LE SYSTEME HLA
Complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme

Dr Hatem MASMOUDI

I- Historique et introduction

En 1936, avec des expériences de greffe de peau et de transplantation de tumeurs entre souris de lignées différentes, Gorer a mis en évidence un facteur de rejet (résistance) des greffes : il s'agissait pour Gorer d'un nouveau groupe érythrocytaire exprimé par les cellules normales et les cellules tumorales qu'il appela antigène 2 (Ag II).

En 1943, Medawar montre que le rejet est un phénomène immunologique : le 2ème rejet est plus rapide et plus intense que le premier.

En 1948, en utilisant des souris congéniques (différentes au niveau du gène étudié, identiques au niveau de tous les autres gènes), Snell a établi que le rejet est déterminé par un système génétique transmis selon les lois mendéliennes qu'il appelle système d'histocompatibilité II ou H2.

En 1958, Dausset a montré qu'il existe à la surface des leucocytes humains des Ag semblables aux Ag H2 de la souris : les Ag HLA (*"Human Leucocyte Antigen"*). Les Ag HLA comme les Ag H2 sont des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) : système HLA chez l'homme et système H2 chez la souris. Complexe, parce que constitué d'un très grand nombre de gènes regroupés sur un court segment chromosomique. Majeur, parce que en cas d'incompatibilité, le rejet de greffe est rapide avec production d'Ac spécifiques. Il existe d'autres systèmes d'histocompatibilité dits mineurs : en cas d'incompatibilité, le rejet est lent et sans production d'Ac. Histocompatibilité, puisque intervient dans l'acceptation ou le refus des greffes allogéniques.

Pendant très longtemps, le complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH a été associé au rejet des greffes allogéniques. Ce n'est qu'à partir de 1974 avec les travaux de Zinkernagel et Doherty sur la restriction allogénique et la réponse cytotoxique des lymphocytes T qu'on a commencé à comprendre le véritable rôle physiologique du CMH : les gènes du CMH codent pour des glycoprotéines membranaires qui assurent la présentation de l'Ag aux lymphocytes T. Les molécules codées par les gènes du CMH jouent donc un rôle fondamental dans la réponse immunitaire spécifique au même titre que les Ig et le TCR comme en témoignent les rares cas de déficit immunitaire profond dû à un défaut d'expression des molécules HLA (*"Bare lymphocyte syndrome"* ou syndrome des lymphocytes dénudés).

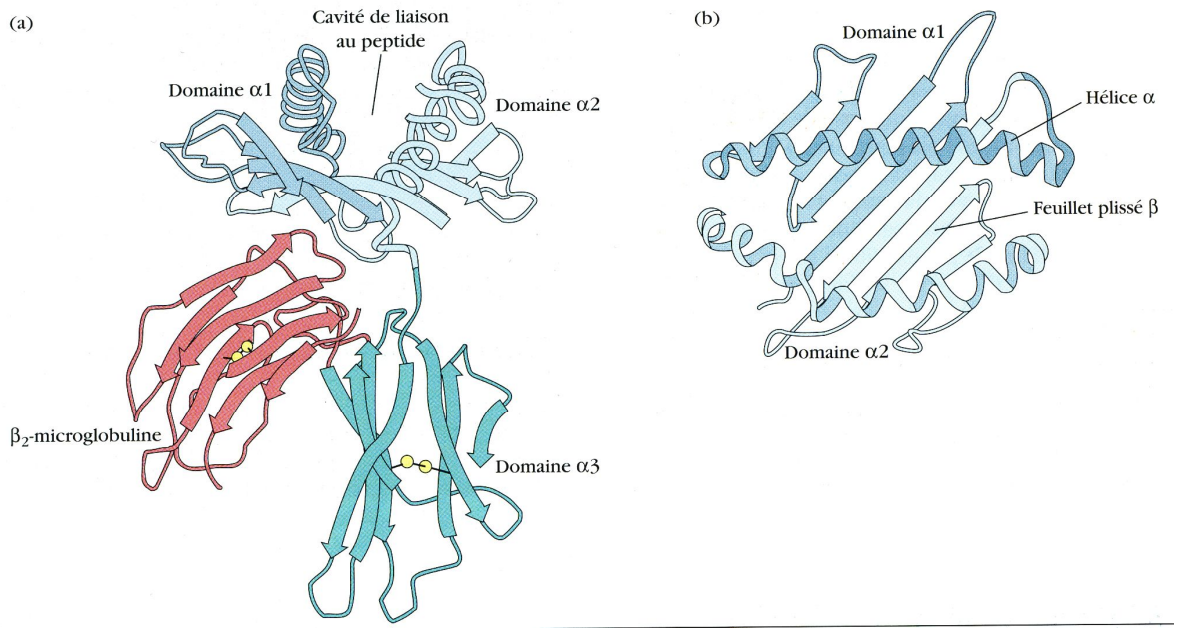
On distingue 2 classes de molécules HLA différentes par leur structure, leur distribution cellulaire, leurs voies intracellulaires de biosynthèse, les gènes qui les gouvernent et le type de lymphocytes auxquels elles présentent l'Ag : HLA classe I : A, B et C ; HLA classe II : DR, DQ et DP.

II- Les molécules HLA classe I

1) Structure

Les molécules HLA classe I (A, B et C) sont composées chacune de 2 chaînes polypeptidiques, une chaîne lourde α transmembranaire de 43 KDa de PM liée de façon non covalente mais avec une forte affinité à une chaîne légère extracellulaire de 12,5 KDa de PM, non glycosylée et monomorphe : la β2 microglobuline. Le polymorphisme des molécules HLA classe I est porté par la chaîne α dont la portion extracellulaire comporte 3 domaines : α1, α2 et α3. La β2 microglobuline a, elle aussi, une structure en domaine.

FIGURE 7.6 Représentations de la structure tridimensionnelle des domaines externes d'une molécule de l'HLA humain d'après une analyse cristallographique par rayons X. (a) Vue latérale dans laquelle les brins β sont représentés sous la forme de flèches épaisses et les hélices α sous la forme de rubans en spirales. Les liaisons disulfure sont représentées par deux sphères interconnectées. Les domaines α1 et α2 interagissent pour former la cavité de liaison au peptide. Remarquer la structure en repliement immunoglobulinique du domaine α3 et de la β_2-microglobuline. (b) Les domaines α1 et α2 sont vus par le haut, ce qui montre la cavité de liaison au peptide constituée d'une base de brins β antiparallèles et de côtés formés d'hélices α. Dans les molécules de classe I, cette cavité peut recevoir des peptides contenant 8-10 résidus.

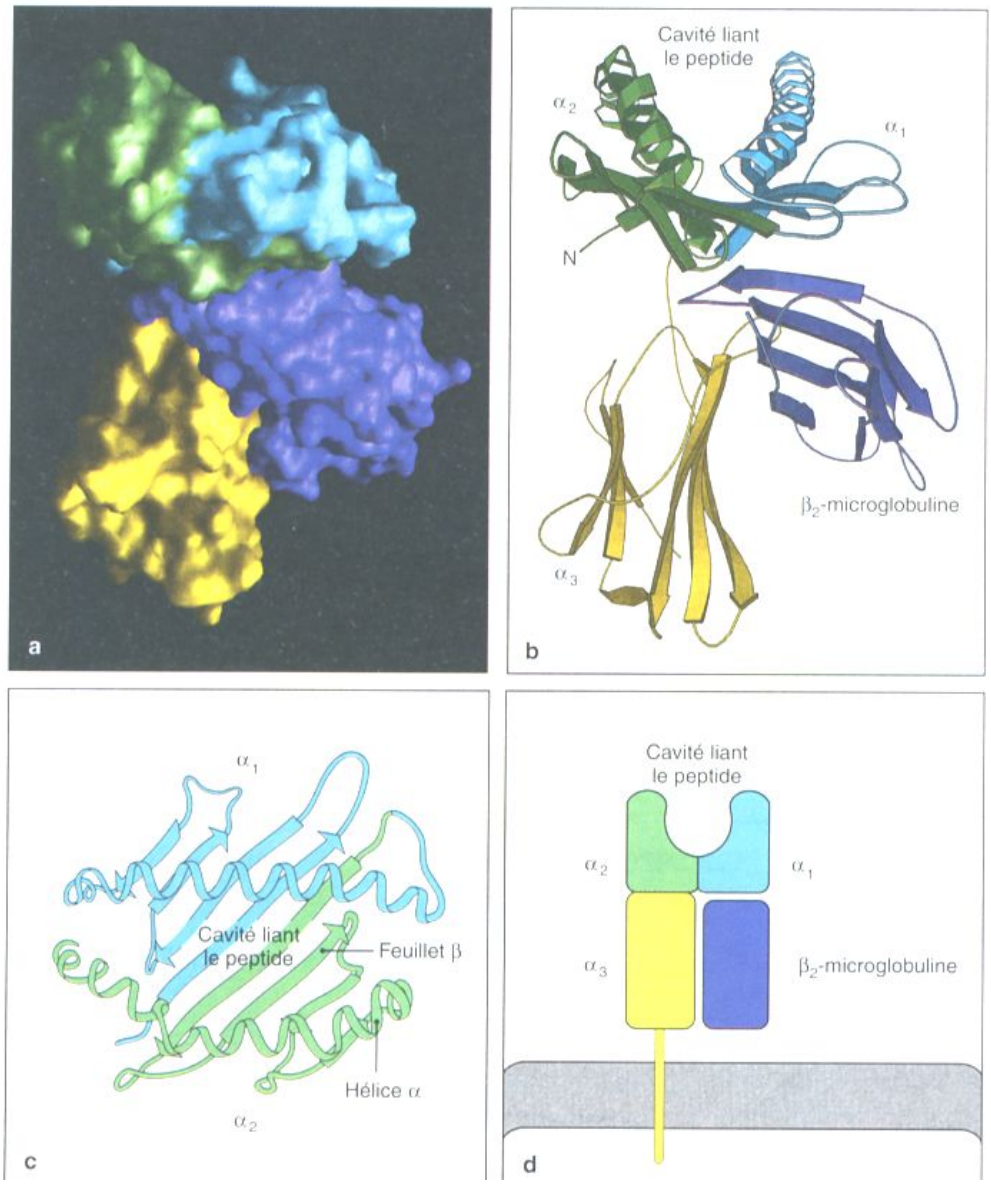


2) Distribution cellulaire

Les molécules HLA classe I sont exprimées à la surface de la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme à l'exception des neurones, des spermatozoïdes, des cellules trophoblastiques et des tubules rénaux.. Les molécules HLA classe I sont absentes aussi au niveau de l'os, du cartilage et de la cornée. Elles sont faiblement détectées sur les cellules endocrines, la muqueuse gastrique, le myocarde, le muscle strié et les hépatocyte. Les érythrocytes (cellules anucléées) n'expriment pas de molécules HLA I ; tandis que les plaquettes (proviennent de la défragmentation des mégacaryocytes, cellules nucléées) les expriment. L'expression quantitative varie selon le type cellulaire et le stade de différenciation. Elle peut être augmentée par certaines cytokines notamment l'INFγ et le TNFα. Elle peut être fortement diminuée dans le cas de certains cancers (les cellules cancéreuses échappent ainsi à l'action cytotoxique des lymphocytes $TCD8^+$).

3) voies intracellulaires de biosynthèse et partenaires antigéniques

Les molécules HLA classe I présentent des peptides du soi, normales ou transformées (virus, cancer). Leur synthèse suit la voie de l'exocytose.



La chaîne lourde α et la β2 microglobuline sont synthétisées et assemblées dans le réticulum endoplasmique. La protéine endogène ou d'origine virale est dégradée dans le cytosol par le protéasome dont 2 éléments, LMP2 et LMP7, sont codés dans le CMH. Le peptide antigénique d'une dizaine d'acides aminés est acheminé du cytosol dans le réticulum endoplasmique grâce à des pompes à peptides codées par les gènes TAP1 et TAP2 intégrés eux aussi dans le CMH.

Le trio β2 microglobuline-chaîne lourde α-peptide antigénique formé dans le réticulum endoplasmique s'y associe successivement à diverses

molécules chaperonnes (calnexine, calréticuline..) formant un complexe qui traverse l'appareil de Golgi (où la chaîne α est glycosylée) avant d'être exprimé à la surface de la cellule. Le peptide antigénique est logé dans une sorte de niche ou sillon au sommet des domaines α1 et α2 de la chaîne α.

4) Présentation de l'antigène

Les molécules HLA classe I présentent l'Ag aux lymphocytes T $CD8^+$. Le TCR (hétéro-dimère α/β ou γ/δ) reconnaît à la fois le peptide antigénique et une région polymorphe des domaines α1 et α2 de la molécule HLA classe I. CD8 se lie à une région monomorphe du domaine α3. Les lymphocytes $TCD8^+$ correspondent en grande partie à des lymphocytes T cytotoxiques.

III- Les molécules HLA classe II

1) Structure

Les molécules HLA classe II (DR, DQ et DP) sont composées chacune de 2 chaînes polypeptidiques transmembranaires glycosylées et polymorphes, une chaîne α de 31 à 34 KDa de PM et une chaîne β de 26 à 29 KDa de PM. Comme les molécules HLA classe I, les molécules HLA classe II ont une structure en domaine et font partie de la superfamille des Ig. La région extracellulaire de chacune des chaînes α et β est formée de 2 domaines α1 et α2 pour la chaîne α, β1 et β2 pour la chaîne β. La chaîne β est globalement plus polymorphe que la chaîne α.

2) Distribution cellulaire

Les molécules HLA classe II ont une distribution cellulaire restreinte aux cellules dites présentatrices d'Ag :

- Les monocytes-macrophages
- Les cellules dendritiques
- Les lymphocytes B
- Les lymphocytes T activés
- Les cellules épithéliales thymiques

Les monocytes et les macrophages tissulaires n'expriment de forts taux de molécules HLA classe II qu'après avoir réagi avec l'Ag et été activés par les cytokines produites par les lymphocytes Thelper.

L'expression des molécules HLA classe II peut être induite et/ou augmentée par certaines cytokines notamment l'INFγ et le TNFα. Une expression aberrante des molécules HLA classe II est observée dans certaines maladies auto-immunes au niveau de l'organe atteint.

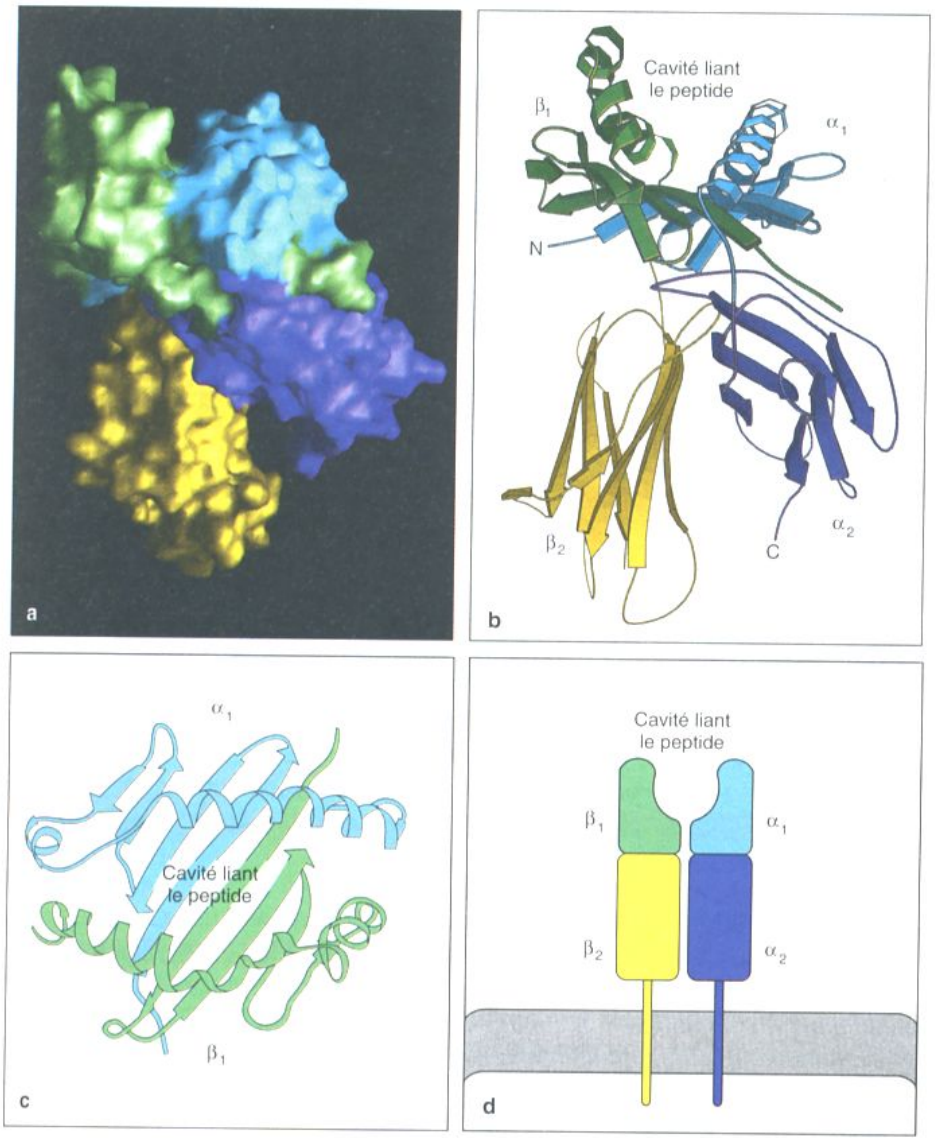


Fig. 3.21 Les molécules du CMH de classe II ressemblent aux molécules du CMH de classe I dans leur structure globale. La molécule du CMH de classe II est composée de deux chaînes de glycoprotéines transmembranaires, α (34 kDa) et β (29 kDa), comme le montre schématiquement le panneau d. Chaque chaîne comporte deux domaines, les deux chaînes formant une structure compacte de quatre domaines semblable à celle de la molécule du CMH de classe I (à comparer avec le panneau d de la Fig. 3.20). Le panneau a montre une représentation graphique assistée par ordinateur de la surface de la molécule du CMH de classe II, dans ce cas la protéine humaine HLA-DR1, et le panneau b montre le diagramme en ruban correspondant. Les domaines α_2 et β_2, comme les domaines α_3 et la β_2-microglobuline de la molécule du CMH de classe I, ont des similarités de séquence primaire et de structure avec les domaines C des immunoglobulines ; dans la molécule du CMH de classe II, les deux domaines formant la cavité de liaison peptidique appartiennent à des chaînes différentes et ne sont pas jointes par une liaison covalente (voir les panneaux c et d). Une autre différence importante, non visible sur le diagramme, est que le sillon de liaison peptidique de la molécule du CMH de classe II est ouvert aux deux extrémités.

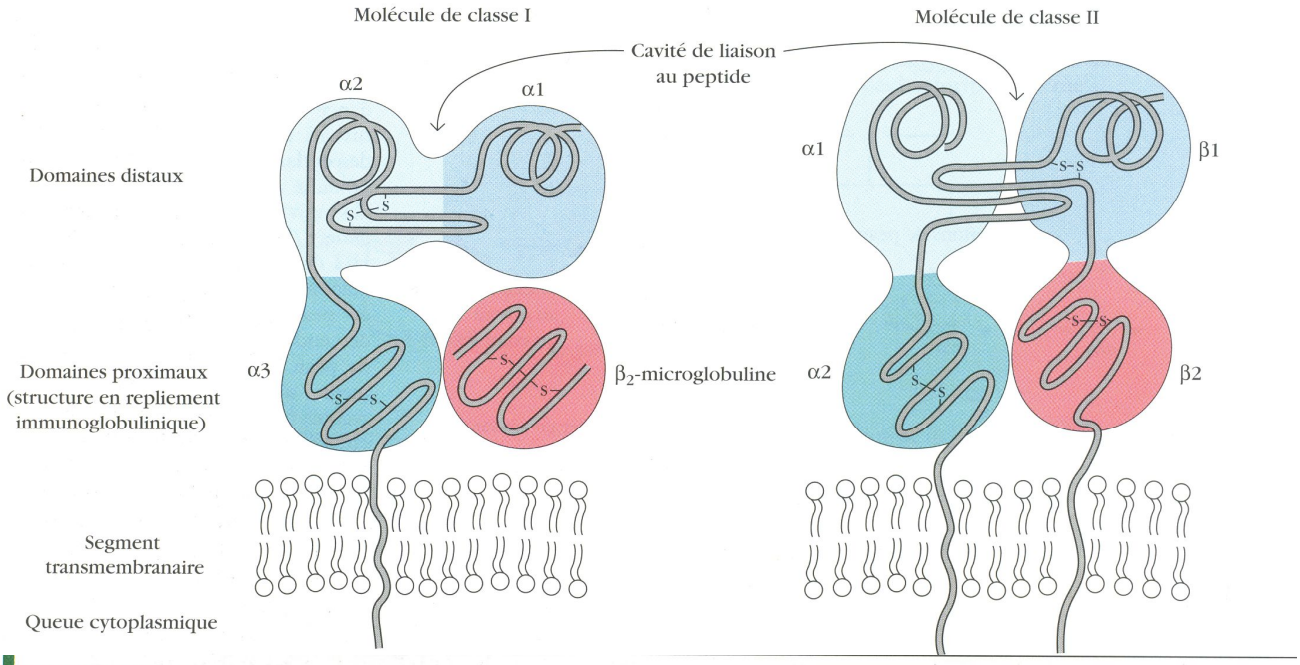


FIGURE 7.5 Représentations schématiques des molécules de classe I ou de classe II du CMH, montrant les domaines exter le segment transmembranaire et la queue cytoplasmique. La cavité de liaison au peptide est formée par les domaines distaux molécules de classe I ou de classe II. Les domaines proximaux possèdent la structure de base du repliement immunoglobuliniq ainsi, les molécules de classe I ou de classe II du CMH sont considérées comme des membres de la superfamille des immuno bulines.

3) Voies intracellulaires de biosynthèse et partenaires antigéniques

Les molécules HLA classe II présentent des peptides antigéniques d'origine exogène (bactérie, toxine...). Leur synthèse suit la voie de l'endocytose.

Les chaînes α et β sont synthétisées et assemblées dans le réticulum endoplasmique où elles se lient à la chaîne invariante li : une chaîne

polypeptidique de 31 KDa de PM qui empêche la fixation de peptides endogènes.

Le trimère α-β-li est transporté à travers l'appareil de Golgi vers un endolysosome contenant des protéines endocytées par la cellule. Dans le compartiment endolysosomial à pH acide, la chaîne invariante est dissociée et dégradée, ce qui permet l'association d'un peptide antigénique de 13 à 17 acides aminés provenant de la dégradation partielle d'une protéine exogène endocytée. Les antigènes lipidiques présents dans l'endolysosome sont pris en charge et présentés par le CD1, une molécule HLA classe I like.

Les protéines endogènes cytosoliques peuvent également être transférées dans l'endolysosome par un processus dépendant de la protéine de choc thermique HSP70. Le complexe α-β-peptide antigénique est exprimé à la surface cellulaire.

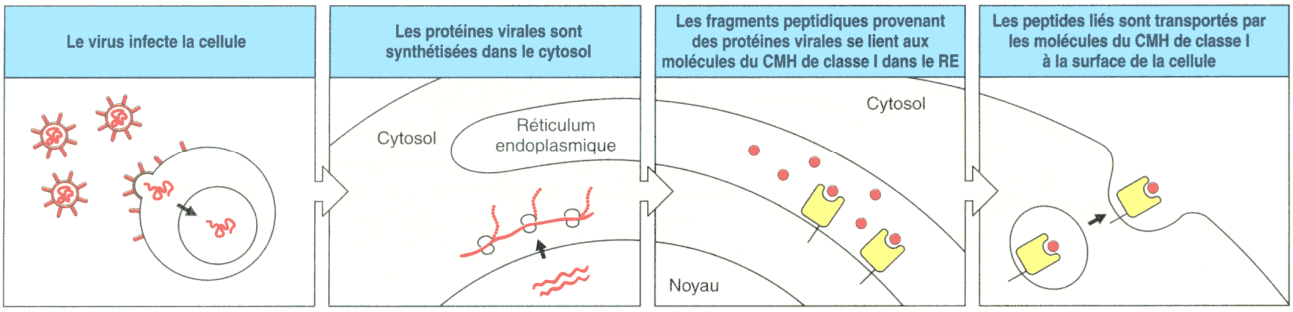


Fig. 1.28 Les molécules du CMH de classe I présentent des antigènes dérivés de protéines synthétisées dans le cytosol. Dans les cellules infectées par des virus, les protéines virales sont synthétisées dans le cytosol. Des fragments peptidiques de ces protéines virales sont transportés vers le réticulum endoplasmique (RE) où ils se lient à des molécules du CMH de classe I. Ensuite, celles-ci les exposent à la surface de la cellule.

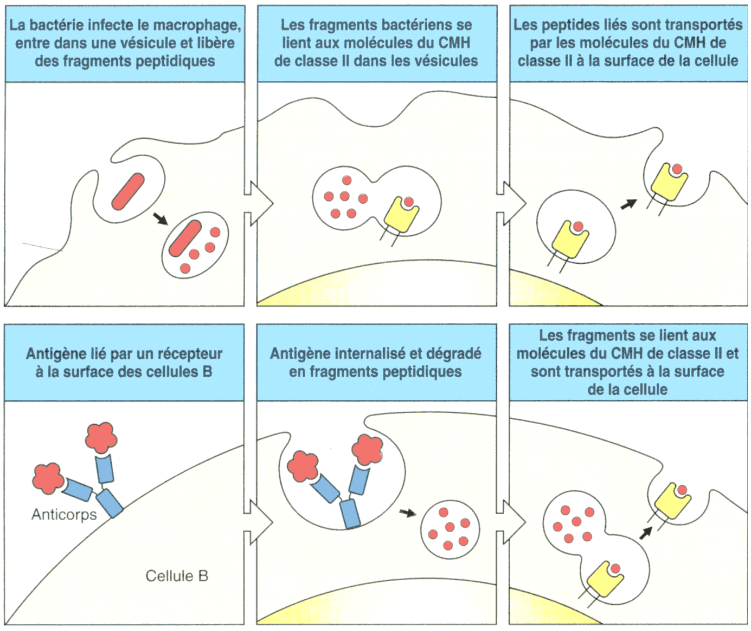


Fig. 1.29 Les molécules du CMH de classe II présentent des antigènes en provenance de vésicules intracellulaires. Certaines bactéries infectent les cellules et s'y multiplient dans des vésicules. Des peptides issus de telles bactéries se lient aux molécules du CMH de classe II et sont transportés à la surface de la cellule (panneaux du haut). Les molécules du CMH de classe II lient et transportent aussi des peptides dérivés d'antigènes fixés sur la cellule et internalisés dans des vésicules, après capture médiée par les récepteurs à l'antigène des cellules B (panneaux du bas).

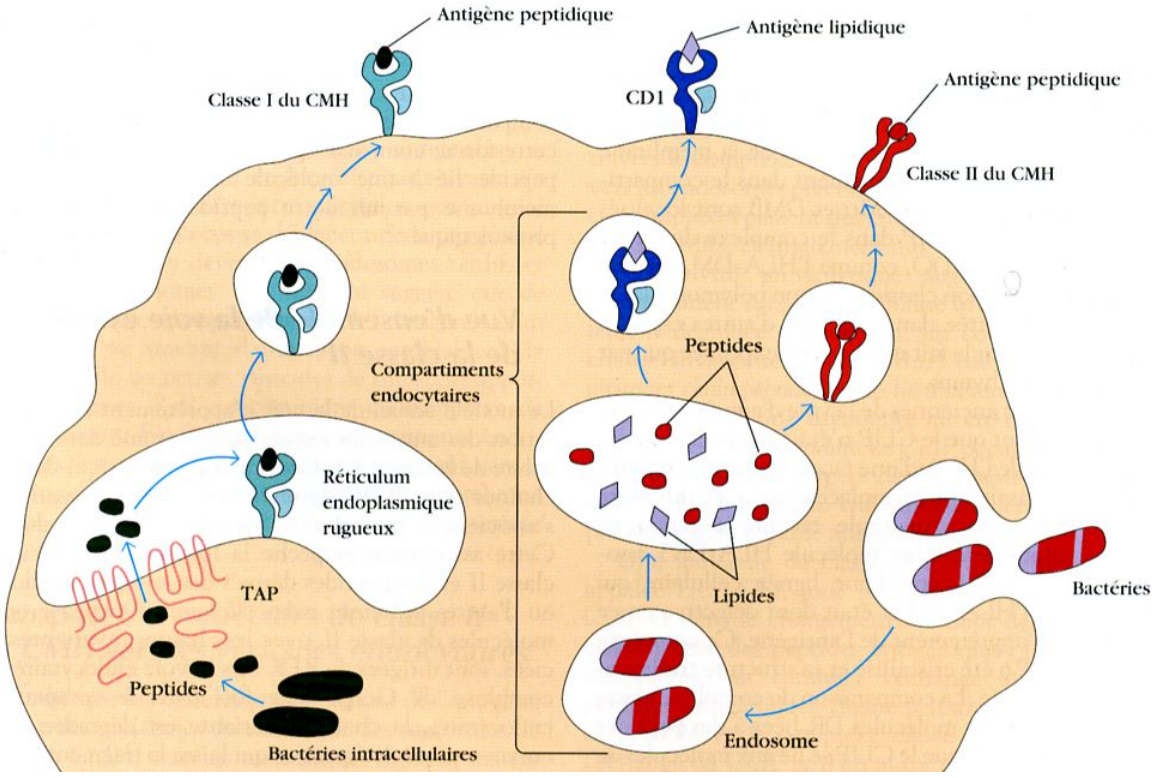


FIGURE 8.11 Rôle des molécules CD1 semblables à la classe I dans la présentation des antigènes non peptidiques venant des bactéries. On a montré que les molécules CD1, qui ne sont pas codées par le CMH, présentent les antigènes lipidiques ou glycolipidiques de *Mycobacterium tuberculosis* ou de *Mycobacterium leprae*. Un schéma hypothétique de l'action de CD1, comparable à la présentation à la classe I ou à la classe II des peptides, est représenté ici. Les détails de la voie CD1 restent obscurs. [Adapté de Melian *et al.*, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8:82-88.]

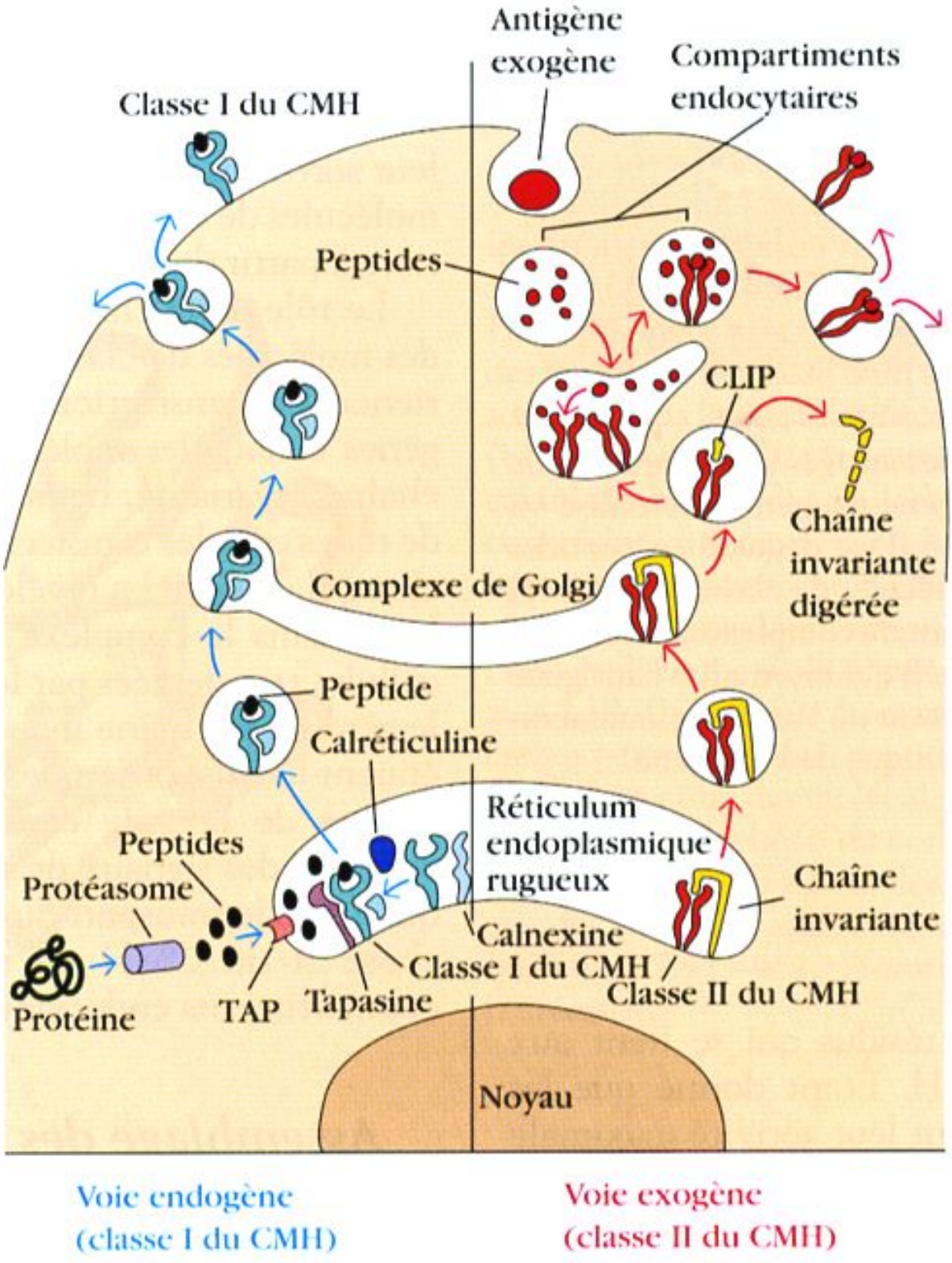


FIGURE 8.8 Modèle des voies séparées de présentation de l'antigène pour des antigènes endogènes (vert) ou exogènes (rouge). Le mode d'entrée de l'antigène dans les cellules et le site d'apprêtement de l'antigène semblent déterminer l'association des peptides antigéniques et des molécules de classe I du CMH dans le réticulum endoplasmique rugueux, ou des molécules de classe II dans les compartiments endocytaires.

4) Présentation de l'antigène

Les molécules HLA classe II présentent l'Ag aux lymphocytes T $CD4^+$. Le TCR reconnaît en même temps le peptide antigénique et une zone variable des domaines N-terminaux α1 et β1 de la molécule HLA classe II ; CD4 interagit avec une région monomorphe du domaine β2 ($2^{ème}$ domaine de la chaîne β de la molécule HLA classe II).

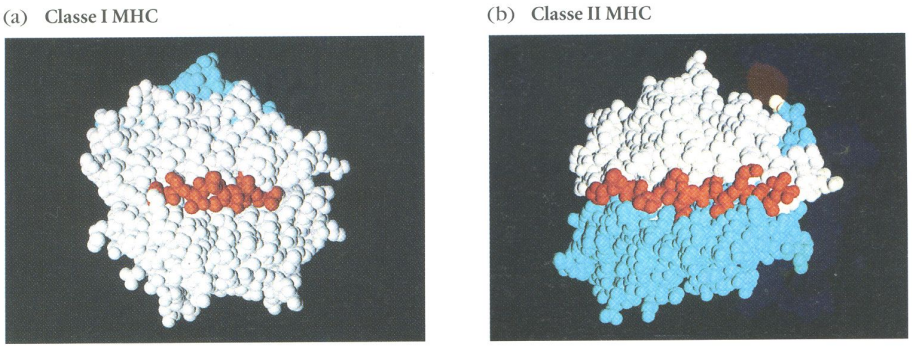


FIGURE 7.10 Molécules de classe I et molécules de classe II du CMH liées à des peptides. (a) Modèle compact d'une molécule de classe I humaine HLA-A2 (blanc) et d'un peptide (brun) venant de la transcriptase inverse de l'HIV (résidus amino acides 309-317) dans la cavité de liaison. La β_2-microglobuline est représentée en bleu, les séquences au-dessus du peptide appartiennent au domaine α1, celles qui sont en-dessous appartiennent au domaine α2. (b) Modèle compact d'une molécule de classe II humaine HLA-DR1 avec la chaîne DRα représentée en blanc et la chaîne DRβ en bleu. Le peptide (brun) dans la cavité de liaison vient de l'hémagglutinine de la grippe (résidus amino acide 306-318). [D'après DA Vignali et J Strominger, 1994, *The Immunologist* 2:112.]

IV- Les gènes du système HLA

1) Organisation génétique de la région HLA

Les gènes du système HLA sont regroupés sur un segment chromosomique de 4000 kb (kilobases) appelé région HLA et porté par le bras court du chromosome 6. Seules la β2-microglobuline et la chaîne invariante sont codées en dehors de cette région HLA par des gènes portés respectivement par les chromosomes 15 et 5 chez l'homme. La région chromosomique HLA est subdivisée en 3 sous-régions :

- en position télomérique, la sous-région HLA classe I s'étend sur 2000 kb
- en position centromérique, la sous-région HLA classe II s'étend sur 1000 kb
- entre les deux, la sous-région HLA classe III qui s'étend sur 1000 kb et comporte les gènes C4A, C4B, BF et C2 du complément, les gènes TNF-A

et TNF-B codant pour les TNF α et β, les gènes Cyp-21A et B codant pour la 21-hydroxylase, le gène de la HSP70 etc.

La sous-région HLA classe I comprend les gènes A, B et C codant pour la chaîne α des molécules HLA classe I-A, B et C.

La sous-région HLA classe II comprend les gènes DRA, DRB, DQ-A, DQB, DPA et DPB codant pour les chaînes α et β des molécules HLA classe II-DR, DQ et DP.

La taille des gènes varie de 3,5 kb pour les gènes de classe I à 7-18 kb pour les gènes de classe II. Les gènes HLA classe I et classe II ont une structure en exons (séquences codantes) séparés par des introns (séquences non codantes) qui reflète la structure en domaines des chaînes polypeptidiques.

Les gènes TAP1, TAP2, LMP2 et LMP7 sont inclus dans la sous-région HLA classe II.

A côté des gènes A, B, C, DR, DQ et DP, la région HLA comporte d'autres gènes de classe I : E, F, G, H... et de classe II : DN, DO...de signification encore mal connue.

De plus, la région HLA est caractérisée par l'existence de très nombreux pseudo-gènes et gènes non transcrits.

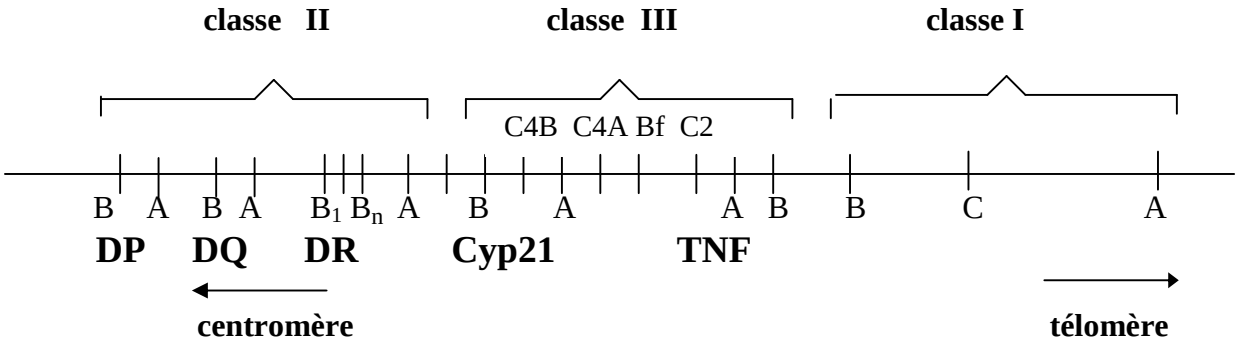


Fig 1 : Organisation de la région HLA sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme. Seuls les principaux gènes sont représentés (les pseudo-gènes et les gènes défectueux ne sont pas représentés). Le nombre de gènes DRB dépend de l'haplotype (jusqu'à 3 ou 4 gènes fonctionnels).

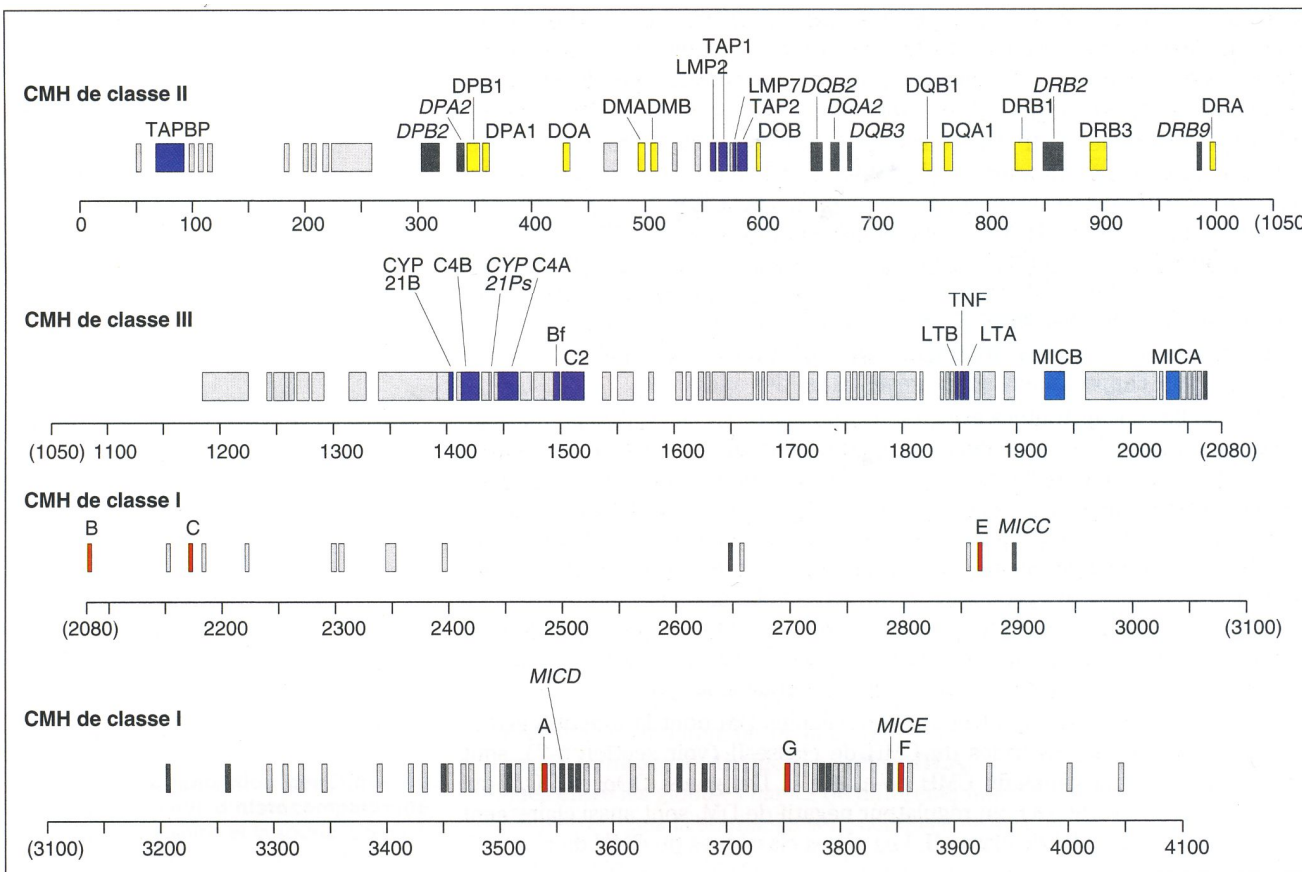


Fig. 5.11 Carte détaillée du CMH humain. L'organisation des régions du CMH humain de classe I, de classe II et de classe III du CMH humain est illustrée, avec des distances génétiques approximatives données en milliers de paires de base (kb). La plupart des gènes des régions de classe I et de classe II sont mentionnés dans le texte. Les gènes supplémentaires indiqués dans les régions de classe I (par exemple E, F et G) sont des gènes de type classe I, codant pour les molécules de classe IB ; les gènes supplémentaires de classe II sont des pseudogènes. Les gènes représentés dans la région de classe III codent les protéines du complément C4 (deux gènes, notés C4A et C4B), C2 et le facteur B (noté Bf) aussi bien que des gènes qui codent pour le facteur-α de nécrose tumorale (TNF) et les lymphotoxir (LTA, LTB). Le gène codant la 21-hydroxylase (noté CYP 21B), u enzyme impliquée dans la synthèse des stéroïdes, est étroitement aux gènes C4. Les gènes notés en italiques et grisés sont des ps dogènes. Les gènes du CMH de classe I sont en rouge, excepté gènes MIC, colorés en bleu ; ils sont distincts des autres gènes de t classe I et sont soumis à des contrôles transcriptionnels différents. L gènes du CMH de classe II sont en jaune. Les gènes dans la région CMH de classe II qui ont des fonctions immunes sans relation avec gènes du CMH de classe I et de classe II sont colorés en violet.

2) Polymorphisme génétique du système HLA

Une des caractéristiques majeures du système HLA est son extraordinaire polymorphisme génétique. Il est ainsi exceptionnel voire impossible de trouver deux sujets non apparentés qui soient strictement identiques au niveau de tous leurs gènes HLA.

Le polymorphisme commence au niveau isotypique (duplication des gènes) puisque les molécules HLA sont codées (au niveau de chaque chromosome 6) par pas moins de 3 gènes (3 loci) pour la classe I et 3 paires de gènes pour la classe II. Mais c'est surtout au niveau allotypique ou

allélique que ce polymorphisme est le plus largement exprimé avec un nombre d'allèles extraordinairement élevé pour chacun des loci (plus de 50 allèles pour HLA-A et plus de 100 pour HLA-B et HLA DR-B1..).

Au polymorphisme allélique et isotypique, s'ajoute un polymorphisme haplotypique au niveau de la sous-région DR. Cette dernière comporte, en effet, un gène DRA monomorphe codant pour la chaîne DRα et un gène DRB1 codant pour une chaîne DRβ exprimé seul ou associé à un autre gène DRB fonctionnel (DRB-3, 4 ou 5) et/ou à un ou plusieurs pseudo-gènes DRB (DRB-2, 6, 7, 8 et 9). On a ainsi identifié 5 groupes haplotypiques DR.

Ce polymorphisme génétique du système HLA est prolongé au niveau biochimique par les complémentations possibles en cis (ex : chaîne α de DR et chaîne β de DQ produites par le même chromosome) ou en trans (chaîne α produite par un chromosome et chaîne β produite par le chromosome homologue) générant des molécules HLA hybrides.

3) Transmission et expression des gènes HLA

La transmission des gènes HLA de parents à enfants se fait en bloc dans 99 % des cas : le pourcentage de recombinaison est de 1 %.

Leur expression se fait de façon co-dominante : pour chaque locus, les 2 gènes allèles portés par chacun des deux chromosomes 6 homologues s'expriment.

4) Notion de déséquilibre de liaison

Certains allèles d'un locus sont associés préférentiellement et bien plus souvent que ne le voudrait le simple hasard à certains allèles d'un autre locus. La fréquence de l'association des 2 allèles chez un même individu est ainsi supérieure au produit p x q de leurs fréquences géniques respectives.

Ex : A1 - B8, A3 - B7, B8 - DR3, B7 - DR2

V- Fonctions du système HLA

1) Présentation de l'Ag aux lymphocytes T

Les molécules HLA jouent un rôle fondamental dans la réponse immunitaire spécifique en assurant la présentation de l'Ag au récepteur TCR des lymphocytes T. Les molécules HLA classe I présentent l'Ag aux lymphocytes $TCD8^+$, tandis que les molécules HLA classe II présentent l'Ag aux lymphocytes $TCD4^+$.

Les lymphocytes T ne reconnaissent l'Ag que lorsqu'il est présenté par des cellules exprimant les mêmes molécules HLA (lymphocytes T et cellules présentatrices provenant du même sujet ou de deux sujets ayant le même hapolotype HLA) : c'est la restriction allogénique.

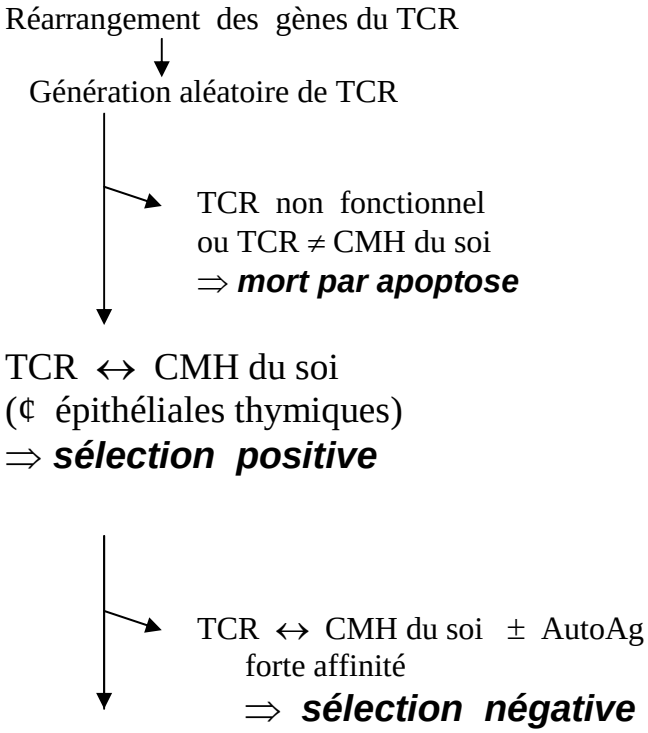
2) Sélection du répertoire des lymphocytes T

Lors de la différenciation intra-thymique des lymphocytes T, les réarrangements aléatoires des gènes du TCR produisent une grande variété de thymocytes exprimant divers types de TCR : des TCR reconnaissant les Ag du soi et des TCR reconnaissant les allo-Ag et autres Ag étranger, des TCR reconnaissant l'Ag dans le contexte de molécules HLA étrangères et des TCR reconnaissant l'Ag dans le contexte de molécules HLA du soi. Seuls les thymocytes exprimant un TCR reconnaissant l'Ag dans le contexte d'une molécule HLA du soi sont sélectionnés positivement (leur prolifération est favorisée). Non sélectionnées, les autres cellules (thymocytes exprimant un TCR non fonctionnel ou reconnaissant l'Ag en association avec une molécule HLA étrangère) meurent par apoptose. Parmi les cellules sélectionnées positivement, celles dont le TCR réagit avec une forte affinité avec une molécule HLA du soi et/ou un auto-Ag exprimé dans le thymus subissent une sélection négative (elles sont éliminées).

La sélection intra-thymique du répertoire des lymphocytes T permet ainsi l'obtention de lymphocytes T matures pouvant faire la distinction entre le soi et le non-soi (tolérance) et reconnaissant l'Ag dans le contexte de molécules

HLA du soi (restriction allogénique). Les molécules HLA jouent un rôle central dans cette sélection.

Fig 2 : Sélection intrathymique du répertoire des lymphocytes T



Le thymus ignore ce qui est inutile, sélectionne ce qui est utile et détruit ce qui est dangereux (V. Bohmer).

3) Contrôle génétique de la réponse immunitaire

Il est maintenant bien établi que les gènes Ir (*"Immune response"*) initialement décrits par Benacerraf et Mac Devit chez la souris, correspondent aux gènes classe II du CMH. Pour un peptide antigénique donné, les sujets qui ont dans leurs gènes HLA classe II la combinaison qui permet d'avoir une molécule capable de fixer le peptide antigénique concerné pour le présenter aux lymphocytes Th spécifiques répondront vigoureusement à cet Ag en produisant des Ac et en développant une hypersensibilité retardée. A l'inverse, les sujets qui n'ont pas parmi leurs gènes HLA la combinaison qui permet d'avoir une molécule qui fixe le peptide antigénique concerné, ne peuvent pas répondre à ce peptide même s'ils ont les lymphocytes T avec le TCR adéquat. La conception de vaccins composés de peptides doit tenir compte de ce contrôle par les gènes HLA de la réponse immunitaire. Une des difficultés à surmonter est l'opposition entre le caractère individuel de la réponse immunitaire, dépendant du phénotype HLA, et l'obligation pour le vaccin d'être applicable à toute la population.

VI- Les techniques de typage HLA

A) Typage sérologique

La sérologie a été à la base de la définition du système HLA.

La technique de micro-lymphocyto-toxicité complément-dépendante décrite par Terasaki et Mc Celland en 1964 reste encore largement utilisée dans la plupart des laboratoires. Elle repose sur l'aptitude des Ac spécifiques à reconnaître des déterminants allotypiques des molécules HLA à la surface cellulaire. Lorsqu'un Ac reconnaît et se fixe sur le déterminant antigénique correspondant sur la membrane d'une cellule, la séquence du complément est activée au site de la réaction Ag-Ac et aboutit à la lyse de la cellule cible. L'addition d'un colorant vital (éosine, bleu trypan...) qui marque les cellules mortes et non les cellules vivantes permet de distinguer les cellules qui portent l'allotype HLA correspondant à l'Ac utilisé (cellules mortes) des

cellules qui ne le portent pas (cellules vivantes). La technique est habituellement réalisée en 2 temps sur des microplaques de culture comportant 60 à 72 puits. Dans chaque puits on met 1 µl de la suspension cellulaire du sujet à typer et 1 µl d'une solution Ac de spécificité connue (différente pour chaque puits). Après 30 minutes d'incubation, on rajoute 3 à 5 µl de complément de lapin et, après 60 autres minutes, le colorant vital.

La technique de micro-lymphocyto-toxicité permet le typage HLA classe I-A, B et C et HLA classe II-DR et DQ.

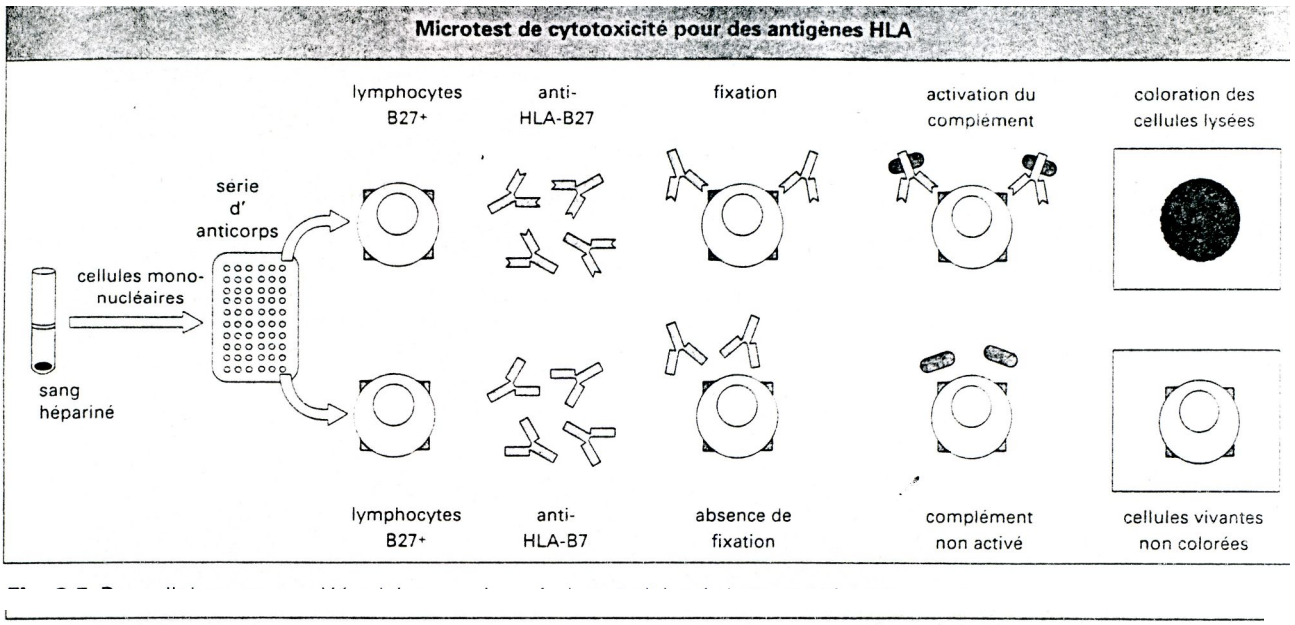


Fig. 2.5 Des cellules mononucléées (obtenues à partir de sang hépariné par centrifugation sur Ficoll-Hypaque) sont testées pour leur réactivité vis-à-vis d'anticorps anti-HLA classe I. Les cellules exprimant HLA-B27 fixent les anticorps anti-B27, activant ainsi le complément. Les cellules lysées sont perméables à l'éosine et apparaissent rouges sous le microscope à contraste de phase.

La principale source des Ac anti-HLA de typage est le sérum des femmes qui viennent d'accoucher (immunisation foeto-maternelle). Les Ac apparaissent dans 15 à 20 % des cas après la première grossesse. Ils sont détectés et typés grâce à un panel de lymphocytes représentant toutes les spécificités HLA.

Seuls 2 à 3 % des sérums étudiés sont utilisables comme sérum-test mono ou bispécifique. Pour la préparation d'Ac pour le typage HLA classe II, il est nécessaire d'absorber préalablement les sérums sur un pool de plaquettes afin

d'éliminer les Ac anti-HLA classe I. A côté des sérums de femmes multipares ou de patients polytransfusés, une autre source d'Ac de plus en plus utilisée en raison de leur homogénéité et de leur spécificité est représentée par les Ac monoclonaux.

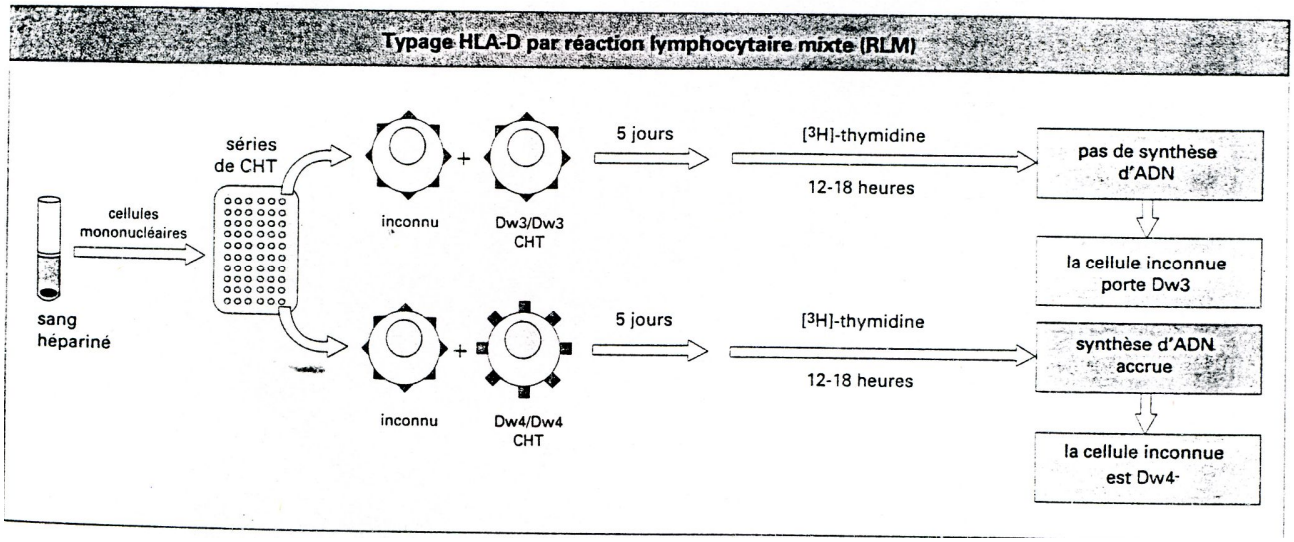
La suspension de cellules cibles correspond aux cellules mono-nucléées du malade à typer, obtenues à partir du sang circulant grâce à un gradient de densité sur Ficoll. L'anneau de cellules mono-nucléées contient environ 80 % de lymphocytes T, 10 % de lymphocytes B et 10 % de monocytes. Pour le typage HLA classe II, il est donc nécessaire d'éliminer les lymphocytes T (n'expriment que les Ag HLA classe I) de la suspension de cellules cibles.

B) Typage cellulaire

Les techniques de typage cellulaire permettent une analyse fonctionnelle du système HLA et plus particulièrement des Ag HLA-D (HLA classe II). Elles reposent sur l'étude de la réactivité cellulaire T en cultures mixtes lymphocytaires (MLR).

La méthode utilisant des cellules homozygotes de typage (HTC : *"homozygous typing cells"*) permet le typage HLA-Dw. C'est une réaction lymphocytaire mixte primaire unidirectionnelle. Les cellules mono-nucléées du malade à typer (cellules répondeuses) sont incubées avec un panel de cellules homozygotes inactivées (par incorporation de mitomycine ou par irradiation γ) de phénotype connu (cellules stimulantes). Si les cellules du malade à typer ont le même phénotype que les cellules stimulantes, elles ne répondent pas ; si elles sont de phénotype différent, elles sont activées et se mettent à proliférer. La réaction est réalisée dans des microplaques de culture en triplicate pour chaque type de cellules stimulantes. Après 5 jours de culture, de la thymidine triciée (T^{H3}) est rajoutée au milieu de culture. Après 18 heures d'incubation, la réponse prolifération des lymphocytes T est appréciée par la mesure de l'incorporation de thymidine radioactive (on mesure pour cela la radioactivité dans le surnageant et le culot cellulaire

obtenus après centrifugation). Le typage HLA-Dw englobe à la fois les spécificités HLA-DR et HLA-DQ définies sérologiquement.



La culture mixte lymphocytaire secondaire ou PLT (*"Primed lymphocytes typing"*) permet le typage HLA-DP. Des lymphocytes T soumis à un stimulus allogénique in vitro subissent une expansion clonale dont le maximum se situe vers le 6ème jour, pour revenir progressivement en G_0 vers le 10ème jour (MLR primaire). Les lymphocytes T ainsi ″primés″ (cellules répondantes de phénotype connu) sont mis en contact avec les cellules à typer du malade ; si celles ci ont le même phénotype que les cellules stimulantes (inactivées de phénotype connu) initialement utilisées, on observe une réponse proliférative intense dont le maximum se produit dès le 2ème jour de la culture. La réponse (prolifération cellulaire intense et rapide traduite par l'incorporation de la radioactivité) indique l'existence d'une similarité entre les cellules à typer et les cellules stimulantes.

C) Typage moléculaire

1) <u>Méthodes biochimiques</u>

Les techniques décrites ci-dessus sont toutes de nature immunologique, c'est à dire visant à identifier les différentes molécules HLA

en terme d'antigénicité, sérologiquement (Ac) ou cellulairement (lymphocytes T) définie. Alternativement, on peut établir cette identification sur les bases de la biochimie conventionnelle : détermination du poids moléculaire et du point isoélectrique, établissement de cartes peptidiques puis de la séquence primaire en acides aminés. Deux types de techniques biochimiques sont particulièrement utilisés, l'électrophorèse bidimensionnelle et l'iso-électro-focalisation (IEF).

2) <u>Méthodes génétiques</u>

L'analyse au niveau des gènes a représenté un changement radical dans l'étude et la description du polymorphisme HLA. Les techniques de biologie moléculaire sont applicables en routine surtout pour les allèles HLA classe II. Elles sont essentiellement basées sur l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et les techniques de PCR (″Polymerase Chain Reaction″) et d'hybridation moléculaire. L'ADN génomique est généralement étudié après extraction à partir des cellules nucléées du sang périphérique.

a) <u>PCR-RFLP</u> :

- Amplification par PCR de l'ADN du 2ème exon (le plus polymorphe) des gènes HLA classe II, suivie de

- Digestion de l'ADN amplifié avec des enzymes de restriction, puis

- Electrophorèse du lysat d'ADN et identification des fragments de restriction spécifiques des allèles étudiés

b) <u>PCR-SSP</u> (*″Sequence Specific Primer″* = amplification spécifique d'allèle) :

- Pour chaque malade, on effectue une quinzaine de PCR, chacune avec un couple d'amorces (*″primer″*) spécifiques d'un allèle, puis

- Visualisation des produits amplifiés par électrophorèse : vérifier la présence ou l'absence du produit d'amplification pour chaque PCR.

c) <u>PCR-ASO</u> (*″allel specific oligonucleotid″*) :

- Amplification par PCR, suivie de
- Transfert sur membrane de nitrocellulose, puis
- Hybridation avec une sonde oligonucléotidique spécifique d'allèle.

d) Séquençage du 2ème exon

VII- Applications médicales du système HLA

1) Transplantation d'organes

La compatibilité HLA entre donneur et receveur d'une transplantation est un élément important de son succès. Le rejet des greffes est contrôlé par le complexe majeur d'histocompatibilité responsable d'un rejet rapide avec production d'Ac, et par de nombreux Ag mineurs qui provoquent un rejet plus lent et sans production d'Ac.

2) Association HLA-maladies

Certaines maladies sont liées au système HLA parce que le gène responsable est hébergé dans la région HLA. C'est le cas de l'hémochromatose idiopathique, de l'insuffisance surrénale congénitale par déficit en 21-hydroxylase (21-OH), et des déficits des fractions C2 et C4 du complément.

De très nombreuses maladies auto-immunes sont associées à un ou plusieurs allèles HLA. L'allèle en question est retrouvé chez les malades avec une fréquence bien plus élevée que dans la population générale. Ainsi, la spondylarthrite ankylosante est associée à l'allèle HLA B27 avec un risque relatif de 88, le diabète insulinodépendant est associé à la combinaison DR3/DR4 avec un risque relatif de 47, la maladie coeliaque est associée à DQ2 avec un risque relatif de 60...

Certaines maladies qui ne peuvent actuellement être rapportées à un mécanisme immunologique, sont remarquables par leur forte association au système HLA, c'est le cas de la narcolepsie associée à l'allèle HLA DR2 avec un risque relatif de 135 et de la rétinopathie de Birdshot associée à l'allèle HLA A29 avec un risque relatif de 100.

Les manifestations immuno-pathologiques de la lèpre sont contrôlées par les allotypes HLA classe II du patient : la forme tuberculoïde caractérisée par des phénomènes d'hypersensibilité retardée est associée à HLA-DR3, tandis que la forme lèpromateuse caractérisée par la production d'Ac et la formation de complexes immuns est associée à l'allèle HLA-DR1.

Le contrôle génétique de la réponse immunitaire par le CMH explique les cas de résistance ou d'association à certaines maladies infectieuses ou parasitaires.

3) HLA et grossesse

La gestation est la seule situation comportant physiologiquement un contact allogénique. Le foetus est une greffe semi-allogénique tolérée. Malgré une réponse immunitaire fréquente de la mère contre les allo-antigènes foetaux en particulier du CMH, le foetus n'est pas rejeté car il est isolé des éventuels mécanismes effecteurs du rejet par des trophoblastes dépourvus d'antigènes classiques d'histocompatibilité. Les trophoblastes expriment au début de la grossesse une molécule HLA-G non polymorphique et dont la fonction est peu connue. Des molécules foetales et maternelles franchissent cependant le placenta, induisant une réponse immunitaire chez la mère, et éventuellement une tolérance aux Ag maternels chez le foetus.

Certains avortements spontanés à répétition pourraient être expliqués par une non-reconnaissance immunitaire du foetus par la mère en raison de différences antigéniques insuffisantes (transmission d'antigènes HLA paternels partagés par la mère). La reproduction sexuée est, en effet, favorisée par la différence génétique des partenaires. Le rôle favorable de la réponse immunitaire serait dû à l'activité immuno-trophique des cytokines et des facteurs de croissance qu'elle suscite. Des transfusions de sang paternel faites avant la grossesse pourraient constituer un traitement de ce type d'avortements à répétition.

4) Exclusion de paternité

En médecine légale, les études de paternité se basent principalement sur l'analyse des groupes sanguins et de l'haplotype HLA. Les gènes HLA étant transmis en bloc selon un mode autosomique co-dominant avec un pourcentage de recombinaison de 1 % seulement, le typage HLA du père présumé, de la mère et de l'enfant permet en cas de discordance de rejeter la paternité.

5) Génétique des populations

Le polymorphisme du système HLA est un outil extrêmement puissant pour l'étude de la génétique des populations humaines.

Abréviations :

- Ag : antigène
- Ig : immunoglobuline
- TCR : *"T-cell receptor "*
- CD : *"Cluster of differenciation"*
- KDa : kilo Dalton
- PM : poids moléculaire
- INFγ : interféron gamma
- TNF : *"tumor necrosis factor"*

Références

1- Immunobiologie. Charles A. *Janeway, Kenneth Murphy, Paul Travers, Marc Walport,. 3ème édition française, traduction de la 7ème édition anglaise par Pierre L. Masson.* De Boeck, 2009.

2- Fondements de l'Immunologie. Peter J. *Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt, traduction de la 7ème édition anglaise par Pierre Masson*. De Boeck, 2008.

3- Atlas de Poche d'Immunologie. *G. Burmester, A. Pezzutto*. Traduction française par P. V. Endert, 2ème édition. Médecine-Sciences Flammarion, 2005.

4- Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. *Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman*. Traduction de la 2ème édition anglaise. Elsevier, 2005.

5- Immunologie. Aide-mémoire illustré. David Male. Traduction de la 4ème édition anglaise par *Paul Fonteneau*. De Boeck, 2002.

6- Immunologie. Jean Pierre *Revillard avec la collaboration de l'Association des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue Française (ASSIM).* De Boeck, 2001.
7- Immunologie. Le cours de Janis Kuby. Avec questions de révision. *Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne. Traduction de la 4ème édition anglaise par Serge Weinman.* Dunod, 2001.
8- Immunologie Fondamentale. *Hatem Masmoudi et Amel Ben Ammar El-Gaaied.* Centre de Publication Universitaire, Tunis. 2000.
9- Immunologie. *I.M Roitt, J. Brostoff, D.K Male*. De Boek Université, 1994.
10- Immunologie clinique. J. *Brostoff, G.K Scadding, D. Male, I.M Roitt*. De Boek Université, 1993.
11- Les cytokines. *Jean Marc Cavaillon*. Masson, 1996.
12- HLA, Fonctions immunitaires et applications médicales. *Jacques Colombani*. John Libbey Eurotext, 1993.
13- Traité d'Immunologie. *Jean François Bach*. Flammarion Médecine Sciences, 1993.
14- Cours annuel de la Société Française d'Immunologie (SFI) 1991-1996, 2003.
15- Immunologie clinique ASSIM. *Medsi/Mc Graw-Hill*, 1990.
16- Immunologie générale ASSIM. *Medsi/Mc Graw-Hill*, 1990.
17- Méthodes en Immunologie. ASSIM. *Medsi/Mc Graw-Hill*, 1990
18- Cours d'Immunologie générale de l'Institut Pasteur de Paris. 1989, 1993.
19- Cours d'Immunopathologie de l'Institut Pasteur de Paris. 1988, 1992.