



HAL
open science

Introduction au CMH (classe I/classe II) Méthodes d'étude

R. Fauchet

► **To cite this version:**

R. Fauchet. Introduction au CMH (classe I/classe II) Méthodes d'étude. Annales de Recherches Vétérinaires, 1989, 20 (3), pp.329-335. hal-00901894

HAL Id: hal-00901894

<https://hal.science/hal-00901894>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Exposé de synthèse

Introduction au CMH (classe I/classe II) Méthodes d'étude

R. Fauchet

*Centre régional de transfusion sanguine, laboratoire d'histocompatibilité, rue Pierre-Jean-Gineste,
35000 Rennes, France*

(reçu lors des journées d'animation scientifique du département de Pathologie Animale de l'INRA, Le complexe majeur d'histocompatibilité : structure et fonctions dans les différentes espèces, Maisons-Alfort, 14-15 septembre 1988)

complexe majeur d'histocompatibilité — réunion scientifique — structure — fonction

Introduction to MHC (class I/class II). Methods

major histocompatibility complex — scientific meeting — structure — function

Introduction

Le système HLA a trente ans. Quelques termes permettent aujourd'hui de le qualifier. C'est un système génétique en évolution permanente. C'est un système polymorphique, mais aussi, avant tout, un système biologique, fonctionnel qui reste encore complexe en 1988.

L'historique sera bref et divisé en deux grandes périodes : celle de 1950-1958, période de la découverte, celle de 1964 à 1988, période de séminaires internationaux.

En 1950, trois équipes simultanément mettent en évidence dans le sérum de sujets allo-sensibilisés (multipares, poly-

transfusés), l'existence de leuco-agglutinines (anticorps agglutinant des leucocytes). Ainsi J. Dausset décrit le premier antigène «MAC», J. Van Rood (Leiden) propose un système à deux allèles (4a-4b) ainsi que R. Payne (Stanford) (La1-La2).

Jean Dausset pense, en premier, que ces différents antigènes peuvent faire partie d'un système unique : le système HU1 (Humain n° 1) devenu le système HLA («Human Leucocyte Antigens») reconnu par un Comité international de nomenclature.

Depuis, des groupes de travaux collaborant sur le plan international ont permis d'en faire la présentation d'aujourd'hui.

Définition et cartographie du chromosome 6

Le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme ou système HLA est formé d'un groupe de gènes étroitement liés, présents sur le bras court du chromosome 6, codant pour des molécules de Classe I (HLA-A, B, C) et des molécules de Classe II (HLA-DR, DQ, DP).

La cartographie du chromosome 6 montre que les molécules de Classe I sont de position télomérique. Ce sont les gènes HLA A, B, C positionnés sur 0,8 CM. Quant aux gènes de Classe II, ils sont de position centromérique : DR, DQ, DP. Ils constituent la région HLA-D et sont étagés sur une distance de 1,5 CM.

La famille des gènes de Classe I

Les gènes de structures Classe I sont évidemment tous identiques constitués d'alternance d'introns non codants et d'exons codants. Un gène de structure possède 7 exons. L'exon 1 est la séquence signal SS. Les autres exons codent pour des domaines divers de la molécule 2, 3 et 4 pour les domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ externes, l'exon 5 pour la partie transmembranaire et les exons 6, 7 pour la partie intra-cytoplasmique.

Les molécules codées sont biochimiquement définies et se présentent sous forme d'hétérodimères α , β , d'une chaîne lourde (α) (44 000 Da) et d'une chaîne légère (β) (12 000 Da). La représentation schématique de la molécule HLA B7 en est un exemple. $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ sont les domaines externes de la glycoprotéine de membrane, $\alpha 3$ étant la zone d'ancrage à la surface cellulaire $\alpha 1$ et $\alpha 2$, les domaines variables, port de l'allo-spécifi-

cité, donc des motifs antigéniques ou épitopes. La $\beta 2m$ permet l'expression de l'allospécificité. La partie transmembranaire est hydrophobe et la partie intracytoplasmique hydrophile.

Les gènes codent pour des molécules, glycoprotéines de membrane qui vont s'exprimer à la surface sous forme d'antigènes qui définissent le polymorphisme du système.

Les antigènes sont regroupés sous forme de 3 séries alléliques : HLA-A, HLA-B, HLA-C

Les allèles HLA sont nombreux : 24 pour le locus A, 50 pour le locus B et 11

pour le locus Cw. Aussi les combinaisons interlocus atteignent des chiffres impressionnants donnant au système HLA, la valeur d'un marqueur d'individualité, véritable empreinte digitale du soi.

Quelques caractéristiques permettent d'individualiser ce système par rapport aux autres systèmes génétiques.

La nomenclature

Elle sera la suivante pour l'ensemble des spécificités : une lettre, celle du locus codant, un chiffre (1, 7, 8) individualisant l'antigène.

La notion de fréquence

Chaque antigène existe dans la population avec une fréquence spécifique. Exemple : la distribution de l'antigène B7 s'établit selon un gradient de prévalence nord ouest/sud en France de 0,17 à 0,55, qui correspond au gradient de la sclérose en plaques corrélée à l'antigène B7 et ce, non seulement en France, mais aussi dans l'Europe.

Les déséquilibres de liaisons

Les séries alléliques ne sont pas indépendantes. En effet, à partir des fréquences antigéniques, il est possible de déduire la fréquence d'une association entre deux antigènes. Il apparaît alors que certains antigènes sont plus fréquemment associés entre eux que ne le voudrait le simple hasard, A3-B7, A1-B8 étant les déséquilibres les plus représentatifs, déséquilibres également surreprésentés dans les maladies (sclérose en plaques et maladies auto-immunes, respectivement).

Les épitopes partagés

Cette notion s'entend à deux niveaux : les subdivisions antigéniques, exemple A9 (A23, A24), B12 (B44-B45), définies par l'existence d'un épitope commun à A9 (A23, A24) mais aussi d'épitopes spécifiques individualisant l'allèle A23 de l'allèle A24.

Cette notion d'épitopes communs est retrouvée au niveau des réactions dites croisées entre deux spécificités, par exemple A2-A28. Les anticorps monoclonaux et leur analyse par cytométrie de flux ont précisé cette notion. Aussi, la production d'un anticorps monoclonal par l'immunisation d'une souris Balb/C avec des lymphocytes d'un sujet homozygote A2-A2, a démontré l'existence des épitopes communs entre A2 et A28. En effet 99% des cellules A2 sont marquées mais aussi 68% des cellules A28.

La distribution des antigènes HLA permet déjà d'évoquer le rôle fonctionnel de ces molécules. La distribution est ubiquitaire sur l'ensemble des cellules macrophages, lymphocytes, plaquettes, réticulocytes mais partiellement sélective sur les globules rouges (seules certaines spécificités sont exprimées), sur les mêmes cel-

lules en lignées T ou B, sur l'ensemble des tissus, la richesse est décroissante du tissu rénal aux tissus hépatique, pulmonaire, cardiaque, musculaire et totalement absente des tissus cérébraux et cartilagineux. Les glycoprotéines des membranes décrites antérieurement sont donc des antigènes tissulaires, et de ce fait, des antigènes de transplantation, molécules spécifiques, molécules de transplantation permettant de définir la notion d'identité ou de non identité entre un donneur et un receveur. Ces molécules sont fonctionnelles.

Fonctions des molécules de Classe I : Ce sont des marqueurs du soi pour les lymphocytes T cytotoxiques. Les lymphocytes T reconnaissent le soi : molécule de Classe I plus l'antigène (antigène viral) ou des molécules de Classe I, allo-déterminants d'un autre individu. Les molécules Classe I sont les cibles des cellules T cytotoxiques engendrées *in vitro*, en cultures lymphocytaires mixtes entre deux individus HLA Classe I et Classe II différents. La reconnaissance des molécules Classe I sur la cible par des effecteurs lymphocytaires T CD8 fait intervenir plusieurs structures moléculaires : le récepteur T CR dans sa sous-unité T α , β , couplée avec la molécule CD3 va reconnaître l'antigène étranger et la partie polymorphique des molécules Classe I; la molécule CD8 est le récepteur de la partie monomorphique des molécules de Classe I; des molécules d'adhésion LFA1 viennent renforcer le contact effecteur-cellule cible.

Ce rôle dans la reconnaissance et la présentation antigénique a trouvé sa démonstration et sa confirmation par les résultats de l'étude cristallographique de la molécule HLA-A2.

L'analyse tridimensionnelle des domaines α 1, α 2 des molécules Classe I permet d'identifier, à la surface de la molécule, une cavité entre les deux

hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$. La taille de cette cavité en fait un candidat de réceptable pour les antigènes étrangers, non pas sous leur forme native mais sous leur forme de peptides courts. L'ensemble serait reconnu par les structures moléculaires des récepteurs des cellules T.

La famille des gènes de classe II

La représentation schématique des gènes de Classe II, depuis le centromère, individualise les 3 sous-régions: DP, DQ, DR, chaque sous région étant constituée de gènes A et de gènes B dont certains sont fonctionnels : A2-B2 pour DP (molécules DP1 à DP7), AB pour DQ (DQ1 à DQ7), pour DR, il existe un seul gène A et trois gènes fonctionnels B1, B2, B4, selon la combinatoire des gènes A et B, les molécules codées sont différentes AB1 (DR1 à DRw16) AB3 (DR2a, b, c) AB4 (DR53).

Les gènes codent pour des molécules hétérodimériques AB (α , β) dont la partie extramembranaire est glycosylée, formée de sous domaines A1, A2, B1, B2. A2 et B2 en représentant les parties constantes, A1 et B1 les parties variables. Les molécules s'individualisent par le port de la spécificité chaîne B pour DR, chaînes A et B pour DQ, DP.

Le polymorphisme généré est de 3 séries alléliques : DR (20 allèles : DR1 à DRw18, DRw52, DRw53), DQ (9 allèles : DQw1 à DQw9), DP (6 allèles : DPw1 à DPw6).

Les mêmes caractéristiques de nomenclature, de fréquence, d'épitopes partagés, existent au sein des gènes de Classe II, les déséquilibres de liaison sont encore plus étroits entre DR et DQ. Une même spécificité DQ est en déséquilibre

avec plusieurs haplotypes DR : DQw3-DR5, DQw3-DR4, DQw3-DR9.

Deux exemples sont choisis pour l'évolutivité du polymorphisme au sein des gènes de classe II : DR2 et DQw1.

En 1987, lors du 10^e séminaire international de New York, la spécificité DR2 a été définitivement considérée comme composée de 2 variantes DRw15 et DRw16 sur des données d'analyse sérologique, de réactifs de référence, DRw16 étant défini par la négativité d'un groupe de sérum.

De même la spécificité DQw1 est apparue hétérogène, formée de deux variantes DQw5 et DQw6, définies à la fois par des réactifs connus DQw1 (*DQw5 + DQw6*) et par des réactifs spécifiques DQw5 ou DQw6.

Une nouvelle spécificité DQw a été découverte et admise par le Comité de nomenclature : l'antigène DQw4. En 1987, une équipe japonaise (ISHIKAMA) à l'aide d'un anticorps monoclonal, a immunoprécipité une molécule structurellement différente de DR mais répondant aux critères de définition d'une molécule DQ. Sur un matériel cellulaire de 804 cellules du séminaire DQw8 apparaît dans 70% des cas en déséquilibre avec l'haplotype DRw8, DQw4 se présente comme un allèle de DQw1, DQw2, DQw3.

Les 3 familles de gènes de Classe II et leurs séries alléliques sont donc des produits de gènes différents et les marqueurs génétiques DW impliqués dans la réaction lymphocytaire mixte sont la résultante des incompatibilités cumulées : DR, DQ, DP.

La distribution des antigènes de Classe II est restreinte par rapport à celle des antigènes de Classe I. En particulier, ces antigènes sont absents des lymphocytes T au repos, des plaquettes, mais sont présents sur les cellules dites «présentatrices d'antigènes», celles dendritiques, cellules

du système de Langherhans, monocytes, macrophages. L'activation des lymphocytes T par mitogène PHA et/ou cellules allogéniques induit l'expression Classe II. L'analyse des cellules lymphoblastiques non T montre une expression différentielle de ces molécules avec plusieurs schémas de figure : DR+ DP+ DQ+, DR+ DP+ DQ-, DR+ DP- DQ-. Les molécules de Classe II apparaissent à la fois comme des marqueurs d'activation mais aussi comme des marqueurs de différenciation cellulaire.

Les molécules de Classe II sont fonctionnelles, et interviennent dans l'induction de la réponse immunitaire. Ce sont des cellules présentatrices de l'antigène étranger (virus, bactéries, alloantigènes de greffe) aux lymphocytes T, dans le contexte des structures moléculaire CD4, du récepteur TcR (Ti α , β) et de CD3.

Transmission des gènes HLA

Le système HLA est un système génétique, chaque individu exprime par chromosome un allèle de chaque locus A, C, B, DR, DQ, DP et, par paire chromosomique, deux allèles de chaque locus. L'analyse de fratries permet de définir les haplotypes (au nombre de deux par individu) correspondant à l'organisation des gènes.

La transmission se fait sous forme d'haplotypes. Dans une fratrie, des germains peuvent ainsi être HLA identiques (les deux haplotypes sont communs), HLA semi-identiques (un seul haplotype est commun) ou HLA différents (aucun haplotype en commun) (Fig. 4).

Méthodes d'étude

Plusieurs outils permettent aujourd'hui l'étude du système HLA, des produits aux

gènes, dans leur polymorphisme et leurs fonctions.

Les méthodes sérologiques

C'est le phénotypage HLA-A, B, C/DR, DQ, DP par test de microlymphocytotoxicité sur les lymphocytes T (antigènes de Classe I), sur les lymphocytes B (antigènes de Classe II), à l'aide de réactifs allosériques ou mieux : anticorps monoclonaux.

Les méthodes cellulaires

Elles utilisent des cellules homozygotes HLA-DW (Dw1, Dw1 à Dw26-Dw26), cellules stimulantes, en culture lymphocytaire, d'une cellule à typer. L'absence de réactivité est le témoin d'un déterminant partagé entre la cellule de typage homozygote et la cellule à typer.

La deuxième technique cellulaire utilise des clones allo-réactifs anti-DR1, anti-DR2.

Les méthodes biochimiques

Elles permettent l'analyse structurelle du produit. Les molécules antigéniques sont extraites par détergents, marquées à la méthionine 35 (^{35}S) et analysées en gel de polyacrylamide selon le paramètre des points iso-électriques, c'est l'«iso-électrofocusing» (IEF), en gel de polyacrylamide bi-dimensionnel, excellente méthode pour les molécules de Classe I : les molécules sont étudiées selon deux paramètres, point iso-électrique, poids moléculaire, et seront révélées sur les auto-radiogrammes sous forme de spots.

C'est une méthode d'analyse du polymorphisme structurel des chaînes B DR,

DQ, DP et A DQ-DP. Le choix des anticorps immuno-précipitants est essentiel. Elle permet d'établir la diversité structurelle moléculaire et la définition des nouvelles molécules de Classe II.

L'étude des gènes

Elle s'entend à plusieurs niveaux :

— Le polymorphisme de l'ADN est étudié par la technique des fragments de restriction RFLP ou Southern-blot. L'ADN digéré par des enzymes aux sites restrictifs connus est ordonné par électrophorèse, selon la taille des fragments. Les fragments dénaturés sont ensuite hybridés par des sondes d'ADNc marquées au ³²P et autoradiographiées. Les sondes utilisables sont des sondes locus-spécifiques PHLA1 (gènes de Classe I) B DR, A DR, B DQ, A DQ, B DP A DP, mais aussi des sondes courtes de synthèse ou oligonucléotides par exemple : DR52a, DR52b, DR52c.

Le 10^e séminaire d'Histocompatibilité a permis d'établir une carte de distribution des fragments de restriction de chaque spécificité DR pour 7 enzymes. Cette information essentielle permet aujourd'hui, malgré l'importance du polymorphisme d'utiliser la technique RFLP comme moyen de contrôle sérologique.

— La séquence des gènes HLA est commencée. Plusieurs gènes sont aujourd'hui séquencés : DR2, DR4, DQw1, DQw3, ce qui permet le début de comparaison de séquences des gènes d'individus malades par rapport aux gènes d'individus sains. Ainsi le gène DQw3 surreprésenté dans le diabète insulino-dépendant présente en position 57 l'alanine à la place de la valine du DQw3 d'individus sains.

La séquence des gènes permet une construction synthétique de sondes

courtes peptidiques ou oligonucléotidiques. Les oligonucléotides sont utilisables soit en «Southern Blot», soit en «Dot Blot», après le cycle d'amplification spécifique de l'ADN (PCR). C'est une méthode du futur, prometteuse mais limitée aujourd'hui par le nombre restreint d'oligonucléotides disponibles.

— La transfection des gènes est une technique plus sophistiquée et de recherche. A partir d'une banque génomique, des fragments d'ADN sont clônés dans des vecteurs bactériophages ou cosmides, et, sont hybridés, après transfert ou *in situ*, par des sondes locus spécifiques, antigènes spécifiques ou par des oligonucléotides.

Les gènes isolés sont alors transfectés dans une cellule L (fibroblaste de souris) ou P815. Des transfections ont été aussi réalisées pour des gènes de Classe I par B. Malisen, pour les gènes de Classe II par B. Mach. Les transfectants constituent alors un matériel de choix pour l'étude d'un gène dans sa fonction et dans ses produits structuraux.

Cet aspect des moyens d'étude peut se clore par une stratégie d'étude des groupes HLA. La sérologie reste aujourd'hui la technique de base pour la définition des antigènes HLA-A, B, C, DR, DQ. Cependant, des groupes d'interprétation difficile existent et d'autres outils permettent la résolution des difficultés : IEF pour les antigènes de Classe I, RFLP, gel bi-dimensionnel pour les antigènes de Classe II. Les oligonucléotides se profilent d'une manière prometteuse comme méthode de groupage pour le futur.

Les perspectives

Le système HLA est un système évolutif. Aujourd'hui trois nouvelles voies d'étude

semblent des plus prometteuses : la régulation des gènes HLA, les antigènes solubles, les nouveaux gènes de la région HLA-A.

L'étude de la régulation des gènes doit permettre de comprendre les défauts d'expression qualitative ou quantitative des gènes HLA et se doit de répondre au pourquoi de l'absence d'expression des antigènes de Classe II sur lymphocytes T et de leur présence sur ces mêmes cellules activées, de l'absence d'expression dans certains déficits immunitaires (B. Mach). Récemment D. Krangel a démontré l'existence dans les sérums humains de molécules HLA Classe I solubles. Est-ce la contre partie de molécules QA secrétées (Qa2, Qa10) chez la souris ou chez le rat ? ou s'agit-il de molécules tronquées, formées des sous-domaines extérieurs à $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ par délétion au niveau des exons intramembranaires ou intracytoplasmiques ?

La question posée est, bien sur, le rôle de ces molécules dans la genèse de l'allo-immunisation, dans les signaux cellulaires.

Enfin de nombreux gènes sont aujourd'hui décrits dans la région HLA-A et viennent confirmer les premières données de la biologie moléculaire. Un gène a été retenu et positionné par le Comité de nomenclature : le gène HLA-E entre le locus A et le locus C (D. Geraghty). D'autres gènes fonctionnels sont décrits mais non encore définitivement cartographiés : le gène J328, le gène RS5, le gène HA2 (P. Paul). Certains de ces gènes peuvent être des équivalents Qa de la souris.

Conclusion

Le système HLA est un système génétique, hautement polymorphique, marqueur individuel du soi, dont le rôle fonctionnel est de mieux en mieux compris. Ses diverses approches : sérologique, cellulaire, moléculaire, structurelle et génomique forment un tout dont la finalité est de préciser les épitopes réellement impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire mais aussi, leur rôle non immunologique.

Références

- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L. & Wiley D.C. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 129, 506-518
- Bodmer W.F. (1984) The HLA system. In : *Histocompatibility Testing*, 11-22 (E.D. Albert, ed.) Baur MP, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Bourel D., Fauchet R., Chevrin A.M., Dejour G., Merdignac G. & Genetet B. (1984) Anti-HLA A2 and A28 monoclonal antibodies. Production and study of the cross-reaction. *Tissue Antigens* 23, 274-279
- Charron D.J. & McDevitt H.O. (1980) Characterisation of HLA-D antigens by two dimensional gel electrophoresis. *J. Exp. Med.* 152, 185-200
- Dausset J. (1953) Immuno-hématologie des plaquettes et des leucocytes. *Presse Méd.* 61, 1553
- Dausset J., Ivanyi P.H. & Ivanyi D. (1965a) Tissue alloantigens in humans : identification of a complex system (HU-I). *Histocompatibility Testing* 51
- Dausset J. & Pla M. (1985) *HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'Homme*, Flammarion Médecine-Sciences, Paris

- Geraghty D.E., Koller B.H. & Orr H.T. (1987) A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9145-9149
- Ishikawa N., Kojima H., Nakayama T., Kunikane H., Hawkin S., Fukasawa Y., Ikeda H., Ogasawara K., Kasahara M., Tajima Y., Kakuta Y., Wakisaka A. & Aizawa (1987) Detection of a novel HLA-DQ specificity : serological and immunochemical analyses by a monoclonal antibody. *Immuno-Genetics* 26,3, 143-149
- Krangel M.S. (1986) Secretion of HLA-A and -B antigens via an alternative RNA splicing pathway. *J. Exp. Med.* 163, 1173-1190
- Lotteau V., Teyton L., Burroughs D. & Charron D.J. (1987) DR α -DQB : novel HLA class II molecule. *Nature* 329-339
- Paul P., Fauchet R., Boscher M.Y., Sayagh B., Masset M., Merdrignac G., Dausset J. & Cohen D. (1987) Isolation from the human MHC of a Class I gene encoding a non ubiquitous molecule expressed on activated lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2872-2876