienne qui s'appelle la microlymphocytotoxicité (technique de référence) dont on va détailler le principe. Elle va être dépendante du complément.

Dans un premier temps, il va falloir choisir la cellule que l'on veut étudier : le plus pratique, c'est d'utiliser des cellules sanguines qui expriment fortement les molécules HLA. On va prendre soit des cellules qui expriment surtout des molécules HLA-II, dans ce cas, on utilisera préférentiellement des lymphocytes B (20% des leucocytes du sang) ; soit des molécules HLA-I, on utilisera préférentiellement des lymphocytes T.

Principe :

-1ère étape : on va purifier des lymphocytes B ou T. Dans l'exemple, on a des lymphocytes T et on va rechercher les allèles de HLA-I.

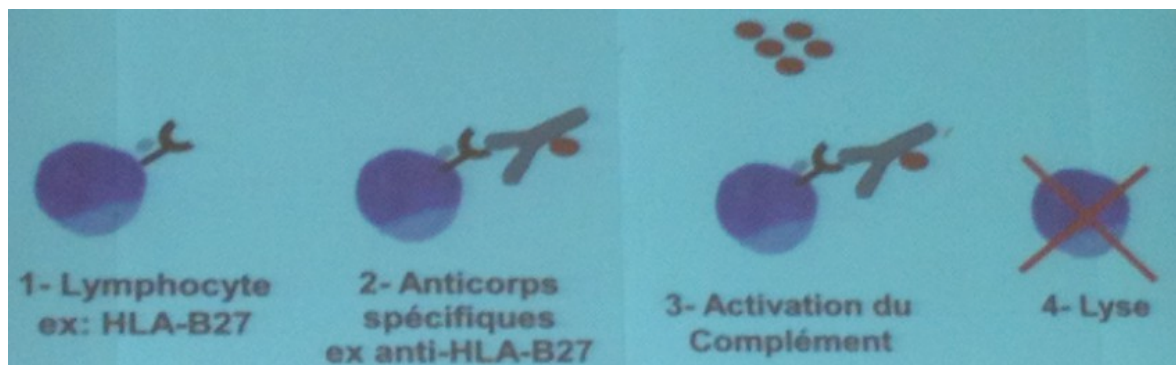
-2ème étape : mise en contact avec des anticorps mono-clonaux. Il y a un très grand nombre d'allèles, en pratique, on utilise un large panel d'Ac qui va couvrir un grand nombre d'allèles. On a des combinaisons d'Ac ce qui va nous permettre d'éliminer certains allèles. Quand on a une combinaison d'Ac qui va être positive, on va décomposer de manière individuelle chacun des Ac. On va utiliser dans l'exemple un Ac anti HLA-B27. L'Ac va se fixer sur les lymphocytes.

-3ème étape : révélation de la fixation. Pour révéler cette fixation, on va utiliser le système du complément : un Ac qui se fixe sur son antigène va modifier sa structure pour accueillir les molécules du complément, ce qui va aboutir à l'activation du complément et ensuite à la lyse des LB ou LT. Le complément utilisé est du complément de lapin.

-4ème étape : pour visualiser la lyse des cellules, on utilise un colorant vital :

-si les cellules sont colorées, c'est qu'elles sont mortes ; et

-si elles sont non colorées, c'est qu'elles n'ont pas incorporé le colorant vital.

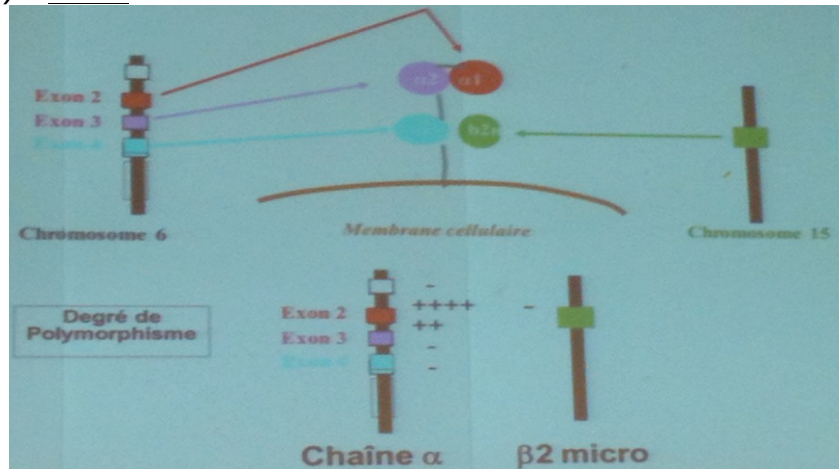


Cette technique est encore utilisée, mais de moins en moins.

2) Biologie moléculaire

Autrement on utilise des techniques de biologie moléculaire pour regarder le polymorphisme des régions HLA.

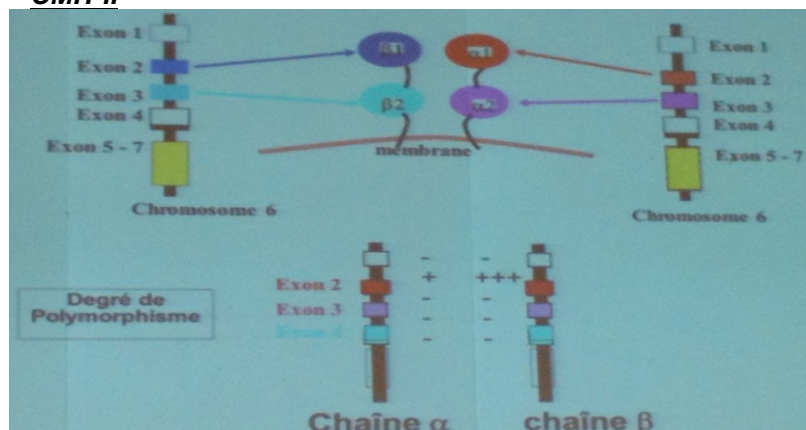
a) CMH-I



Ici, on est sur le CMH-I. Au niveau du chromosome 6 (gènes A, B et C), on a plusieurs exons. L'exon 2 code pour le domaine variable $\alpha 1$, l'exon 3 pour le domaine variable $\alpha 2$ et l'exon 4 pour le domaine variable $\alpha 3$. La $\beta 2$ microglobuline est codée par le chromosome 15. Les polymorphismes pour le système HLA sont concentrés au niveau des exons 2 et 3 ($\alpha 1$ et $\alpha 2$). En pratique, on va utiliser des sondes nucléiques qui sont en 1ère intention situées au niveau des zones polymorphes au niveau des exons 2 et 3.

Dans certains cas très particuliers, lors d'une situation de greffe (greffe multiple), on peut être amené à séquencer l'ensemble de l'allèle pour rechercher les polymorphismes dans les régions codantes et non codantes.

b) CMH-II



L'exon 2 code pour la chaîne $\beta 1$ ou $\alpha 1$, l'exon 3 pour le domaine $\alpha 2$ ou $\beta 2$. Le polymorphisme est surtout présent sur la chaîne β , et en particulier au niveau de l'exon 2. On va utiliser préférentiellement des nucléotides qui vont cibler l'exon 2, voire 3. Dans certains cas là encore, on peut être amené à séquencer l'ensemble.

3) Typage HLA et pathologies

Intérêts du système HLA :

-pour le diagnostic : intérêt relatif ; il existe un lien entre le système HLA et différentes pathologies (pour une quarantaine de maladies).

On définit le risque relatif (RR)= c'est le risque de développer une pathologie lorsqu'on possède un antigène HLA donné par rapport à un individu qui ne possède pas cet antigène HLA.

L'exemple le plus connu est le cas de l'Ag HLA B27+ (6 à 10% de la population, relativement fréquent). Le RR est de 87 d'avoir une spondylarthrite ankylosante : on a 90 fois plus de chances de développer cette pathologie quand on a l'Ag HLA B27. Moins de 0,1% (1/1000) de la population va développer une spondylarthrite ankylosante ; et parmi ceux-là, 90% possèdent cet Ag.

Question du prof :

« En pratique, est-ce que vous recherchez cet Ag HLA B27 dans toute la population ou uniquement chez les patients chez lesquels vous suspectez une spondylarthrite ankylosante ? »

Réponse : on restreint la recherche chez les patients dont on suspecte qu'ils ont une spondylarthrite ankylosante. Mais cela a un intérêt prédictif fort : prédictif positif mais aussi prédictif négatif.

Il existe d'autres associations généralement moins fortes :

- dans le Psoriasis, HLA Cw6 (RR=13)
- DR3 et DR4 dans le diabète
- DRB1 dans la polyarthrite rhumatoïde (facteur de mauvais pronostic)
- Association de DR3-DR7 (RR=60) dans la maladie coeliaque
- Hémochromatose en gène HFE (association avec HLA-A3, du fait d'un déséquilibre de liaison).

B. Allo-immunisation

On va rechercher chez le receveur des Ac anti-HLA. On va faire cette recherche avant la 1^{ère} greffe, et éventuellement après les 2^{ndes} greffes, car il y a différents processus pour lesquels on peut retrouver des Ac anti-HLA.

Ex : femmes multipares et également chez les personnes qui ont eu de multiples transfusions sanguines. Il est indispensable de rechercher ces Ac anti-HLA avant la greffe. Sinon, dans les 2 à 3 jours, on va avoir une destruction totale de notre implant et cela peut même mettre en jeu le pronostic vital du receveur.

On utilise les tests de microlymphocytotoxicité : le but est de rechercher dans le sérum du malade des Ac anti-HLA.

On va utiliser 2 sources de cellules qui possèdent ces molécules HLA :

- soit des lignées cellulaires possédant un CMH connu, avant d'avoir trouvé le donneur ; et
- au moment où on a trouvé le donneur, on utilise les LT du donneur qu'on va placer en présence du sérum du receveur

Une réaction positive, soit sur l'allo-immunisation, soit sur le Cross Match (greffe) va faire rejeter la greffe.

C. Transplantations

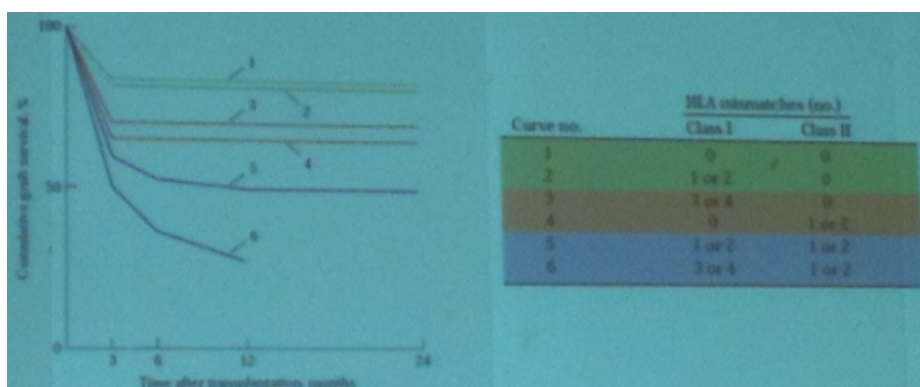
1/ Donc en pratique le bilan pré-greffe consiste à réaliser un typage HLA du donneur et du receveur avec 2 déterminations indépendantes en double et en aveugle, pour éviter les faux positifs.

2/ Chez le receveur on va rechercher la présence d'Ac anti-HLA, on recherche une allo-immunisation (lignée LT de CMH connu).

3/ Juste avant la greffe, on utilise un cross-match : on met en présence le sérum du receveur avec les LT du donneur. Si le cross match est positif, c'est une contre-indication absolue à la greffe. On sait qu'elle va être négative et qu'elle peut être dramatique pour le patient.

Dans le cas d'une greffe rénale, le fait d'apporter un greffon à un receveur, va apporter un système HLA différent chez celui-ci. Il va développer des Ac anti-HLA contre le greffon. Lorsqu'on réalise une greffe, avec un système HLA partiellement compatible, ces Ac anti-HLA vont reconnaître le greffon et le risque est une destruction du greffon.

Données historiques (avant les immunosuppresseurs) :



Courbes ayant été réalisées pour des patients ayant subi une greffe rénale. On va comparer la compatibilité et la destruction du greffon.

Plus la compatibilité est éloignée pour les systèmes HLA, plus le risque de développer des Ac anti HLA est importante. Le fait d'avoir des variations (1 ou 2 différences) qui vont toucher le système HLA-I (vert) ont peu d'impact, peu de rejets de greffe. Dans le cas de greffes familiales, on a peu de rejets de greffe.

Quand on a 3 à 4 allèles de différence pour l'HLA de classe 1 (orange), on va augmenter le risque de perte du greffon, cela équivaut à 1 ou 2 allèles de différence (qu'on appelle des Mis Match) pour le système HLA de classe 2.

Quand on a des différences alléliques qui touchent à la fois HLA-I et II, la probabilité de développer des Ac anti-HLA augmente et on voit que cet effet (rejet de greffe et développement Ac) est surtout porté par HLA-II.

En pratique, on va surtout essayer d'avoir un système HLA de classe 2 le plus identique possible en priorité, éviter les Mis Match pour le système HLA de classe 2, et de façon moindre pour le système HLA de classe 1.

Conclusion :

Les molécules du CMH sont très polymorphes et chaque individu possède un système du CMH unique qui n'est bien généralement retrouvé que dans la fratrie (système complexe).

Le système du CMH permet de présenter des antigènes fragmentés aux LT et est donc impliqué dans les défenses de l'organisme.

La présentation antigénique est favorisée en cas d'inflammation.

Le CMH-I présente des antigènes endogènes aux LT CD8. Les molécules du CMH-II présentent des Ag exogènes aux LT CD4. +++

Toutes les cellules expriment le CMH-I. Le CMH-II est présent sur les CPA : les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les LB+++

L'intérêt du CMH en pratique médicale est très important en situation de greffe pour laquelle il faut connaître le statut HLA du donneur et du receveur et rechercher tant que possible la présence d'Ac anti-HLA chez le receveur.

Il existe des différences entre les molécules du CMH de classe I et II qui vont impliquer le peptide qui va être inséré. Les différences entre les 2 classes concernent la taille et l'origine du peptide. Le système du CMH est impliqué dans la défense de l'organisme, la protection vis à vis du soi (tumeur → classe I) ainsi que des agents extérieurs (virus → classe II)