

Immunogénétique du complexe majeur d'histocompatibilité et transplantation de cellules souches hématopoïétiques

Jean-Marie Tiercy

Le polymorphisme HLA et la transplantation de cellules souches hématopoïétiques

Le rôle biologique des antigènes HLA est de présenter des peptides dérivés de pathogènes aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ ou aux lymphocytes T auxiliaires CD4⁺. Ce processus, connu sous le terme de «présentation d'antigène HLA-restreinte», permet la reconnaissance du soi et du non-soi (pathogènes) [1]. La base moléculaire de l'activation des cellules T réside dans l'interaction du récepteur des lymphocytes T avec un complexe HLA + peptide. Mais les cellules T sont également capables de reconnaître des molécules HLA allogéniques, de sorte que la réponse immune contre un ou plusieurs antigènes HLA incompatibles représente un obstacle majeur en transplantation clinique. La capacité des tests d'histocompatibilité à reconnaître ces incompatibilités et les critères de sélection des donneurs vont donc avoir des conséquences importantes pour la survie des greffes.

Le système HLA comprend 12–15 gènes qui codent pour les antigènes HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, et -DP caractérisés par un fort degré de polymorphisme allélique (figure 1). Initialement détectés par sérologie en utilisant comme réactifs des sérums de femmes multipares immunisées contre les antigènes HLA paternels du fœtus, une centaine de sérotypes sont maintenant couramment analysés. Cependant le clonage des gènes HLA a ouvert la voie à une caractérisation de la diversité allélique des antigènes HLA. La quasi totalité des sérotypes sont maintenant subdivisés en variants alléliques (parfois avec >50 allèles/sérotipe) ce qui résulte en une diversité globale de 1500 allèles HLA (figure 1) [2, 3].

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est un traitement reconnu, et parfois le seul traitement curatif, pour les hémopathies malignes (leucémies) et les dé-

fauts génétiques du système immunitaire [4]. Bien que les thérapies immunosuppressives aient bénéficié de progrès importants, les complications post-greffe telles que les infections, le rejet et, plus fréquemment, la maladie du greffon-contre-l'hôte médiée par les lymphocytes T du donneur, compromettent encore sérieusement le succès des greffes. La compatibilité HLA entre patient et donneur de CSH (prélevées dans la moelle osseuse ou à partir du sang périphérique) est un paramètre essentiel qui détermine le succès de la greffe: le risque de non-prise de la greffe ainsi que de maladie du greffon-contre-l'hôte augmente avec le degré de disparité HLA [5, 6]. Un donneur familial HLA compatible peut être identifié pour 20–30% des patients, et pour les autres patients une recherche de donneur non apparenté peut être proposée. Les greffes de CSH provenant de donneur non apparenté représentaient 8,5% des greffes allogéniques en 1990, 22% en 1996, puis 31% en 2000 [7]. Cette constante augmentation résulte de la mise en réseau par le Registre BMDW de plus de 8 millions de donneurs volontaires de groupes HLA connus, inscrits dans les différents registres nationaux, dont la Suisse fait partie [18].

La sélection des donneurs, initialement basée sur un groupage sérologique HLA-A, -B, -DR, est rendue difficile en raison de la diversité allélique non détectée cette méthode. Autrement dit, deux individus peuvent apparaître HLA-ABDR identiques après une analyse sérologique, mais incompatibles pour chacun de ces loci, lorsque le groupage HLA met en œuvre des techniques performantes au niveau moléculaire. Les laboratoires HLA appliquent maintenant ces techniques moléculaires pour détecter les variations de séquences alléliques HLA qui pourraient être cliniquement importantes en transplantation de moelle osseuse [2, 9]. Ces techniques permettent une meilleure résolution du polymorphisme HLA, donc une meilleure compatibilité HLA entre receveur et donneur, mais aussi une plus grande difficulté d'identi-

Abréviations:

BMDW:	Bone Marrow Donor Worldwide
CSH:	cellules souches hématopoïétiques
CTLpf:	fréquence des pré-curseurs des lymphocytes T cytotoxiques
HLA:	human leucocyte antigens
PCR:	polymerase chain reaction
TNF:	tumor necrosis factor

Travail soutenu par le Fonds national suisse de la recherche scientifique (bourses n° 31-057557.99 et 31-68260.02)

Correspondance:

Jean-Marie Tiercy PD, PhD
Laboratoire National de Référence pour l'Histocompatibilité
Unité d'Immunologie de Transplantation
Hôpital Cantonal Universitaire
CH-1211 Genève 14

Figure 1.

Représentation schématique des gènes HLA de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité sur le chromosome 6. Le système HLA comprend les gènes codant pour les chaînes α des antigènes HLA-A, -B, -C et, dans sa partie centromérique (c), les gènes codant pour les chaînes α et β des hétérodimères HLA-DR, -DQ, et -DP. Tous les individus ont un gène DRB1 et la plupart un deuxième gène DRB (DRB3 ou DRB4 ou DRB5) ce qui augmente encore la diversité du système HLA. Au total un individu hétérozygote peut donc exprimer 12-14 antigènes HLA différents (2 A, 2 B, 2 C, 2 à 4 DR, 2 DQ, et 2 DP). Un antigène défini par sérologie (sérotype) peut être subdivisé en plusieurs variants alléliques définis par la séquence de l'ADN (allèles). Par ex. l'antigène HLA-A2 comprend plus de 50 allèles (A*0201, 0202, 0203, etc.). Les molécules HLA de classe I (A,B,C) présentent aux lymphocytes T cytotoxiques CD8-positives des peptides dérivés de protéines endogènes (par ex. peptides viraux). Les molécules HLA de classe II (DR, DQ, DP) présentent aux lymphocytes T auxiliaires CD4-positives des peptides antigéniques dérivés d'antigènes exogènes (par ex. toxines bactériennes) [1]. c = centromère

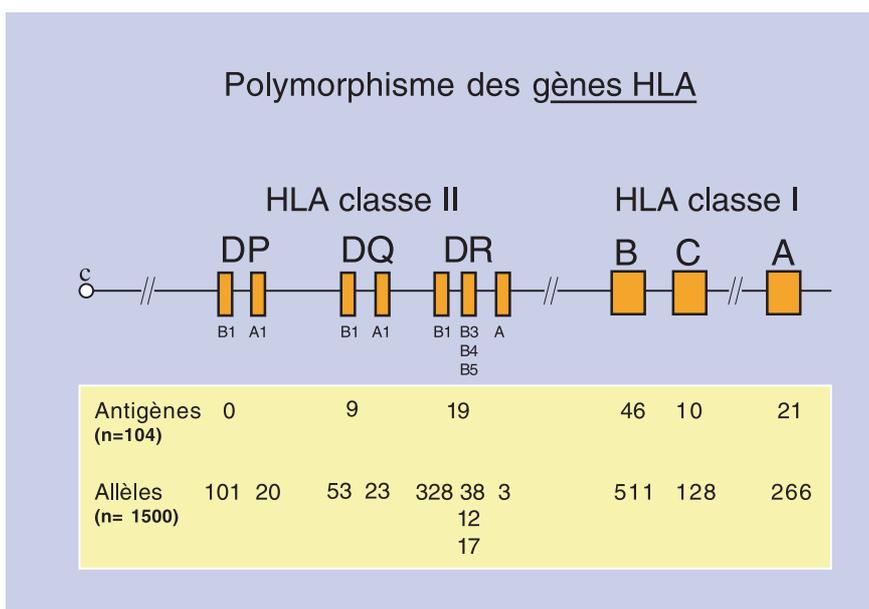


Figure 2.

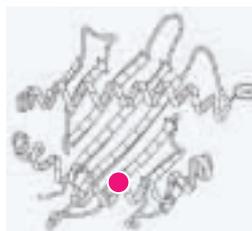
Identification des incompatibilités HLA non détectées par le groupage sérologique. Une compatibilité sérologique ne signifie donc pas nécessairement une compatibilité au niveau allélique (DNA). L'exemple montre une incompatibilité au niveau d'un antigène HLA de classe I (B35) qui induit une réponse cytotoxique *in vitro*. Le schéma représente la partie extracellulaire variable de l'antigène HLA (site de liaison des peptides) reconnue par les lymphocytes T, avec la différence en position 156 de la chaîne α entre les deux allèles B35.

Compatibilité HLA patient/donneur

Analyse sérologique:
HLA-A1, A2 ; B8, B35 ; DR3, DR11

Analyse moléculaire

Incompatibilité au niveau de l'antigène HLA-B35:
patient: B*3501
donneur: B*3508



différence d'un seul acide aminé entre les 2 allèles B35:

mismatch détecté par les lymphocytes T cytotoxiques (test *in vitro* de CTLpf)

fier un donneur qui présentera toutes les compatibilités alléliques requises. Il reste donc à déterminer quel est le rôle fonctionnel des incompatibilités HLA qui ne sont pas détectées par l'analyse sérologique classique.

Recherche

Bien que nos propres travaux [10] ainsi que ceux d'autres centres [5, 6] aient démontré l'importance de la compatibilité des allèles HLA de classe I et II, le rôle de chacun des loci HLA respectifs reste à définir.

Nos travaux de recherche ont porté sur les questions suivantes:

- Les incompatibilités HLA-A, -B, -C non détectées par la sérologie sont-elles toutes reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques?
- Le polymorphisme allélique HLA est-il entièrement décrypté?
- Les incompatibilités HLA au niveau des différents loci sont-elles de même importance (études cliniques des greffes de moelle osseuse avec donneur non apparenté)?
- Quelle est la diversité des associations entre différents antigènes HLA (haplotypes) dans la population?
- D'autres facteurs immunogénétiques (par ex. polymorphisme des gènes des cytokines et de leurs récepteurs) corrélerent-ils avec les complications post-greffe?

Suite au clonage des premiers gènes HLA et à l'introduction de la technique d'amplification par PCR, notre laboratoire a développé différentes méthodes de groupage, d'abord pour les gènes HLA-DRB1/B3/B5 [11], puis pour les gènes HLA-A, B, C [12, 13]. Ces méthodes appliquées dans le cadre des transplantations de moelle allogéniques ont permis la détermination de nombreuses incompatibilités HLA non détectées par la méthode d'analyse sérologique [14].

Nous avons analysé par les techniques moléculaires de multiples combinaisons patient/donneur considérées comme HLA compatibles selon les techniques classiques et démontré que plus de 50% des paires présentaient une ou plusieurs incompatibilités. Selon l'exemple illustré dans la figure 2, patient et donneur sont HLA sérologiquement compatibles, mais une analyse moléculaire révèle une incompatibilité allélique au niveau de l'antigène B35 (allèle B*3501 chez le patient versus B*3508 chez le donneur). Nous avons démontré que la quasi totalité des combinaisons HLA classe I incompatibles sont positives dans un test *in vitro* de détermination des précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques (test de CTLpf) [14]. Ces incompatibilités sont donc fonctionnellement importantes.

La combinaison des techniques de sérologie et de biologie moléculaire nous a permis également de découvrir plusieurs variants appartenant à une nouvelle catégorie d'allèles HLA, qui ne sont pas (*null antigens*) ou très peu (*low antigens*) exprimés à la surface cellulaire [15, 16].

Une étude clinique des patients greffés en Suisse (1990–2000) avec CSH provenant de donneur non apparenté a permis de mettre en évidence le rôle des incompatibilités HLA déterminées par les techniques moléculaires. Les courbes actuarielles Kaplan-Meier ont montré une survie à 5 ans de 62% en cas de compatibilité HLA complète, de 40% pour les patients avec mismatch HLA-C seul, et de 16% pour les patients avec incompatibilité(s) au niveau des loci HLA-A, -B, ou -DRB1 [17]. Dans le cadre d'une étude en collaboration européenne, nous avons pu confirmer chez les patients CML (chronic myeloid leukemia) que l'incompatibilité au niveau du locus HLA-C était

associée à un risque de mortalité accru. En résumé, nos résultats suggèrent que les antigènes HLA-C, bien qu'ils soient exprimés plus faiblement à la surface par rapport aux antigènes HLA-A, B et donc probablement moins immunogéniques, constituent néanmoins un obstacle à la transplantation et doivent donc être pris en compte lors de la sélection des donneurs.

Les polymorphismes des gènes TNF α , TNF δ , TNF-308, IL-1 β , IL-1Ra, IL-10, IL-4R ont été analysés chez les patients greffés avec des cellules souches hématopoïétiques de donneur non apparenté compatible. La présence de certains allèles du locus TNF δ chez les patients greffés était corrélée avec un risque accru de décès dans les 3 mois post-greffe.

Perspectives

Des études à large échelle et avec des groupes de patients encore plus homogènes sont nécessaires pour confirmer les premiers résultats quant au rôle respectif de chacun des gènes HLA. Il est possible que pour un locus HLA donné toutes les incompatibilités n'induisent pas la même réponse alloréactive, et pourraient donc être cliniquement moins importantes. Il existe au moins deux exemples assez fréquents dans le cas des antigènes de classe I et de classe II où, dans les tests cellulaires *in vitro*, ces incompatibilités n'induisent pas de réactivité ou une réactivité très faible. De plus l'analyse de marqueurs non-HLA (cytokines, chemokines, récepteurs, etc.) pourrait permettre une meilleure caractérisation de groupes de patients à plus fort risque de complications post-greffe. Les études d'associations entre les antigènes HLA codés sur le même chromosome (haplotypes) effectuées dans différentes populations seront informatives pour améliorer l'efficacité des recherches de donneurs HLA compatibles. Une banque de données avec les différents haplotypes identifiés pour les spécificités HLA les plus fréquentes est également un objectif du laboratoire. Hormis le domaine de la transplantation, l'analyse du polymorphisme HLA par les techniques moléculaires [18] ouvre des perspectives prometteuses en génétique des populations humaines.

Références

- 1 Klein, J. The HLA system. *New Engl J Med* 2000;343:702–9.
- 2 Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens* 2002;60:407–64.
- 3 Tiercy JM. Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. *Transpl Immunol* 2002;9:173–80.
- 4 Thomas ED. Karnofsky memorial lecture: marrow transplantation for malignant disease. *J Clin Oncol* 1983;1:517–31.
- 5 Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, et al. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* 1998;92:3515–20.
- 6 Sasazuki T, Juji T, Morishima, et al. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic

- stem cells from an unrelated donor. *New Engl J Med* 1998;339:1177-85.
- 7 Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A. Accreditation Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 2002;100:2374-86.
 - 8 Nicoloso de Faveri G, Kern M, Schneider P. Le Registre suisse des donneurs de moelle. *Med Hyg* 2002;60:858-62.
 - 9 Tiercy JM, Villard J, Roosnek E. Selection of unrelated bone marrow donors by serology, molecular typing, and cellular assays. *Transpl Immunol*. 2002;10:215-221.
 - 10 Speiser DE, Tiercy JM, Rufer N, Grundschober C, Gratwohl A, et al. High resolution matching associated with decreased mortality after unrelated bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:4455-62.
 - 11 Cros P, Allibert P, Mandrand B, Tiercy JM, Mach B. Oligonucleotide genotyping of HLA polymorphism on microtitre plates. *Lancet* 1992;340:870-3.
 - 12 Tiercy JM, Djavad N, Rufer N, Speiser DE, Jeannot M, Roosnek E. Oligotyping of HLA-A2, -A3, and -B44 subtypes. Detection of subtype incompatibilities between patients and their serologically matched unrelated bone marrow donors. *Hum Immunol* 1994;41:207-15.
 - 13 Grundschober C, Rufer N, Sanchez-Mazas A, et al. Molecular characterization of HLA-C incompatibilities in HLA-ABDR-matched unrelated bone marrow donor-recipient pairs. Sequence of two new Cw alleles (Cw*02023 and Cw*0707) and recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 1997;49:612-23.
 - 14 Roosnek E, Tiercy JM. Search for an unrelated HLA-compatible stem cell donor. *Curr Opin Hematol* 1999;6:365-70.
 - 15 Zanone-Ramseier R, Gratwohl A, Gmur J, Roosnek E, Tiercy JM. Sequencing of two HLA-A blank alleles: implications in unrelated bone marrow donor matching. *Transplantation* 1999;67:1336-41.
 - 16 Bettens F, Tiercy JM. Sequence of a new class I null allele within the HLA-B44 specificity. *Tissue Antigens* 2000;56:441-5.
 - 17 Tiercy JM, Chapuis B, Gratwohl A, Gmur J, Schanz U, et al. Unrelated HSCT: HLA-C disparities result in lower CTLp frequencies and are associated with improved patients survival compared to HLA-AB mismatches. In *HLA 2002 - Immunobiology of the human MHC*. Eds Hansen JA, Dupont B. IHWG press, Vol 1, in press.
 - 18 Sanchez-Mazas A, Steiner QG, Grundschober C, Tiercy JM. The molecular determination of HLA-Cw alleles in the Mandenka (West Africa) reveals a close genetic relationship between Africans and Europeans. *Tissue Antigens* 2000;56:303-12.