



Rôles fonctionnels du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Ghislaine Bernard

Quelques définitions (1)....

- Gène : région d'un chromosome contenant l'information nécessaire pour permettre la synthèse d'une protéine
- Allèle : se dit de deux caractères situés sur des chromosomes homologues
ex: groupe sanguin A, B, O
- Haplotype : moitié du patrimoine génétique sur une région donnée et hérité de l'un des parents
- Génotype : définition d'un individu selon ses gènes A/A ou A/O
- Phénotype : définition d'un individu selon le produit de ses gènes A
- Crossing-over ou enjambement : durant la méiose on assiste à la réduction du nb de chromosomes qui seront répartis dans les cellules filles (gamètes) pendant cette étape il existe des échanges de matériels génétiques (recombinaisons) entre 2 chromosomes homologues

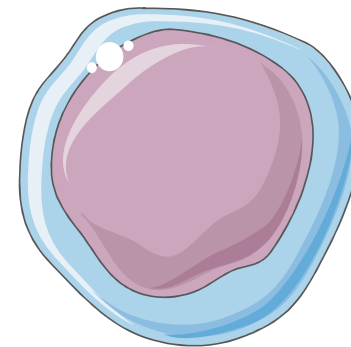
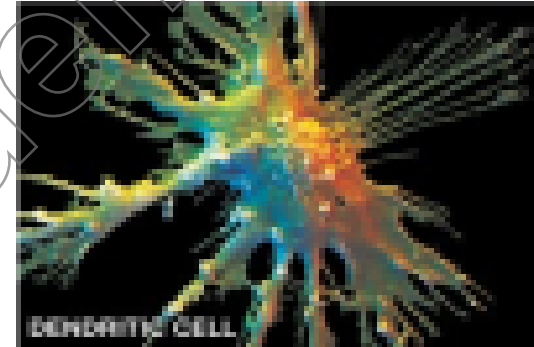
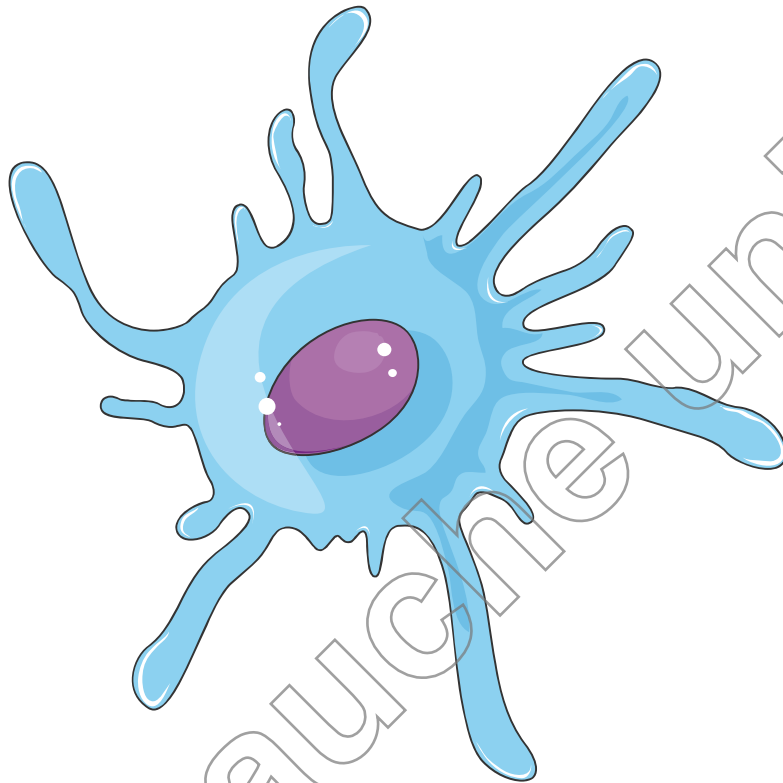
Quelques définitions (2)....

- Autogreffe : tissu d'un individu greffé sur lui-même (peau, moelle, veine...)
- Allogreffe : greffe entre individus d'une même espèce
- Greffe syngénique : greffe réalisée entre individus génétiquement identiques (souris de la même souche et jumeaux monozygotes)
- Xénogreffe : greffe réalisée entre individus d'espèce différente

Introduction

- Les antigènes peptidiques, pour être reconnus par les lymphocytes T doivent au préalable devenir accessible à un récepteur pour l'antigène présent à la surface du lymphocyte T = TCR
- La fonction de présentation des antigènes est assurée par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité = CMH

Cellules dendritiques



Lymphocyte T

Introduction

- La caractéristique majeure du CMH est son **extrême diversité**
- Identifié sur les leucocytes chez l'homme = HLA
Human Leucocyte Antigen
- Le polymorphisme conduit à une variabilité interindividuelle très importante pour présenter un peptide donné
- Le CMH détermine l'acceptation ou le rejet de greffes entre donneur et receveur différents

Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

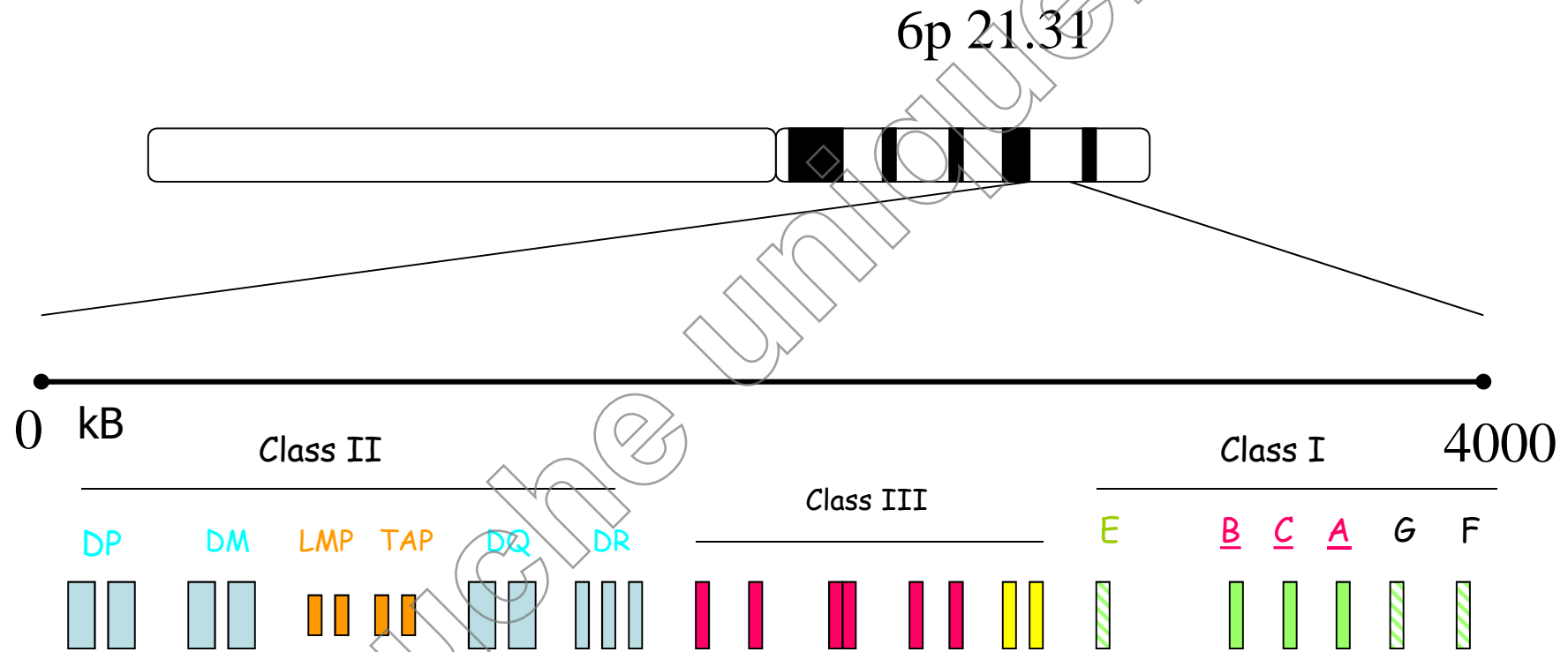


Déséquilibre de liaison : certains allèles
Sont observés, en association avec d'autres,
plus importante que leur fréquence
calculée ex A1, B8, DR3, DQ2 DPB1*0101

Classe III : complément, TNF

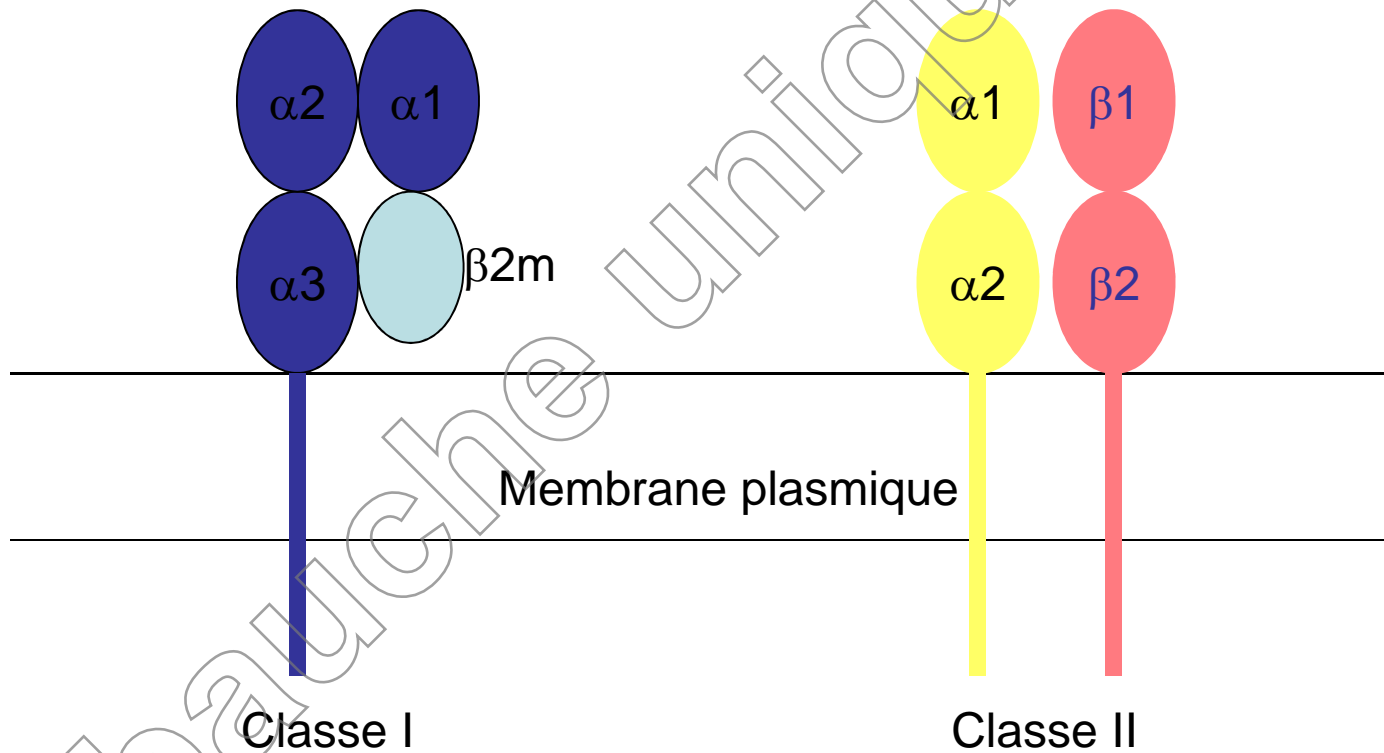
Glycoprotéines hétérodimériques

La chaîne lourde est codée par des gènes situés sur le bras court du chromosome 6 (région MHC)



La chaîne légère (b2 microglobuline) est codée sur chromosome 12

Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité



Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

- Depuis sa découverte chez la souris en 1936 le CMH a été un des systèmes les plus étudié
- En 1958, Jean Dausset découvrait un système de « groupes sanguins » sur les globules blancs. Technique agglutination. Prix Nobel en 1980

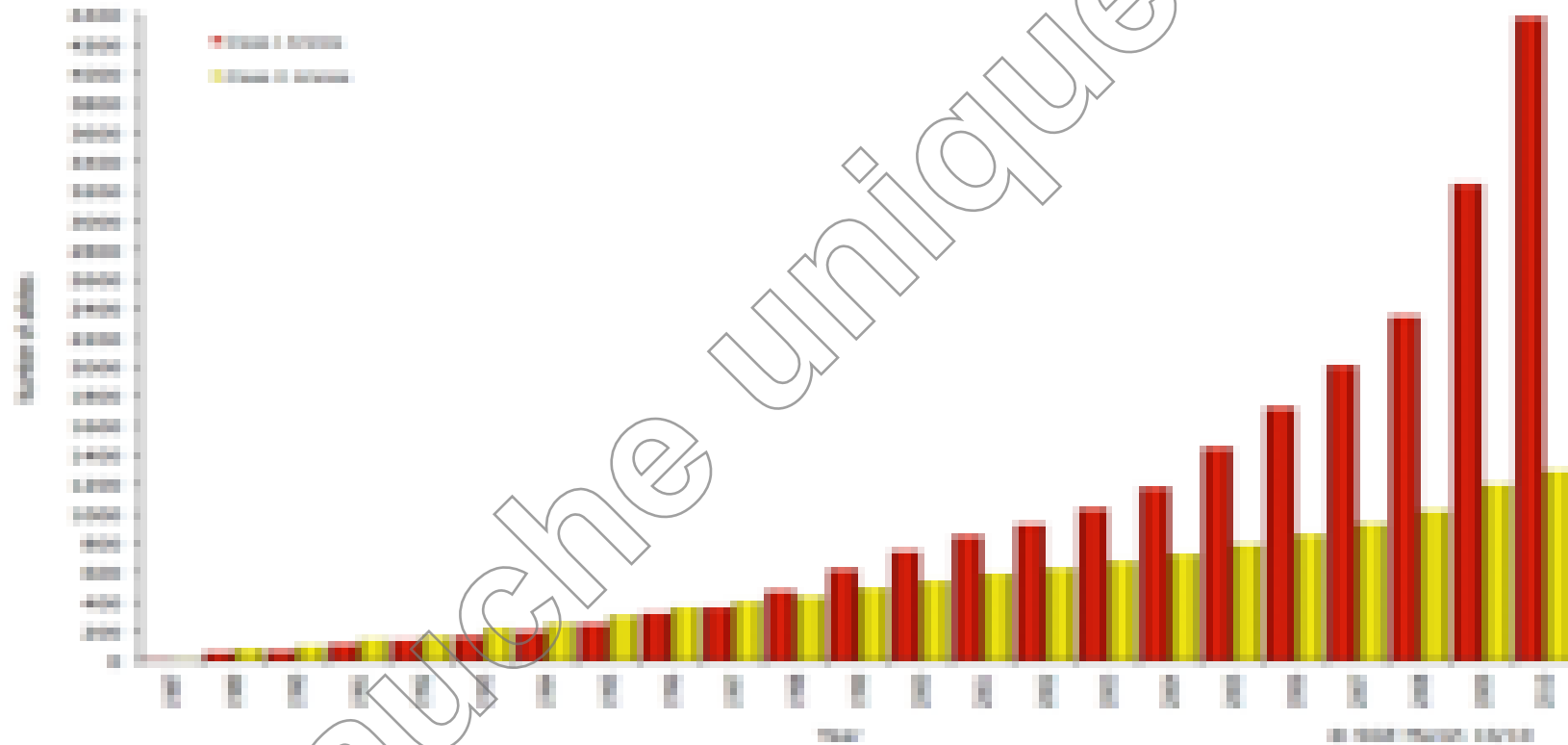
- Etudes internationales « Workshop »
1ère en 1964 6 sérums testés!

Introduction de la microlymphotoxicité par P.Terasaki

Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

- 2ème Workshop JJ van Rood
Analyse de cellules, analyses familiales
71 participants
- 3ème Workshop R. Ceppellini
11 familles, 21 donneurs non apparentés, 476
sérum
110 participants
Un seul système génétique avec 2 loci
Terme HLA est consacré

Polymorphisme CMH

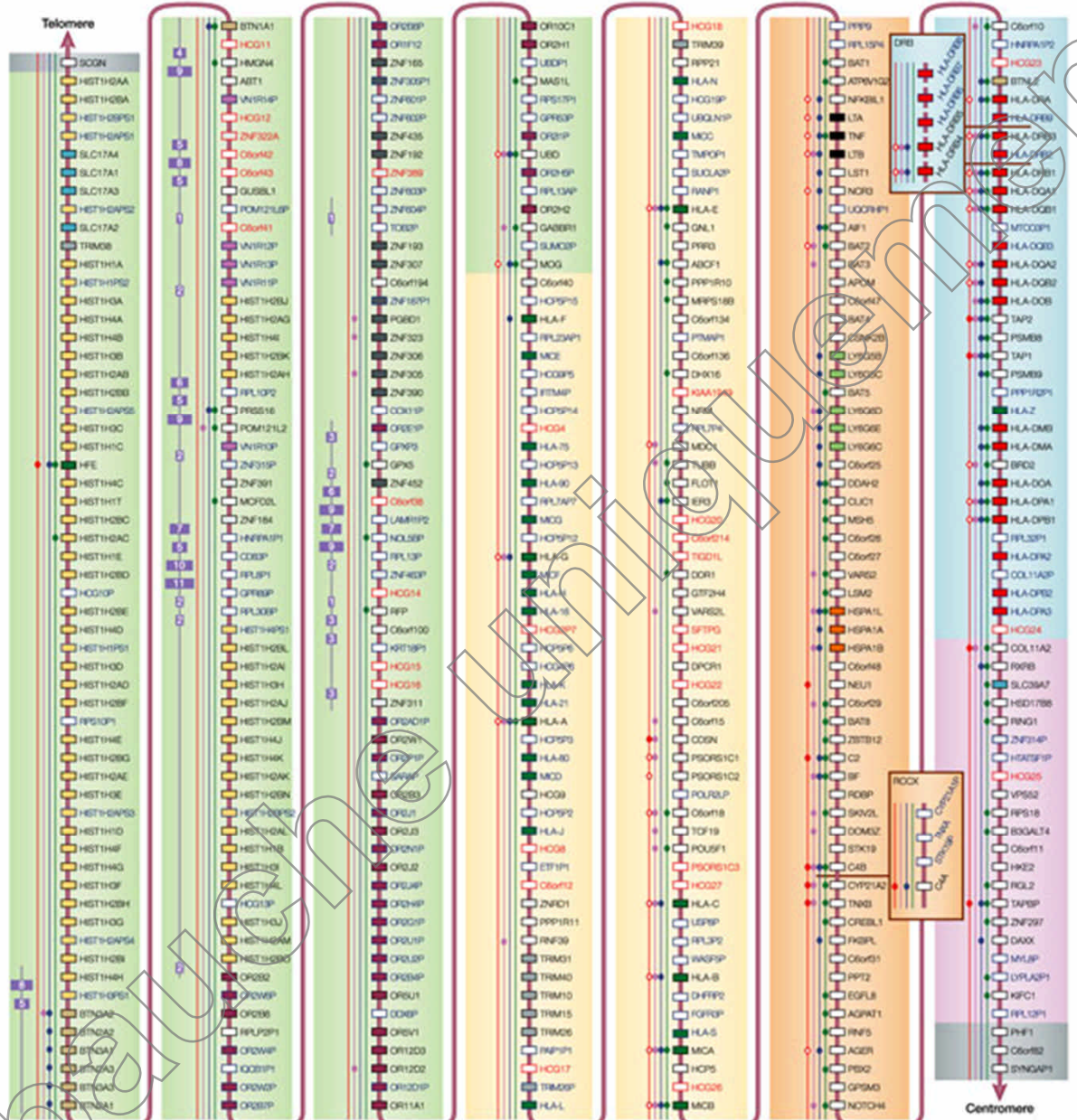


Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

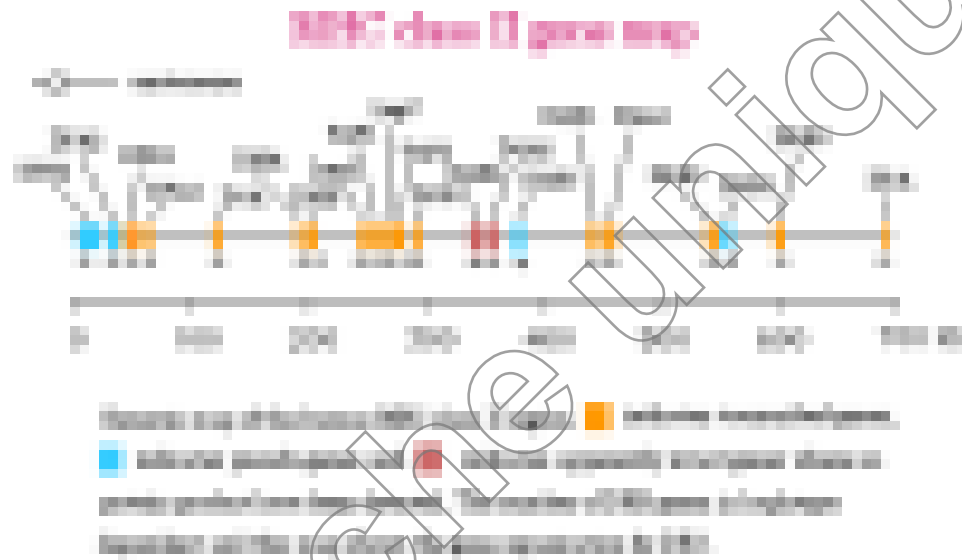
- Les antigènes HLA sont des glycoprotéines hétérodimériques
- Classe I : une chaîne lourde de 45 kD et une chaîne légère de 12 kD la β_2 microglobuline
- Classe II : une chaîne lourde α 34 kD et une chaîne légère β 29 kD

Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

- Les gènes codant pour le CMH sont localisés sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme (6p21.3)
- La région couvre 4 millions de paires de bases = 0,1% du génome et contient 100 gènes

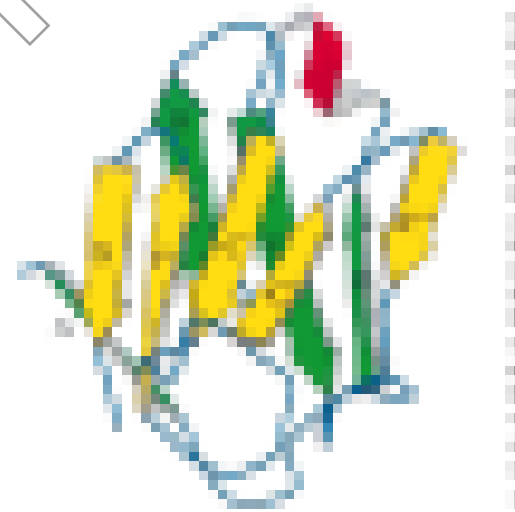


Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

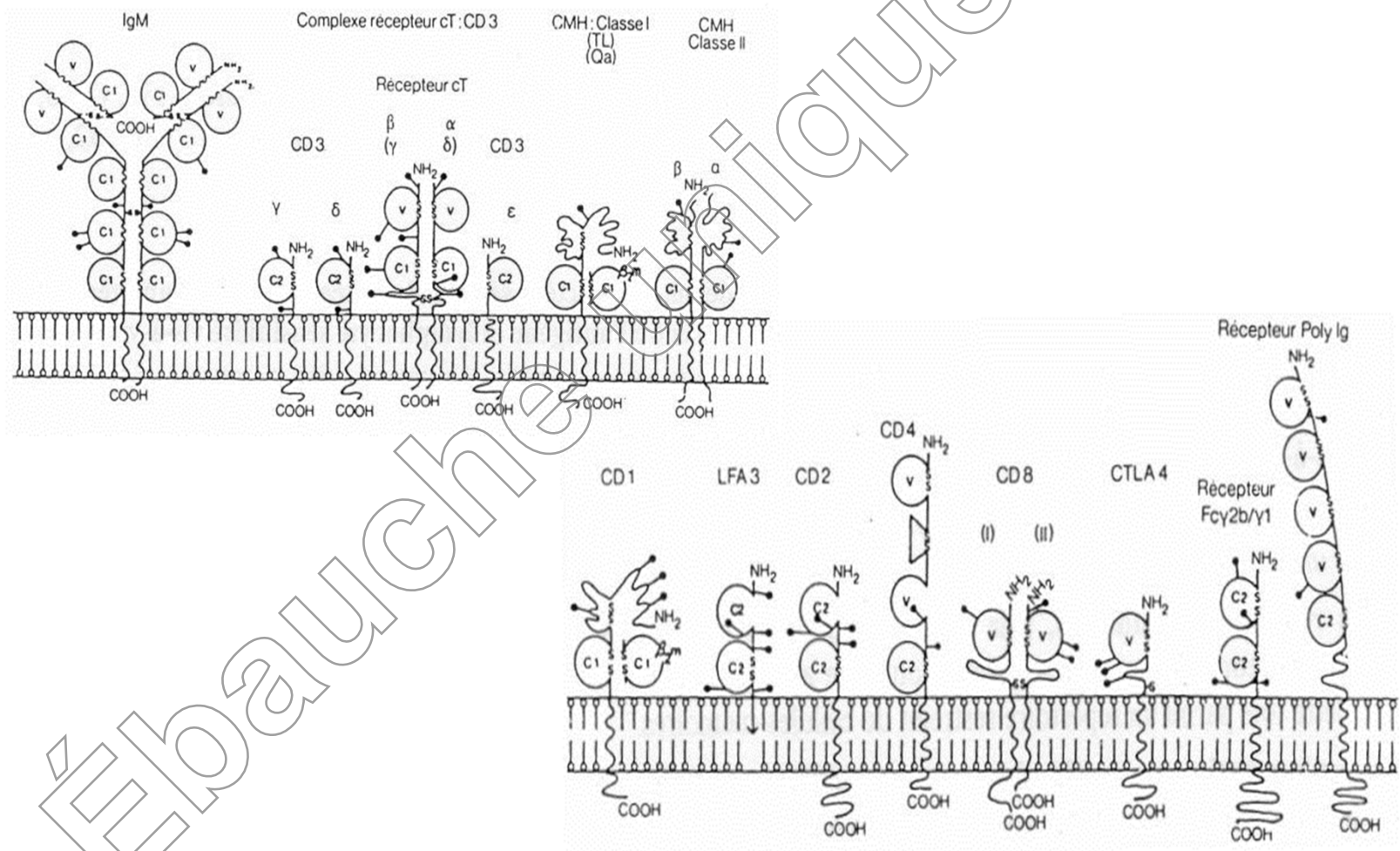


La superfamille des Immunoglobulines

- Domaine d'immunoglobuline est la structure de base de la famille
- 2 feuillets β anti-parallèles qui forme une structure en « tonneau »



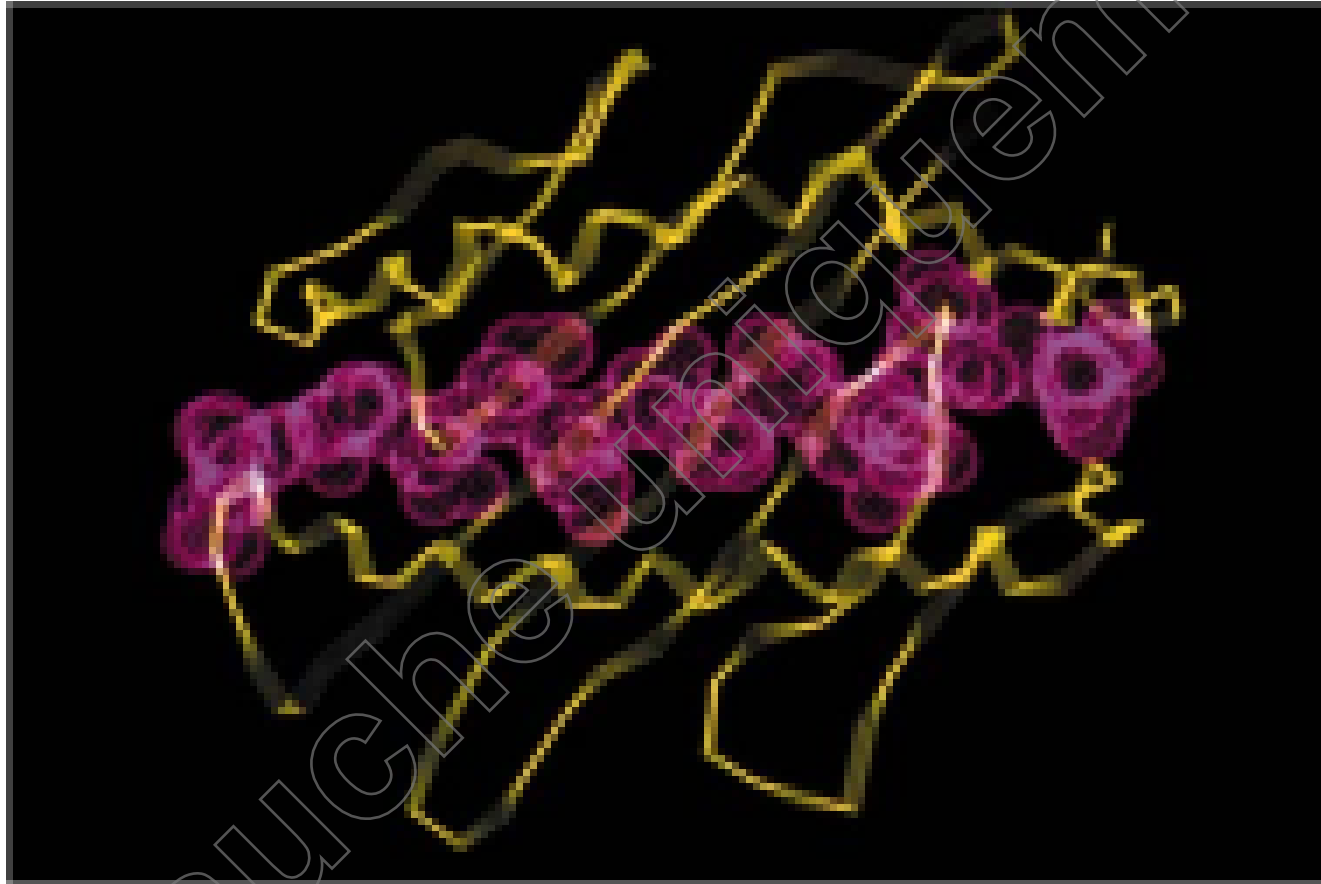
Superfamille des immunoglobulines

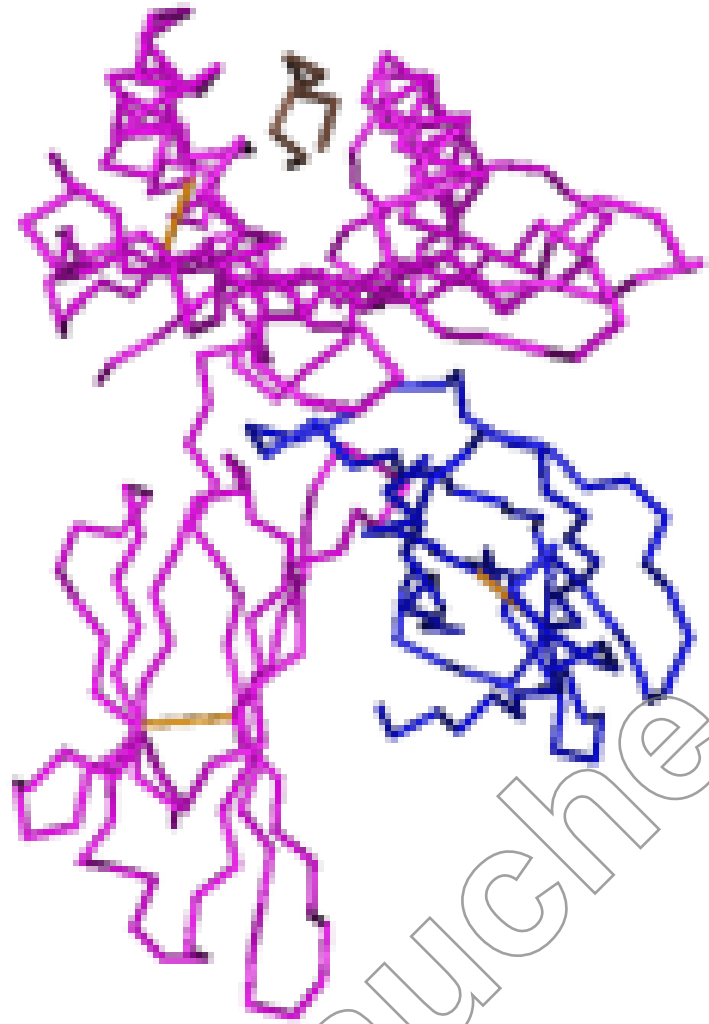


Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

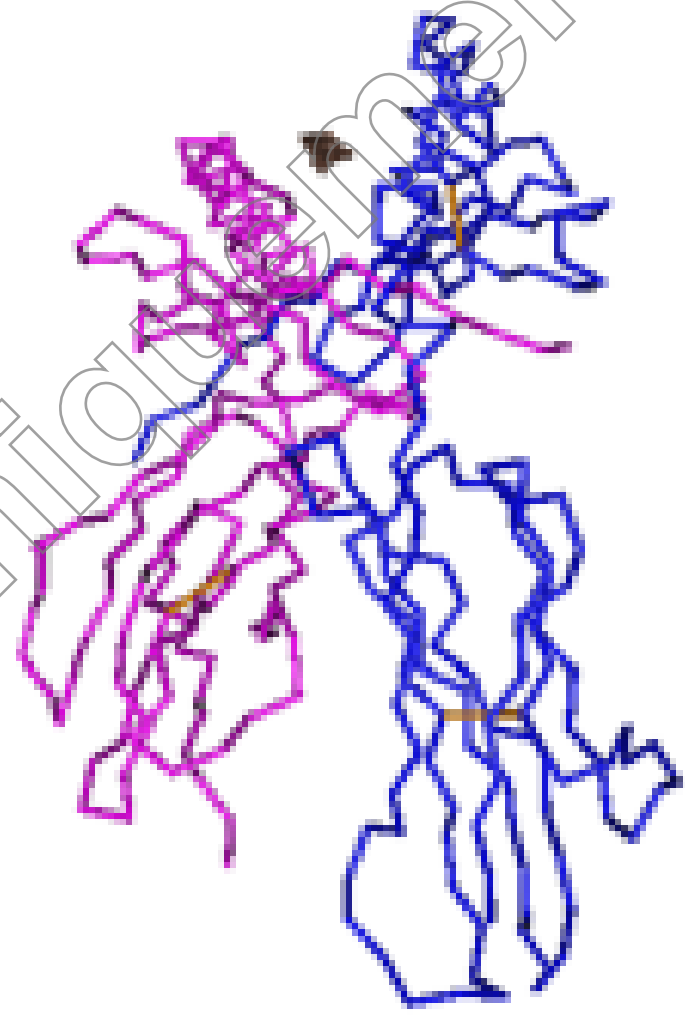
Type cellulaire	Classe I	Classe II
Lymphocyte T	+++	inductible
Lymphocyte B	+++	++
Macrophage	+++	+
Cellules dendritiques	+++x10	+++x10
Granuleux	++	-
Endothelium	++	inductible
Hepatocytes	+	-
neurones	-	-

Structure 3D des antigènes HLA de classe I

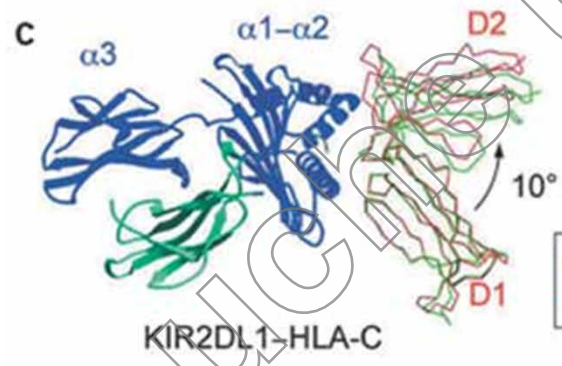
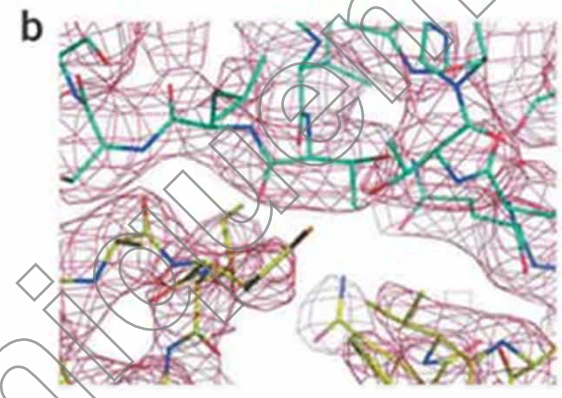
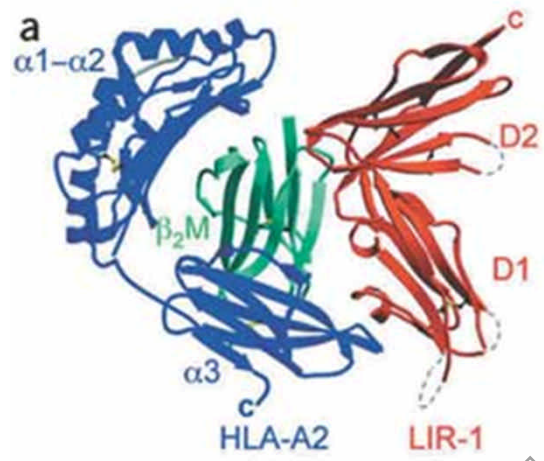




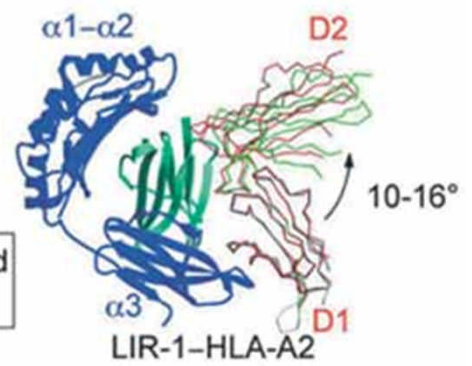
Classe I



Classe II

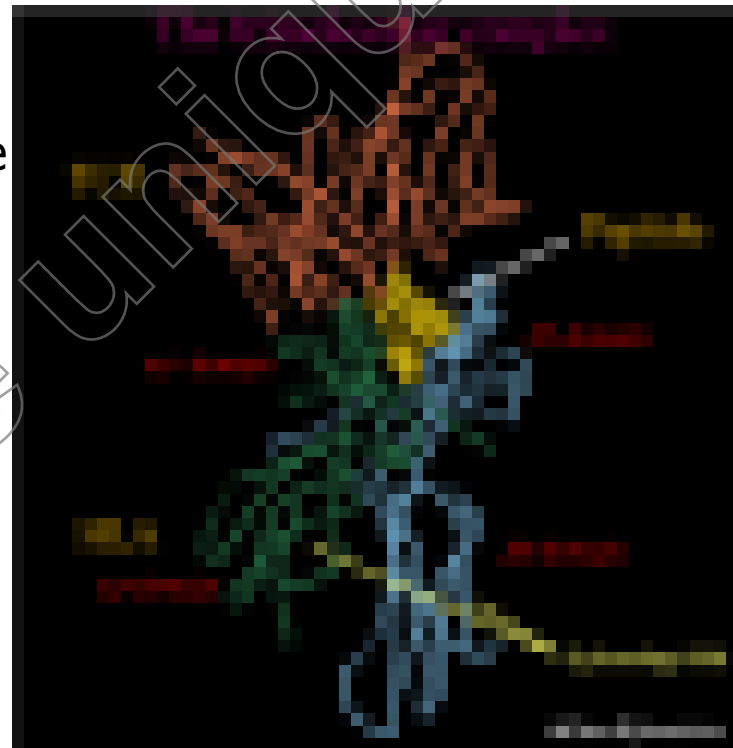


— Unbound
— Bound



Rôle Fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

- Régulation de la réponse Immune
- Les lymphocytes T reconnaissent l'antigène complexé au CMH I ou II
- demi-vie du complexe 24 h
- Chaque allèle possède un ensemble unique de peptides qu'il peut lier
- Chez un individu normal la majorité des molécules du CMH porte des antigènes du soi (CMH Vide est instable)



Les voies de l'apprêtement des antigènes

- Les 2 classes de molécules du CMH sont spécialisées pour présenter des antigènes d'origine différente
 - les molécules de classe I présentent des antigènes synthétisés par une voie endogène (ag viraux). Les molécules du CMH I sont instables en l'absence de peptide. Les peptides sont longs de 8 à 10 Aa
 - les molécules de classe II présentent des antigènes dérivés de Protéines exogènes (bactéries, protéine capsid virale). Peptides 9 à 12 Aa

The class I intracellular pathway uses an ancestor protein sorting pathway

Defective ribosomal products

Translation

Poly-ubiquitylation

Rapid

Slow (with age or randomness)

Proteasome

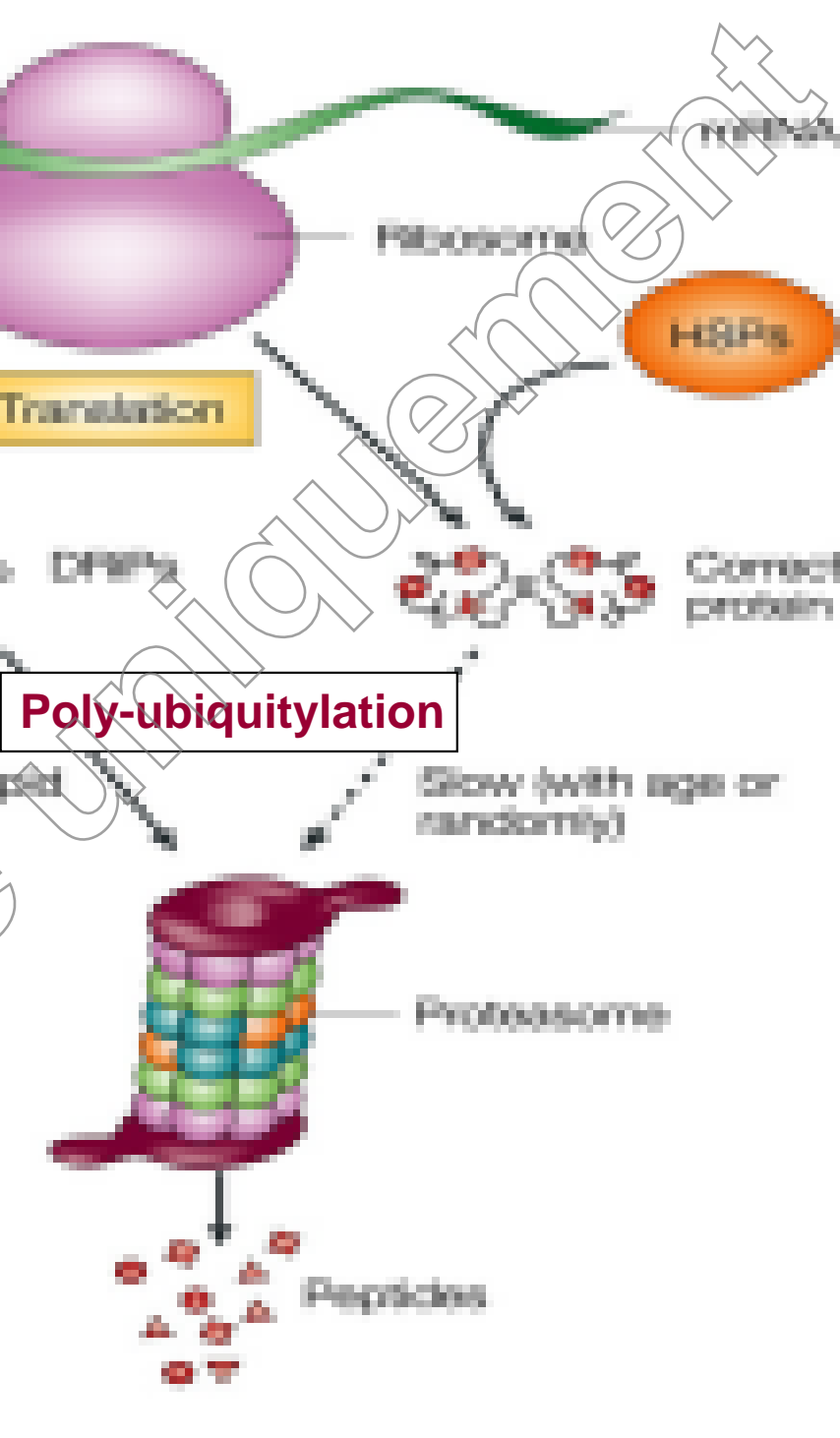
Peptides

Ribosomes

HSPs

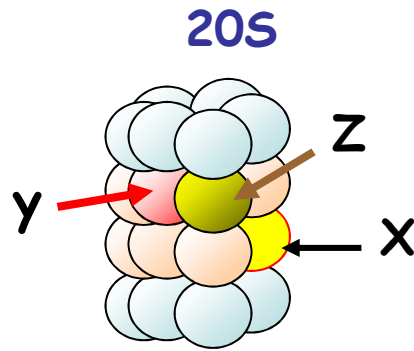
Correctly folded protein

Ébauche

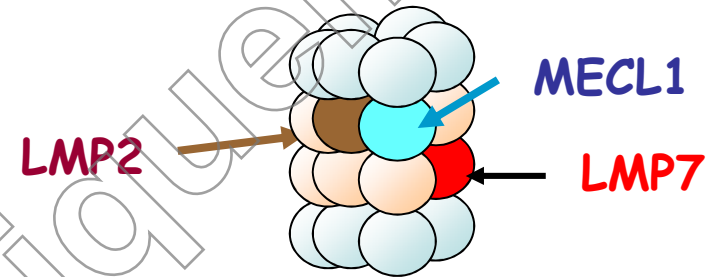


Interferon γ and MHC Class I presentation

House keeping proteasome



immunoproteasome



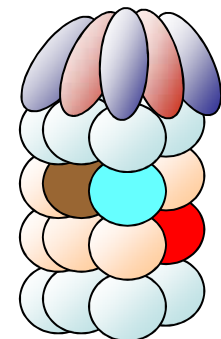
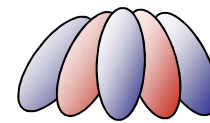
- + Low MWt polypeptide 2 & 7
- + Multicatalytic endopeptidase complex

IFN γ

Increases
The surface density of
HLA CI 1

Proteasome activator
PA 28 α & β

26S



Leucin-aminopeptidase Cytosol

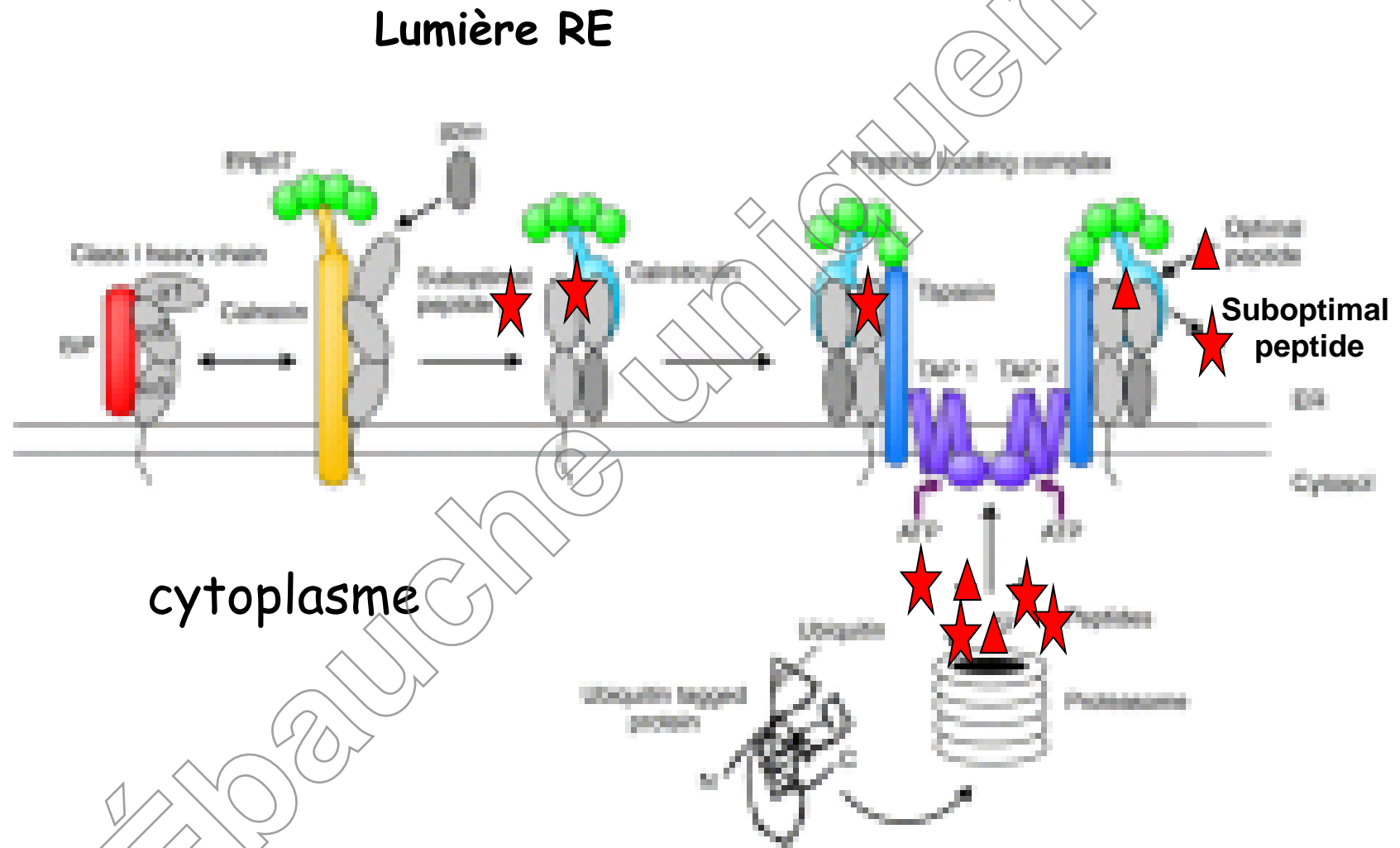
ER aminopeptidase 1 (endoplasmic ret.)

Les voies de l'apprêtement des antigènes

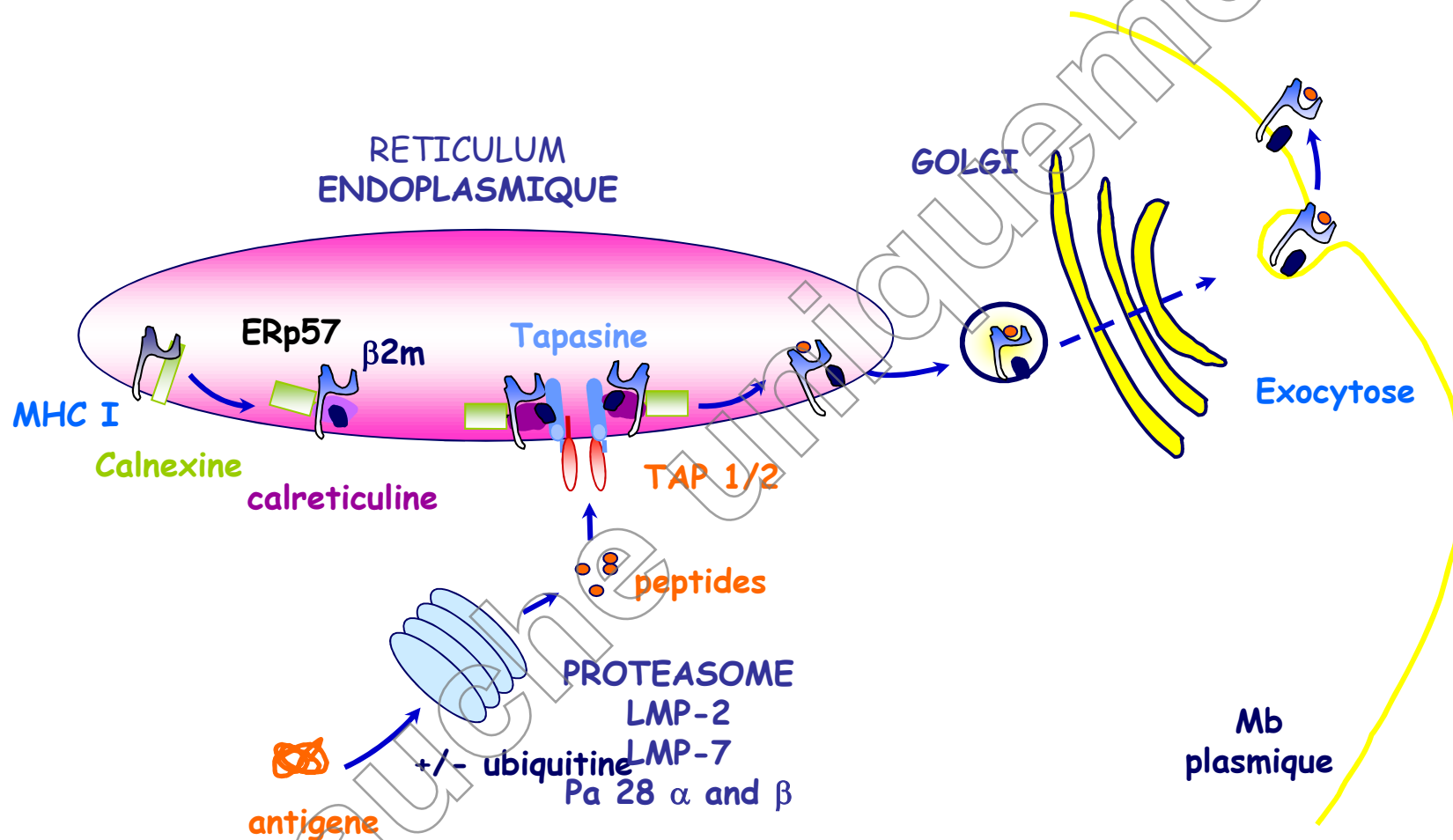
• Les molécules du CMH I bien que présentes sur la plupart des tissus et cellules connaissent une régulation de leur expression: Les cytokines telles que l'IFN γ induisent une puissante surexpression des molécules HLA en augmentant la transcription des molécules participant au transport et à l'apprêtement des antigènes

- LMP-2
- LMP-7
- MECL -1
- Thimet Oligopeptidase
- Erp57 (oxireductase)
- ERAP-1 (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase -1)
- PA28 α
- PA28 β
- TAP-1 (transporter associated with antigen processing -1)
- TAP-2
- Béta 2 Microglobuline
- Tapasine
- Calreticuline
- Calnexine

Réticulum endoplasmique et molécules chaperones de la préparation des molécules HLA



Les voies de l'apprêtement des antigènes : Classe I



**The proteasome needs peptidases
To finish peptides trimming**

Leu aminopeptidase

Cleaves at position 1 neutral but not charged residues

Tripeptidyl peptidase 2

Cleaves triplets of AA from the N terminal

Thimet oligopeptidase

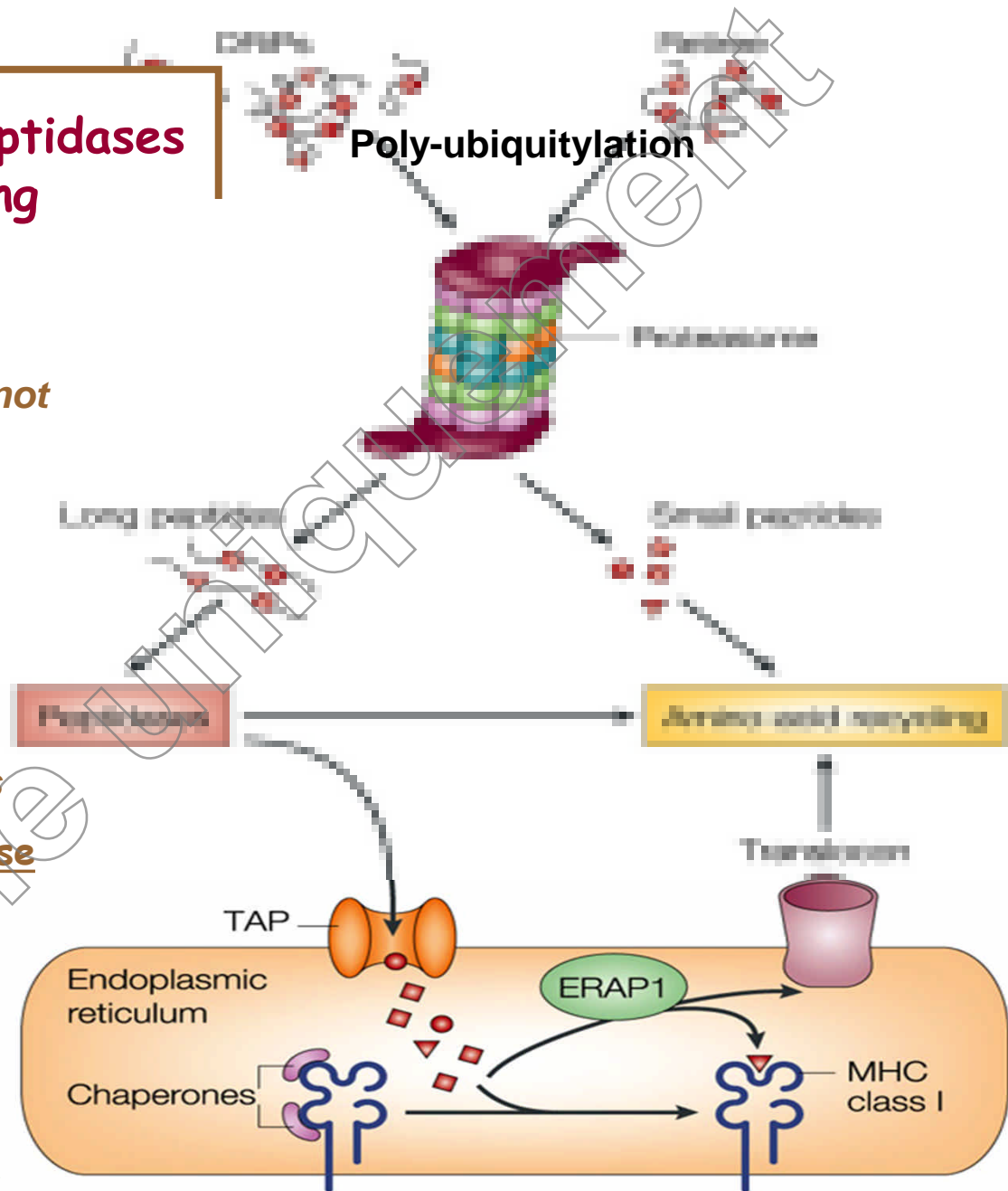
Cleaves peptides of 6-17 residues

Puromycin sensitive aminopeptidase

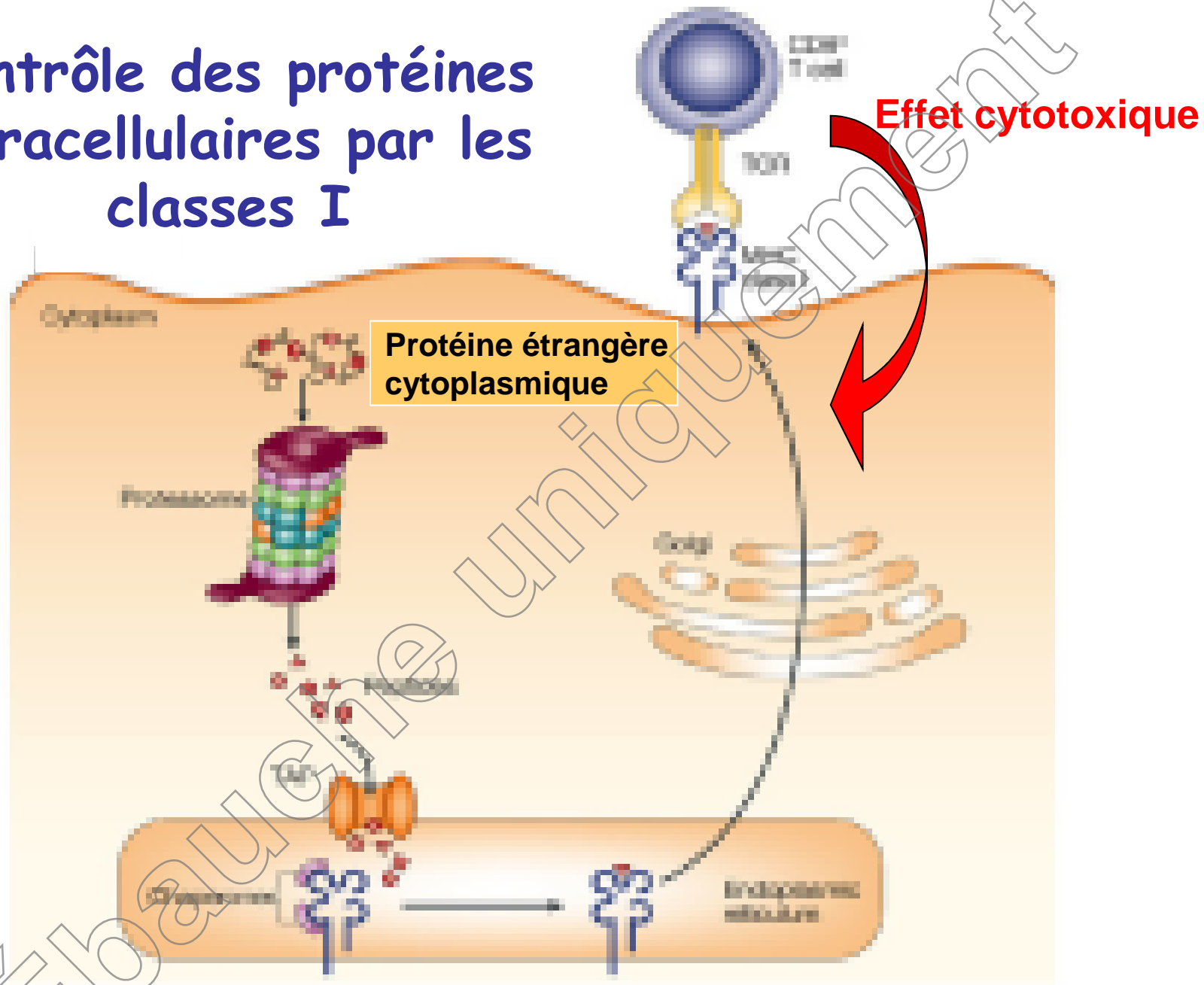
Cleaves hydrophobic / basic residues at pos 1 or -1

ER aminopeptidase (ERAP 1)

Cleaves peptides with > 7 residues



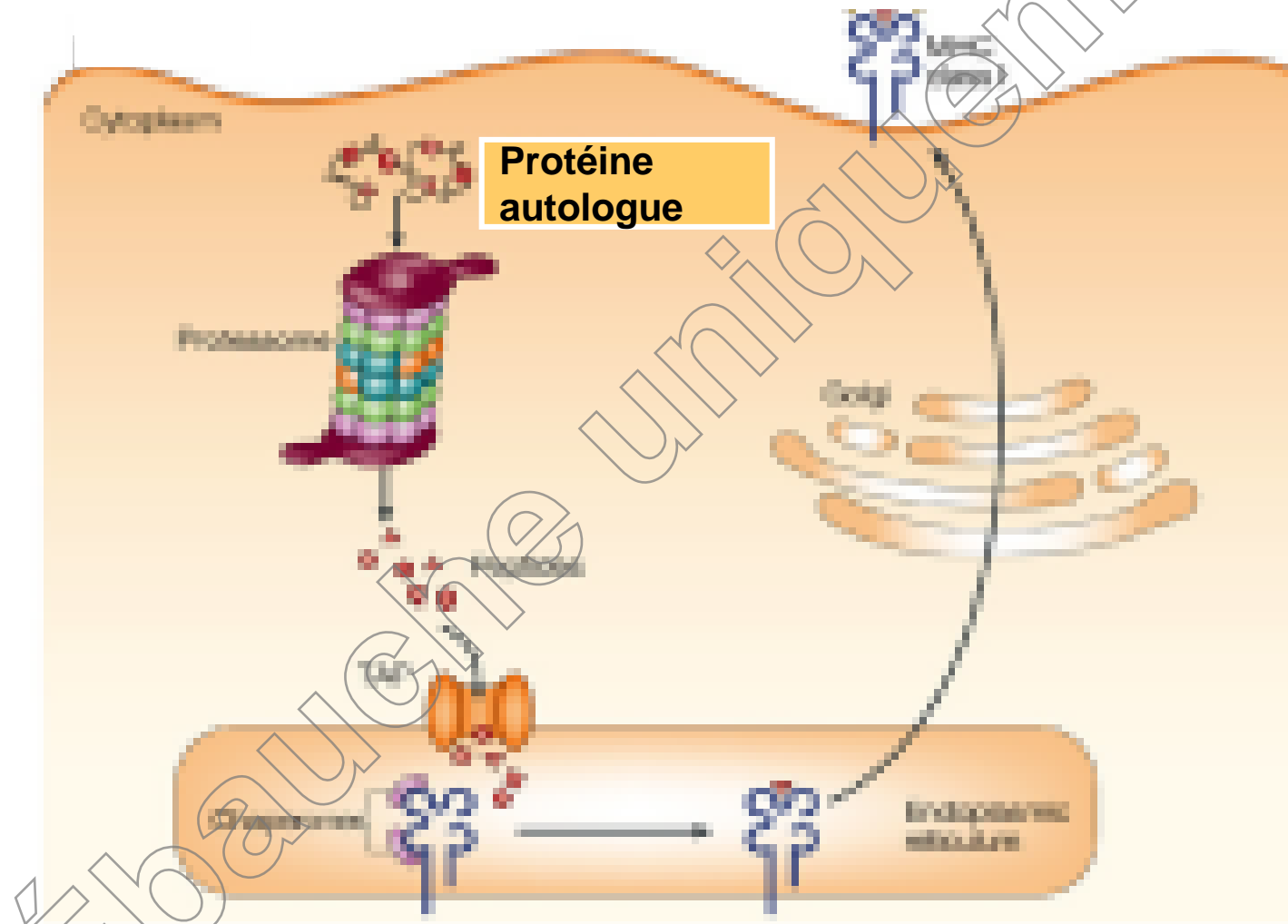
Contrôle des protéines intracellulaires par les classes I



Contrôle des protéines intracellulaires par les classes I

T déleté ou tolérisé

Pas de mort



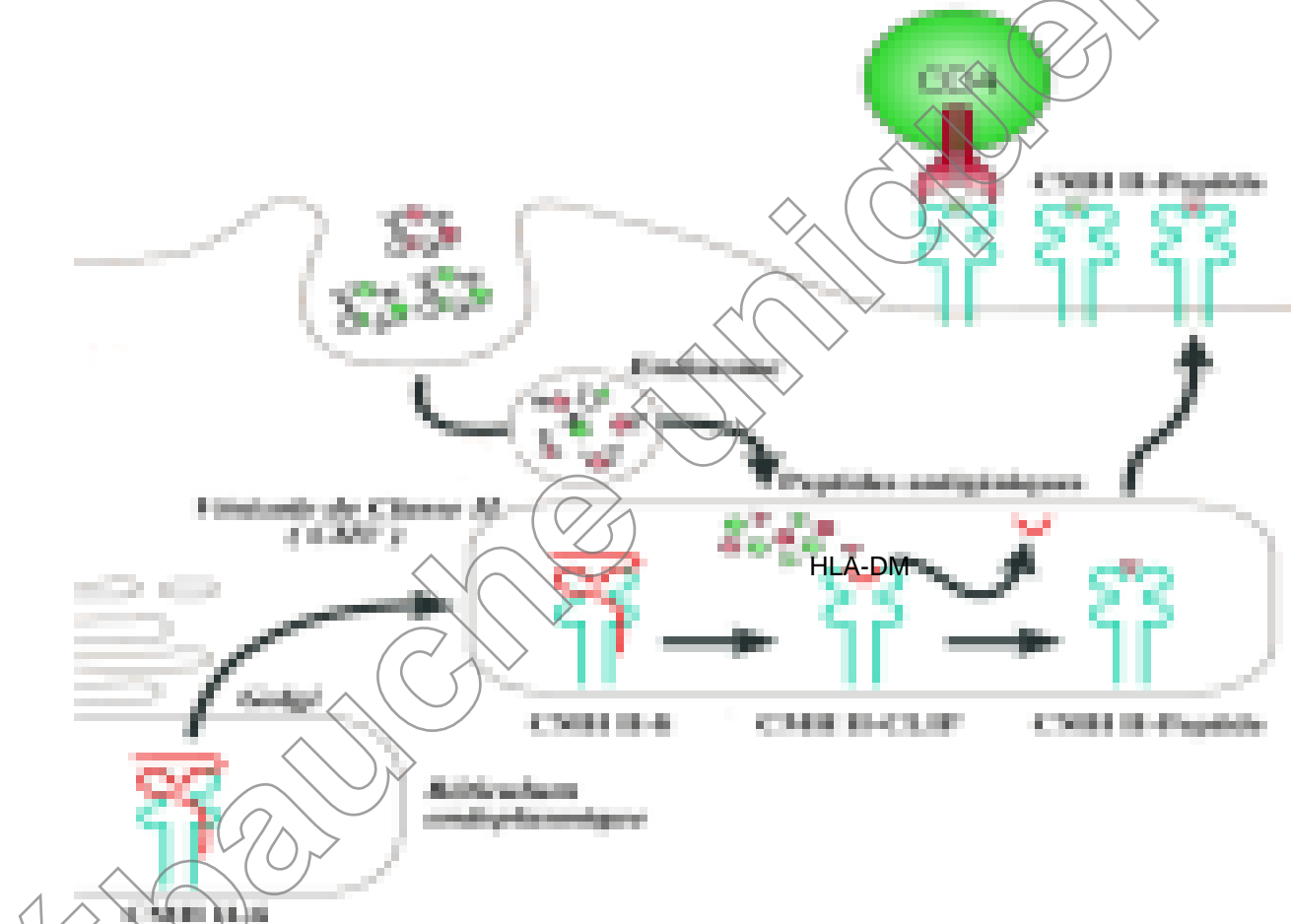
Régulation de l'expression des molécules HLA classe I

- IFN gamma : induit l'augmentation de synthèse des molécules HLA
- Les virus
- Les tumeurs

Les voies de l'apprêtement des antigènes

- Les 2 classes de molécules du CMH sont spécialisées pour présenter des antigènes d'origine différente
 - les molécules de classe I présentent des antigènes synthétisés par une voie endogène (ag viraux). Les molécules du CMH I sont instables en l'absence de peptide. Les peptides sont longs de 8 à 10 Aa
 - les molécules de classe II présentent des antigènes dérivés de Protéines exogènes (bactéries, protéine capsid virale). Peptides 9 à 12 Aa

Apprêtement des antigènes par les classes II

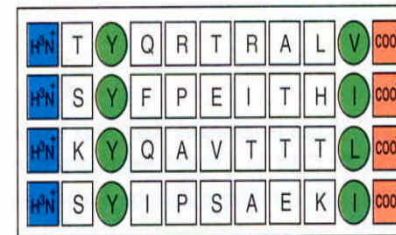
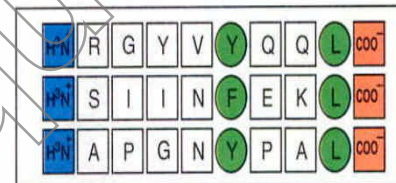
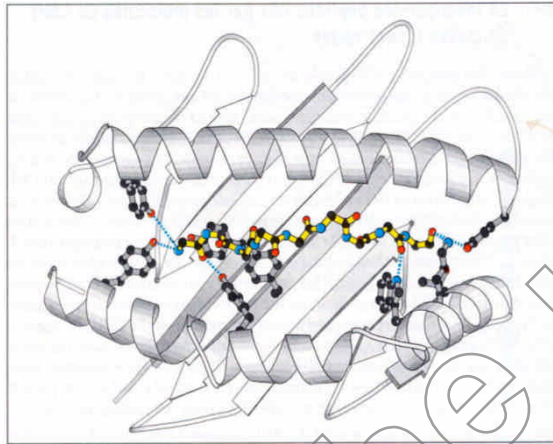


CLIP = Class II associated Invariant Chain Peptide

Apprêtement des antigènes par les classes II

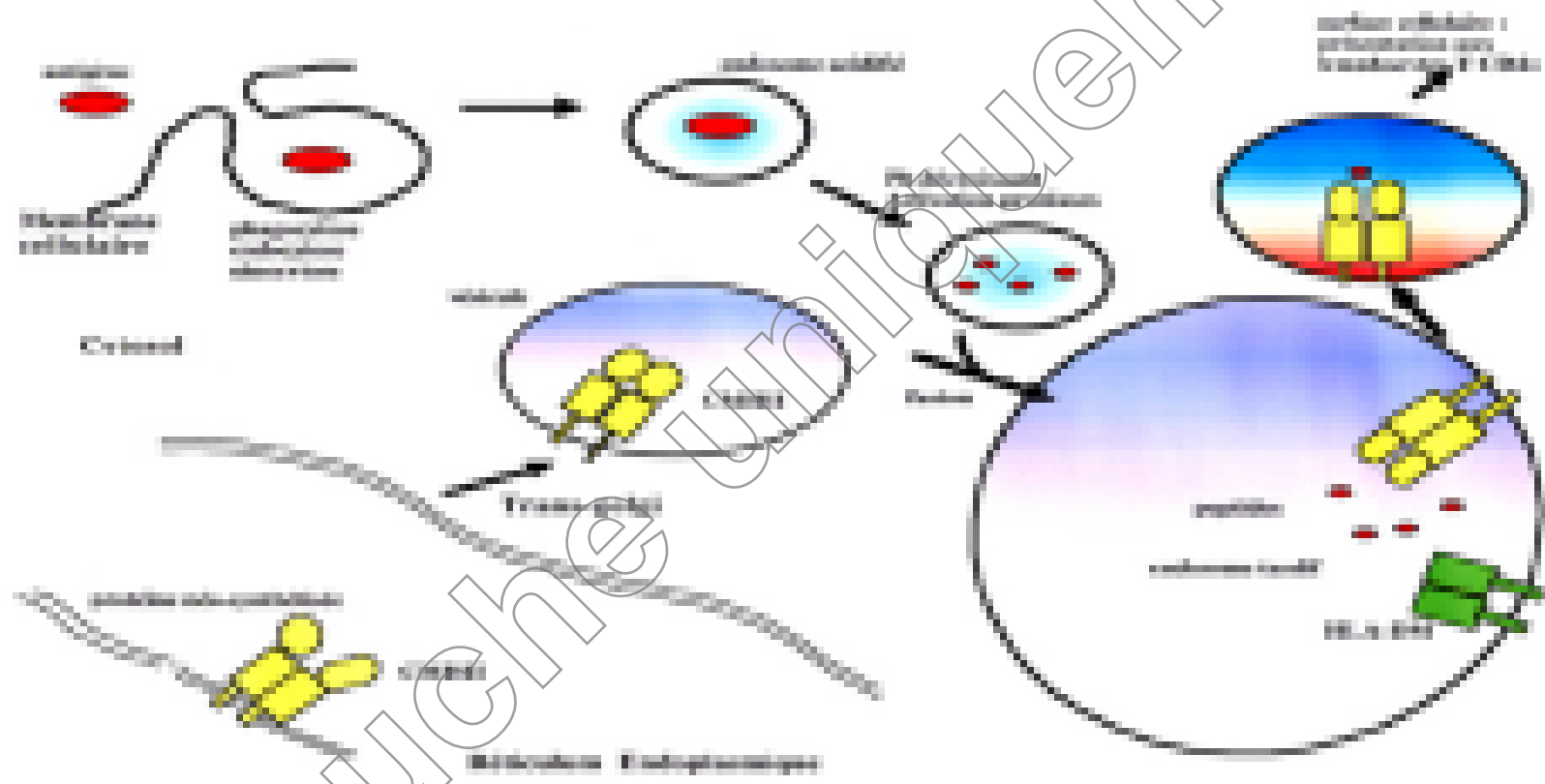


Le CMH de classe I lie des peptides 8-10 AA par ses deux extrémités

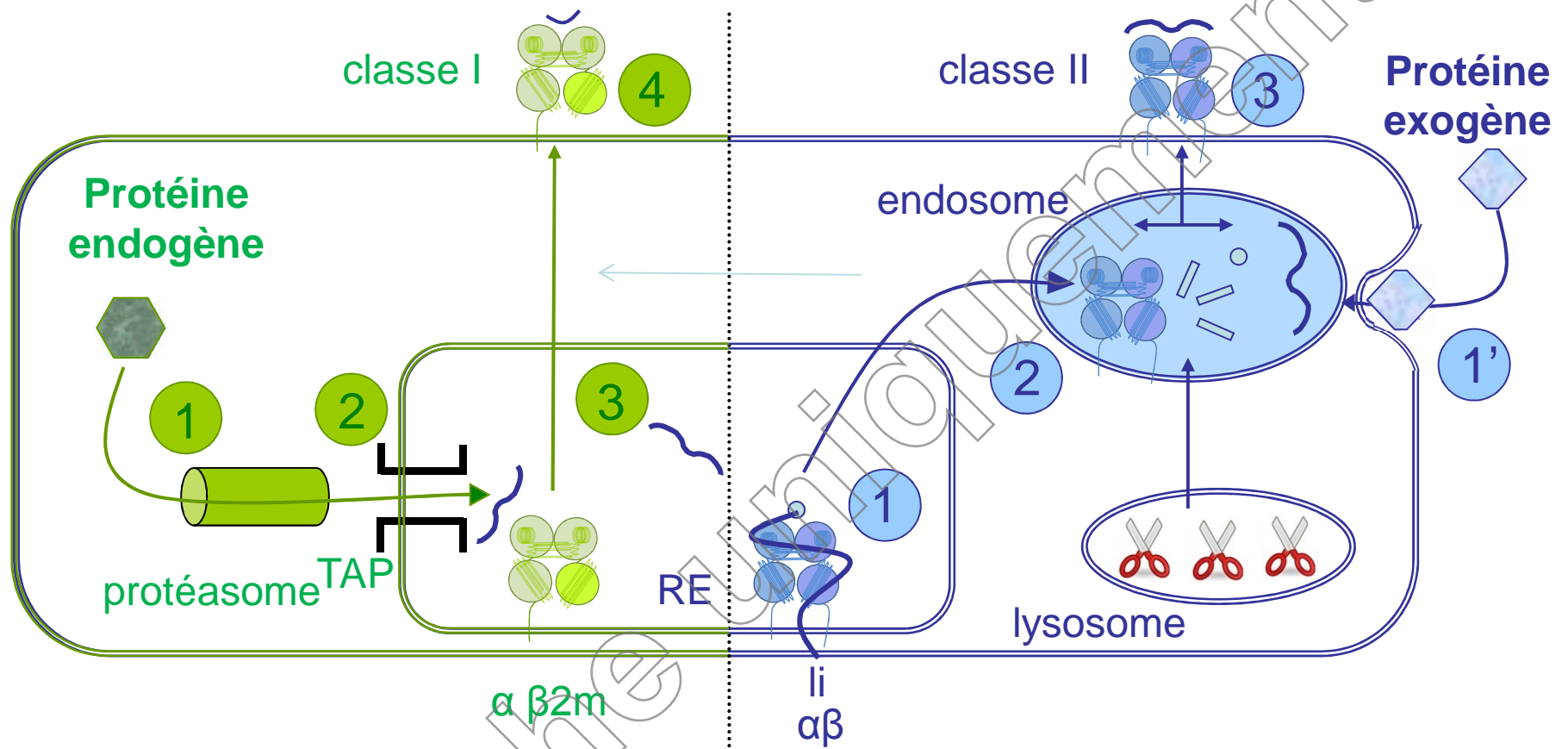


Les résidus d'ancrage sont différents entre peptides qui se lient à différents allèles, mais sont similaires pour tous les peptides qui se lient à un même CMH de classe I

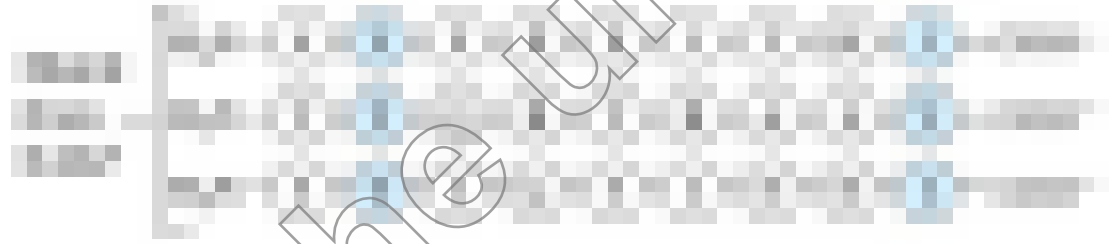
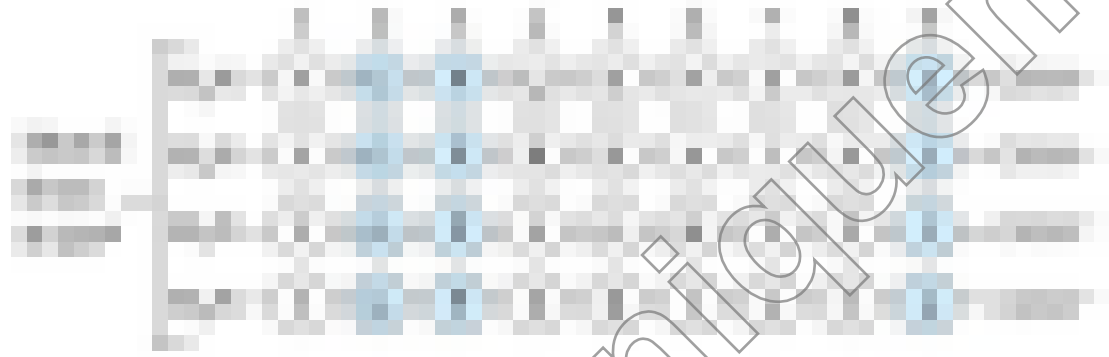
TABLETTEMENT ET PRÉSENTATION DE L'ANTIGÈNE PAR LE CMH II



Ébauche Université



Ébauche uniquement



Node	Input 1	Input 2	Input 3
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1	0	0
5	0	1	0
6	0	0	1
7	1	0	0
8	0	1	0
9	0	0	1
10	1	0	0

Techniques de détermination des antigènes HLA

Techniques sérologiques

- Grossesse, transfusion, transplantation
- Absorption sur plaquettes dépourvues en classe II

Techniques cellulaires

- Réponse prolifératives allogénique
- # MHC classe I

Techniques de biochimie

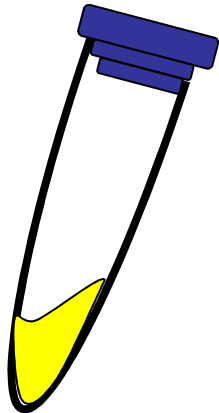
- Electrophorèse en gel 2 dimension

Techniques de biologie moléculaire

Principe du typage HLA Technique de microlymphotoxicité

Patient

= cellules
mononucléées

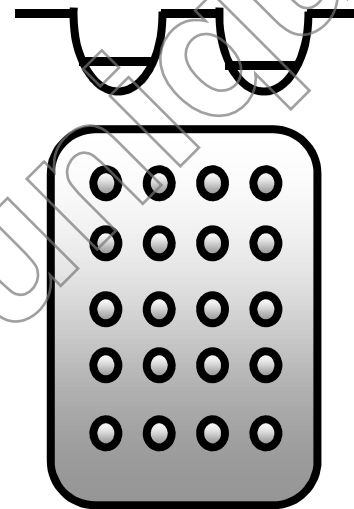


Anti
sérum

- AS 1 ○
- 2 ○
- 3 ○
- 4 ○
- 5 ○

Cellules

+ anti sérum
+ complément



Lecture

Plaque de TERASAKI

Ly. 1, 2, ... 50

Lymphocytotoxicité

Préparation des cellules mononucléées

1



2

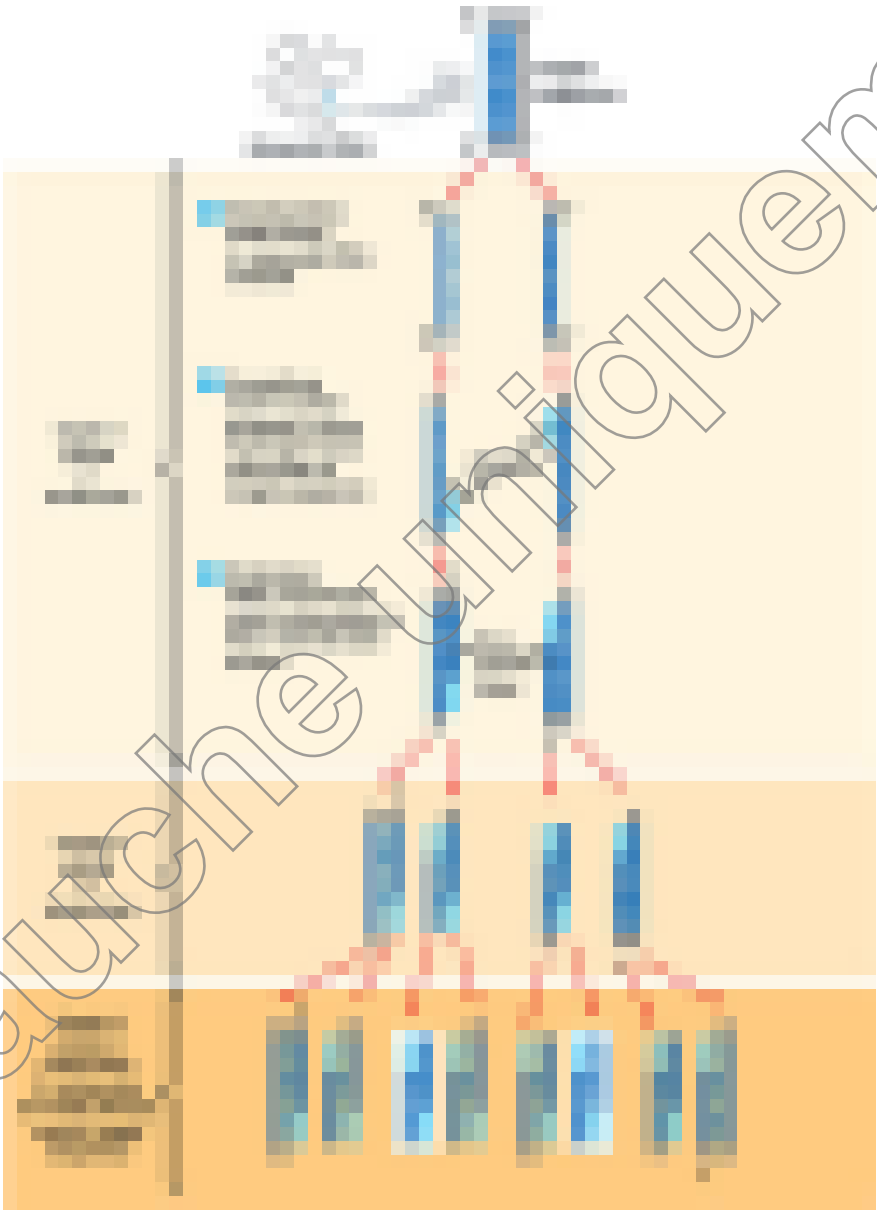


3

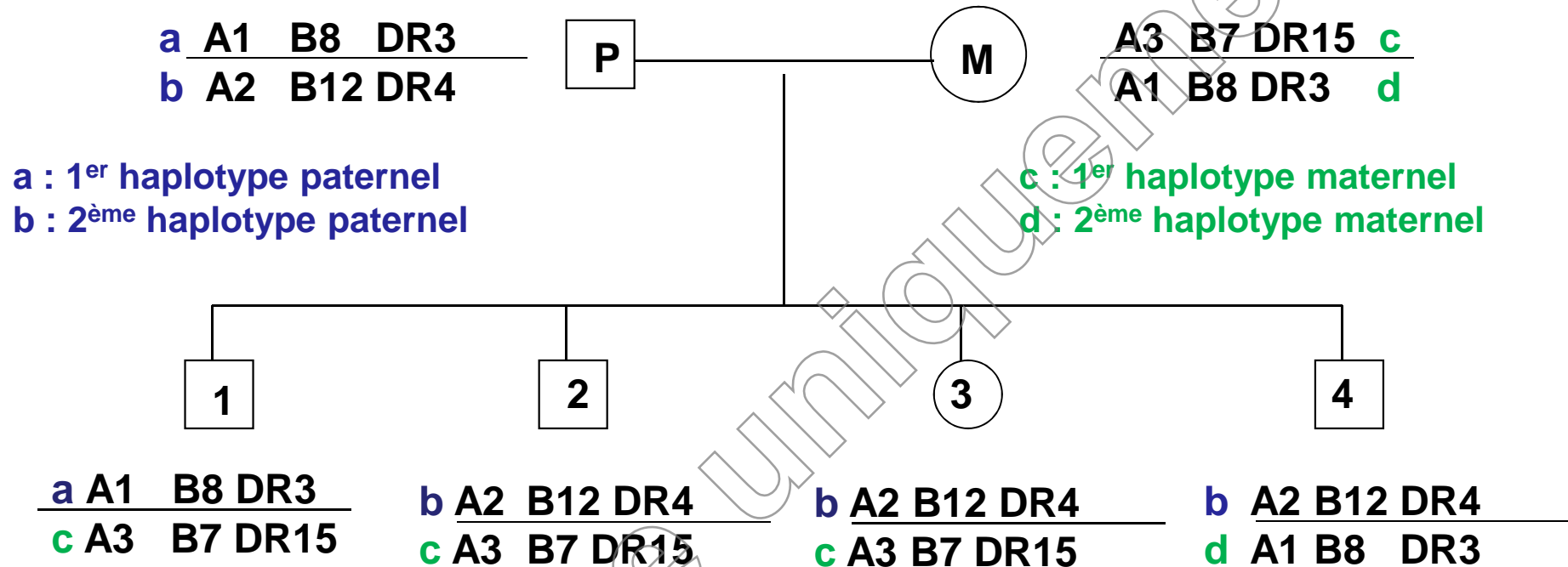


Ébauche uniquement

Méthodes de typage basées sur la PCR = Polymerase Chain reaction



Transmission en bloc des gènes HLA (notion d'haplotypes)



Ex dans cette famille :

1 et 4 : deux haplotypes HLA différents

2 et 3 : identiques HLA pour les 2 haplotypes parentaux

1 et 2 : haplo-identiques HLA

Si un individu a n frères et soeurs, la probabilité qu'il ait au moins l'un d'entre eux HLA identique est de $p=1-0,75^n$.

Rejet de greffe

- Niveau de réponse immunologique différents en fonction de l'organe : Cœur < Foie < Rein
- Classification basée sur le délai de survenue du rejet après la greffe : rejet hyperaigu (mins), rejet aigu qq jours à qq années, rejet chronique (plusieurs années après la greffe)
- Classification basée sur la cause : anticorps, cellules

Hyperaigu : anticorps seul

Aigu : cellules et/ou Ac

Chronique : cellules et /ou Ac

Ébauche uniquement

Rejet de greffe

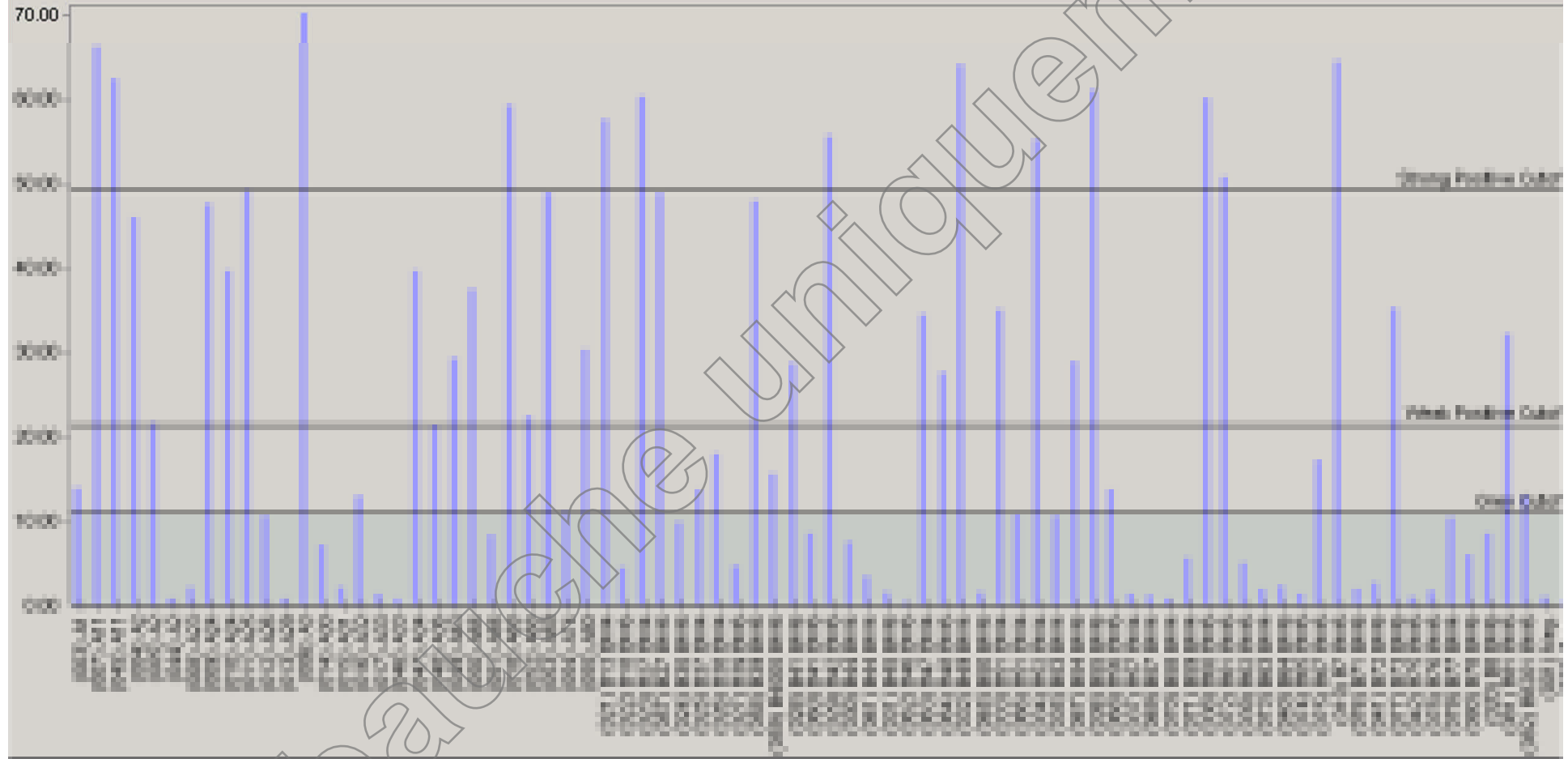
- Comment prévenir le rejet ?

Suivi immunologique des patients

Cross match pré greffe

View Cutoff/Rawdata for <BAIJOO BERNARD 543-4/04-09-01> Cat.ID <LS1A1&2 005 >

Cutoff/Ratio for <BAIJOO BERNARD 543-4/04-09-01> Cat.ID <LS1A1&2 005 >



Import ALL (R) Values from Previous Settings

Apply

Default Update Color Print

PC = 1500 (C) = 1200 (C) = 84.45

Update (R) Values:

Update from Copy

Save to

Send Data to:

MSO Ratio Results

Send ID Raw-Data

Réaction du greffon contre l'hôte GvHD

- Complication principale et limitante de la greffe de CSH. Observée dans 30% des cas greffes familiale géno-identique et plus de 80 % des greffes phéno-identiques
- Survient dans les 100 jours après la greffe : atteinte cutanée (paume des mains, plante des pieds) tube digestif (diarrhées +++), foie et poumon
- Risque et grade est d'autant plus grave que la situation de compatibilité est défavorable

Réaction du greffon contre l'hôte GvHD

- Observée au cours de la greffe de cellule souches hématopoïétiques
- Cellules souches hématopoïétiques = cellules immunocompétentes (lymphocytes T et B, monocytes, APC)
- Receveur Immunodéprimé (traité par chimiothérapie, radiothérapie)

Les sources de cellules souches

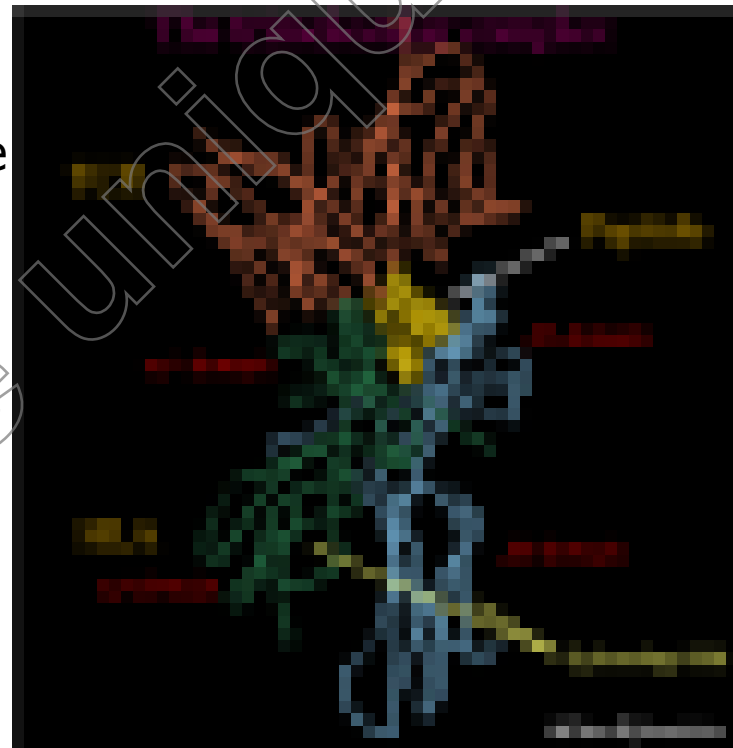
- Moelle osseuse : AG, hospitalisation
- Cellules souches périphériques : pas AG ni hospitalisation mais facteur de croissance G-CSF injecté au donneur
- Sang de cordon : nb fini de cellules, congélation

- Les cellules immunitaires du receveur ne sont pas réactives ~~REJET~~

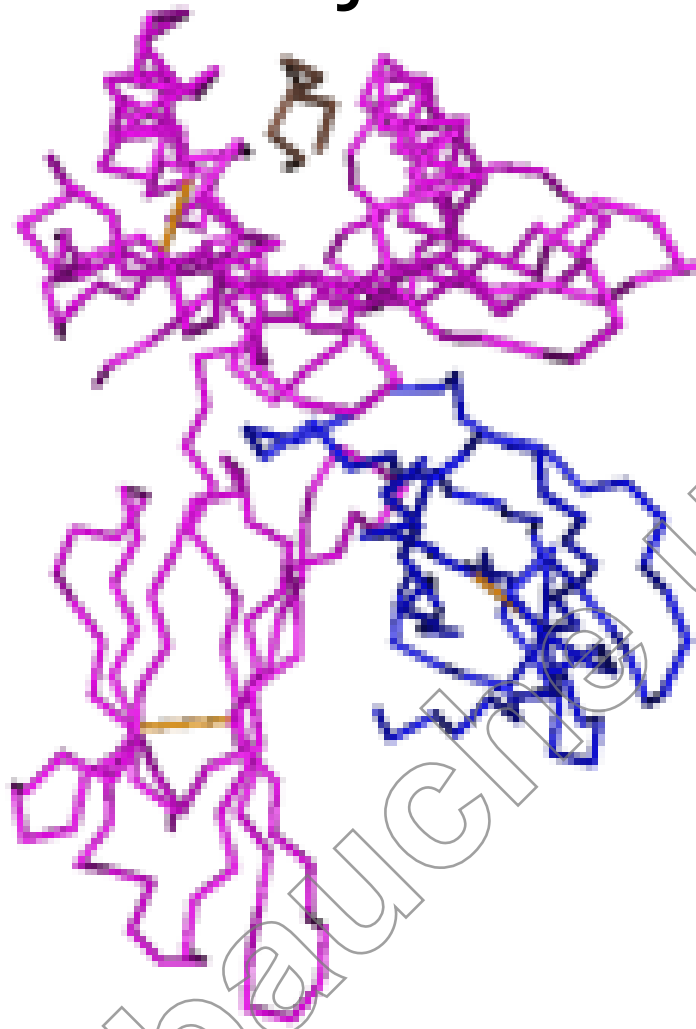
Les cellules du greffon sont actives, elles
Peuvent réagir contre l'hôte = maladie du greffon contre l'hôte

Rôle Fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

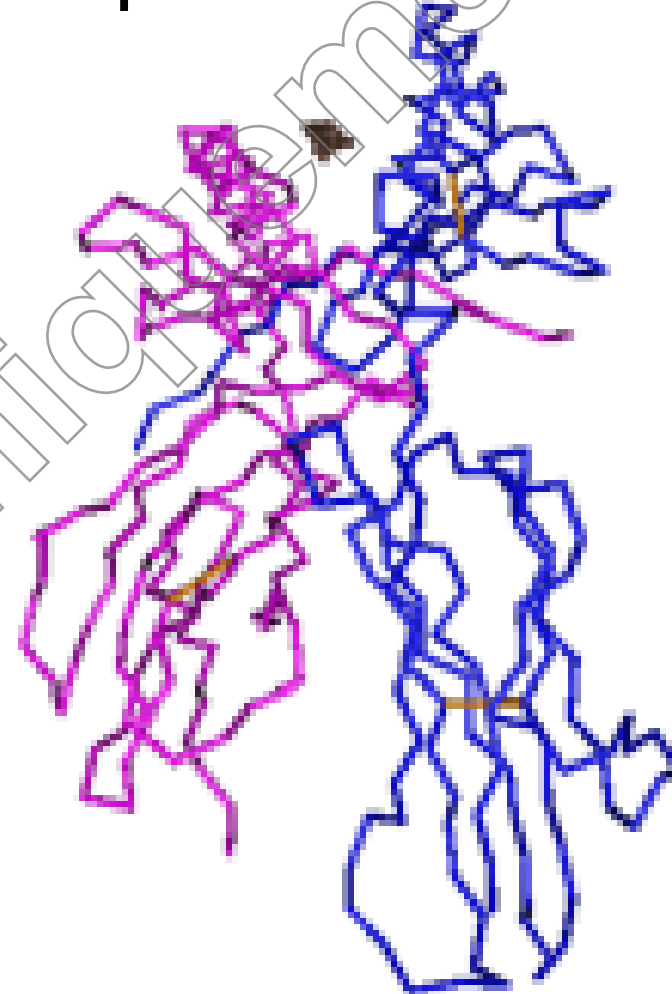
- Régulation de la réponse Immune
- Les lymphocytes T reconnaissent l'antigène complexé au CMH I ou II
- demi-vie du complexe 24 h
- Chaque allèle possède un ensemble unique de peptides qu'il peut lier
- Chez un individu normal la majorité des molécules du CMH porte des antigènes du soi (CMH Vide est instable)



Rôle Fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité



Classe I



Classe II

Rôle fonctionnel du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Type cellulaire	Classe I	Classe II
Lymphocyte T	+++	inductible
Lymphocyte B	+++	++
Macrophage	+++	+
Cellules dendritiques	+++x10	+++x10
Granuleux	++	-
Endothelium	++	inductible
Hepatocytes	+	-
neurones	-	-

Reconnaissance allogénique

- Voie directe :

Elle induit une réponse immune intense.

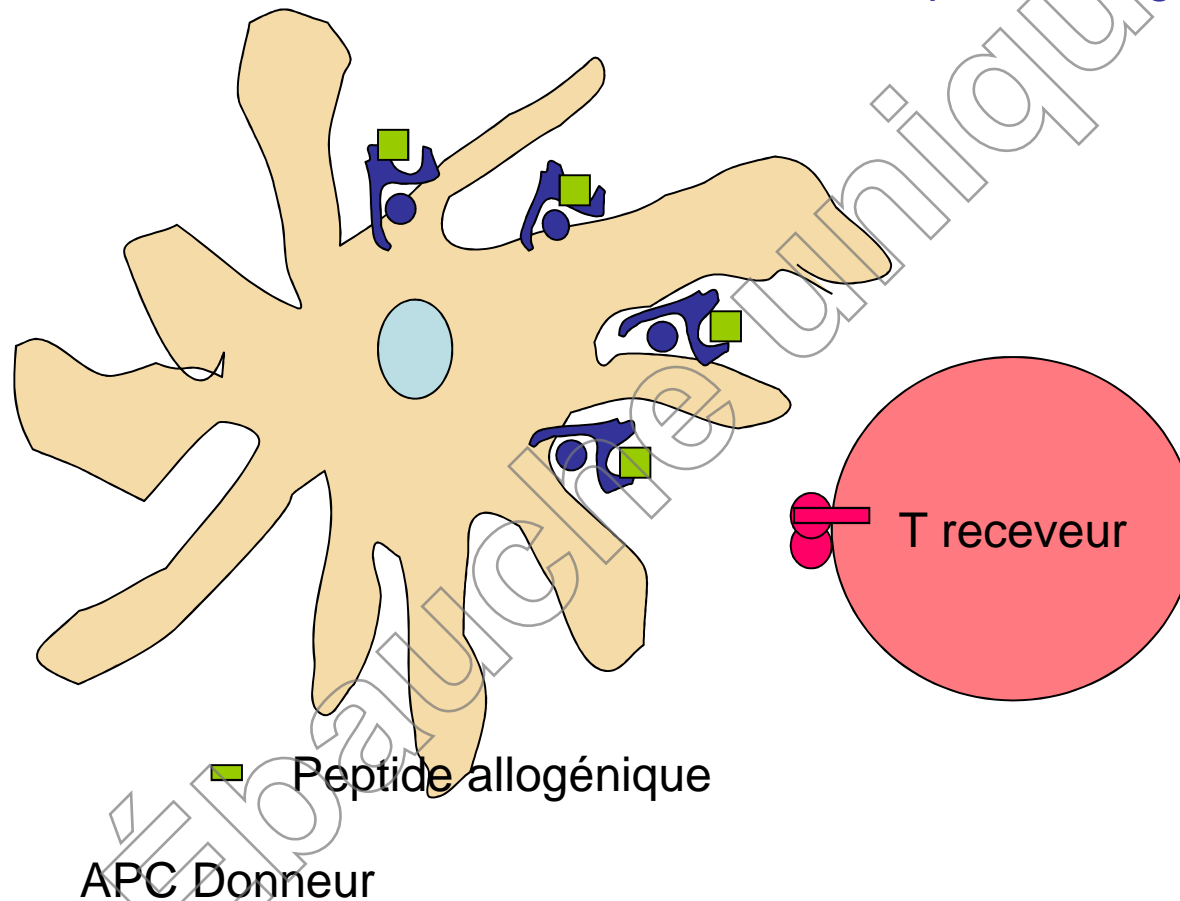
- haute densité de déterminants : les LT alloréactifs reconnaissent principalement les déterminants étrangers de la structure du CMH allogénique

Peu Ag allo présenté mais bcp CMH

- multiples complexes binaires: peptides fixés par CMH allogénique sont variés et de nombreux clones T différents sont recrutés

Reconnaissance allogénique

- **Voie directe :** Prédomine dans rejet aigu et début de la réponse allogénique



Reconnaissance allogénique

- Voie indirecte :

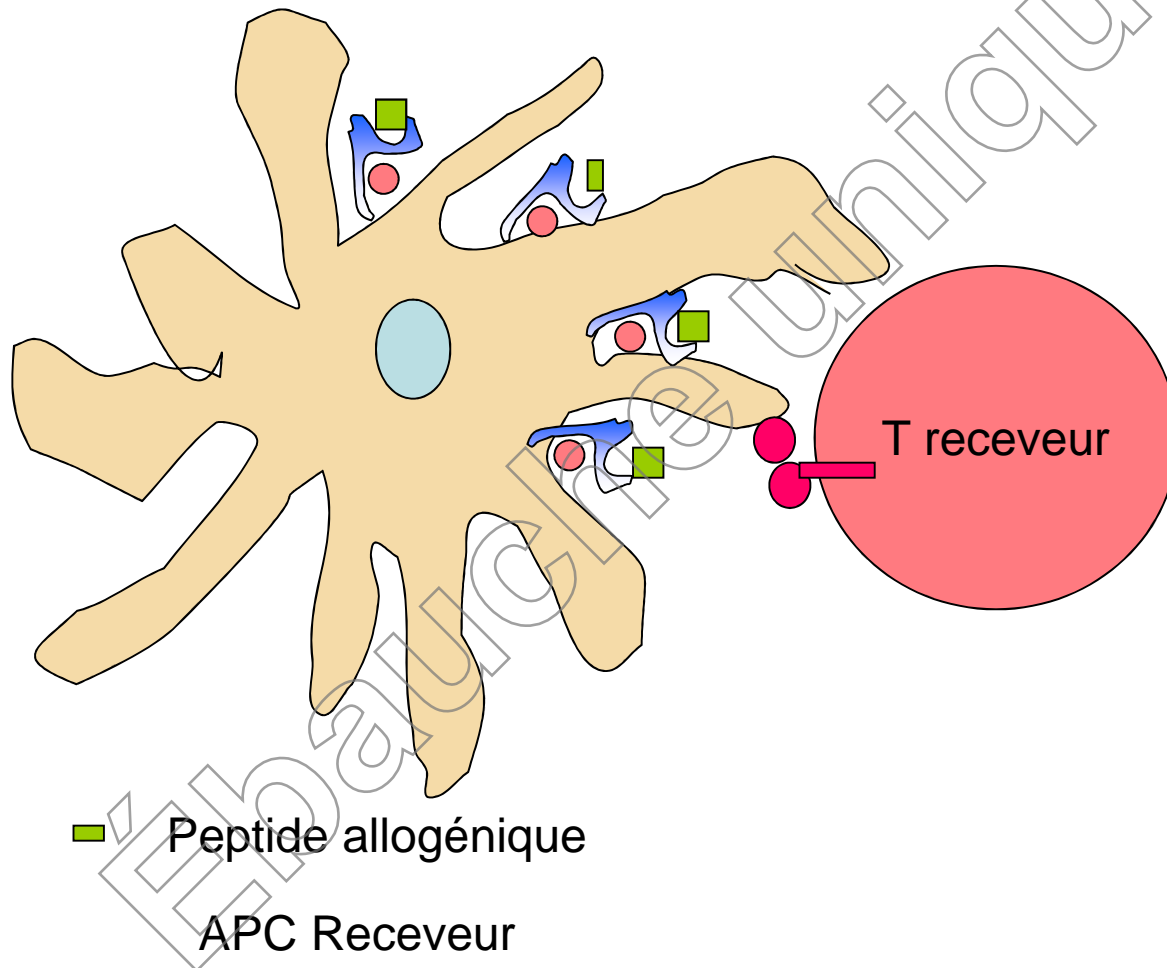
Plus intense en phase de rejet chronique

- disparition des CPA donneur ?

- Voie semi-directe : présentation simultanée du CMH donneur + peptide et CMH receveur + peptide

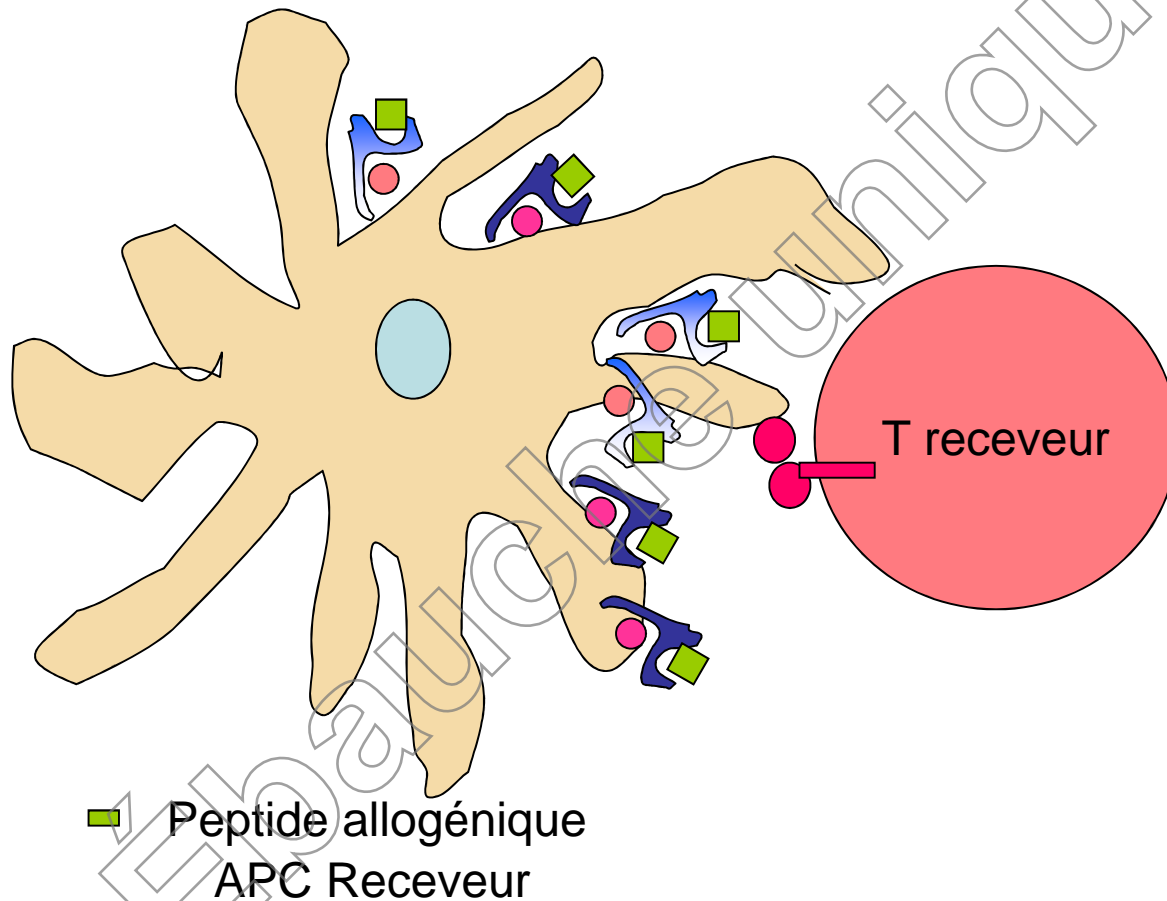
Reconnaissance allogénique

- Voie indirecte : Rejet chronique

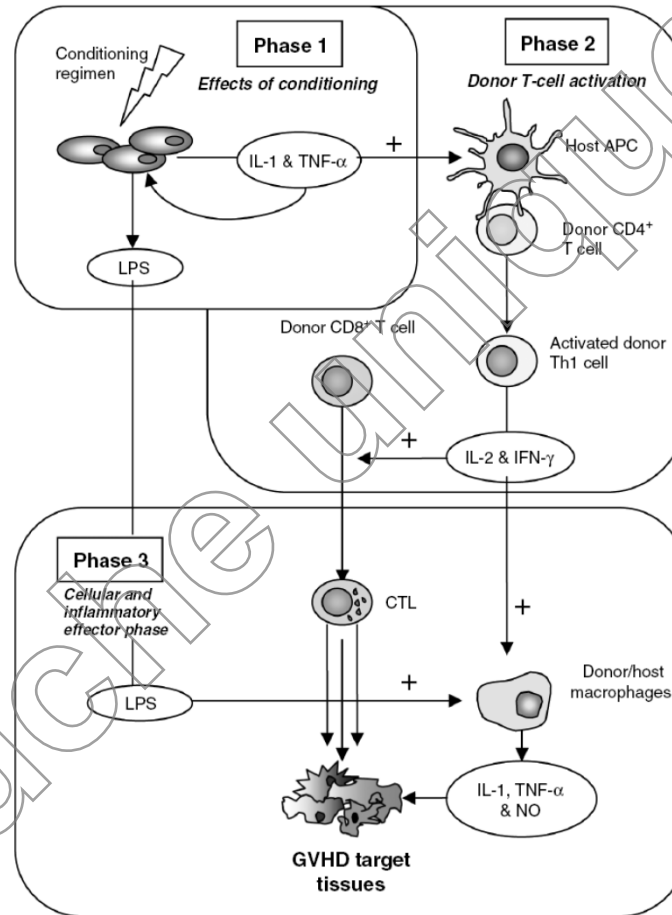


Reconnaissance allogénique

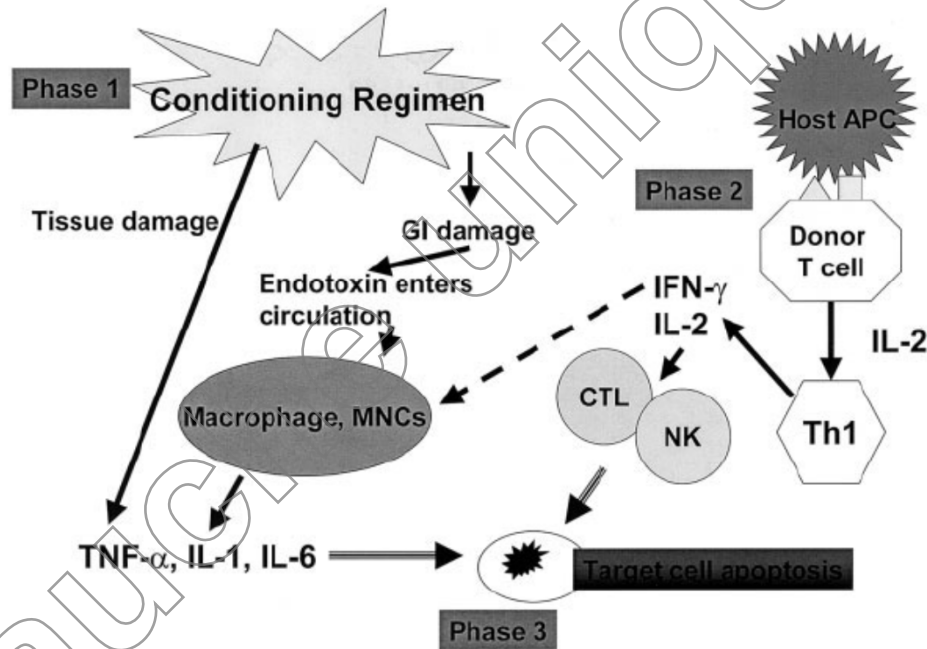
- Voie semi directe :



Les phases de la GvH aigue

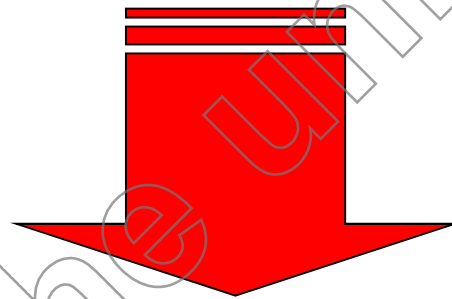


Jaksch et al Scand.J.Immunol. 2005



Avant la transfusion des cellules du donneur.....

Conditionnement du receveur
Irradiation et Chimiothérapie



Grande toxicité pour les tissus de l'hôte :
muqueuse intestinale, foie + autres tissus

1ère phase = effet du conditionnement

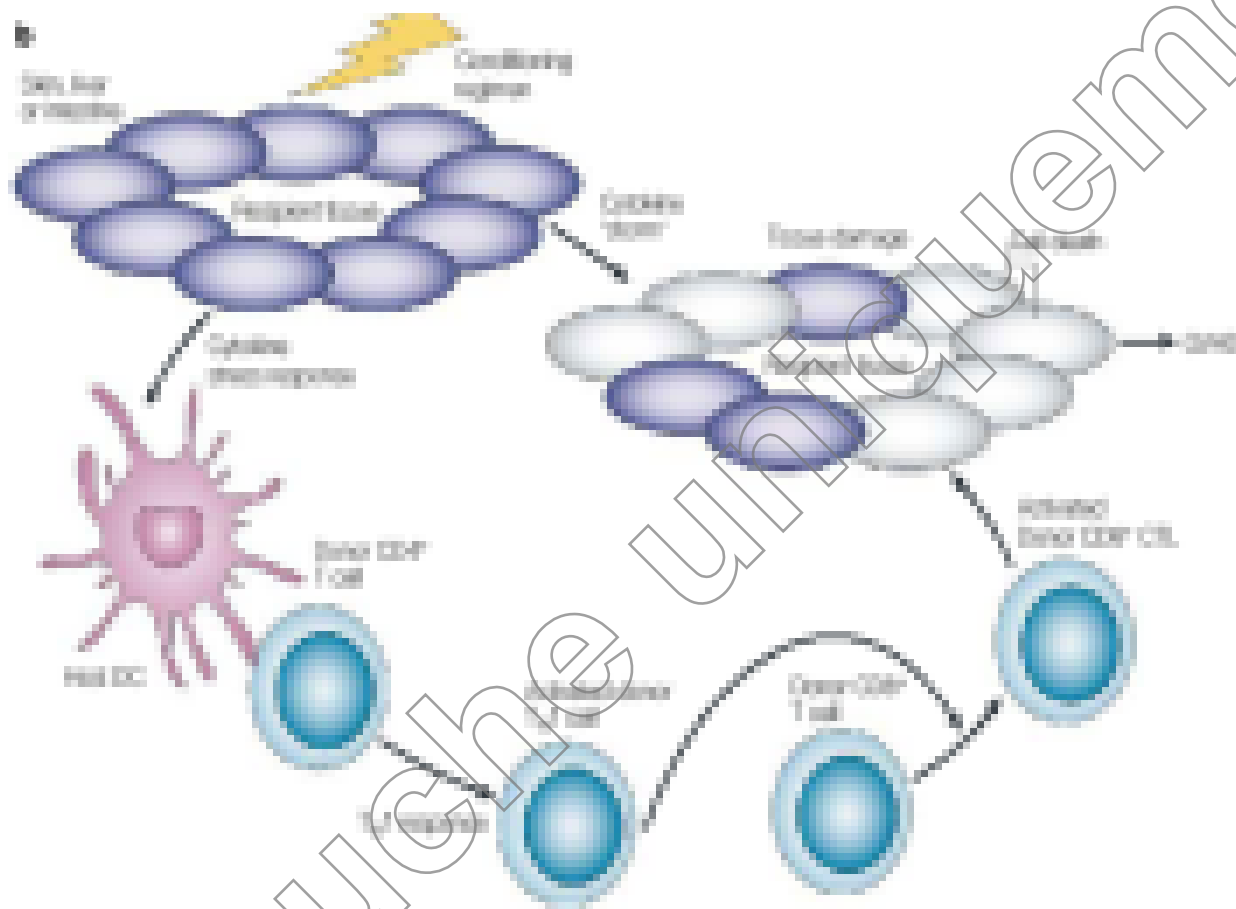
- En réponse à cette agression : production de cytokines, chémokines et induction de molécules d'adhérence = signaux délivrés au système immunitaire

TNF α , IL-1

CMH I et II

Décharge de LPS provenant bact gram-

Niveau LPS sanguin corrélé avec intensité dommages intestinaux et intensification de la réponse inflammatoire



2ème phase activation des LT du donneur

- T du donneur reconnaissent Ag étrangers présentés par les DC du receveur
- DC présentes dans les tissus sont activées par TNF α , IL-1 et endotoxine (LPS)
- DC des organes lymphoïdes secondaires et des organes seraient cruciales pour recrutement des LT

Activation des LT

- Engagement du récepteur T
- Nécessité du second signal d'activation
- Les cytokines:
activation T induit la production de cytokines: **IL2 et IFN- γ** , différenciation des CTL et NK
- **IL18** rôle complexe
- G-CSF : greffon cellules souches mobilisées par G-CSF : polarisation TH2

Activation des LT

- Engagement du récepteur T
- Nécessité du second signal d'activation
- Les cytokines:
activation T induit la production de cytokines: **IL2 et IFN- γ** , différenciation des CTL et NK
- **IL18** rôle complexe
- G-CSF : greffon cellules souches mobilisées par G-CSF : polarisation TH2

The CD28/B7 families of coreceptors (Ig like superfamily)

<u>Receptor</u>	<u>ligand</u>
CD28	CD86
CTLA-4	CD80
ICOS	ICOS-L (B7RP1)
PD1	PDL-1 PDL2
BTLA	B7x
TIM-3	?

Inhibitors / activators

The molecular events : surface receptors & ligands

1. First signals : Ag recognition and initiation of the synapse

1. Coactivation signals : a) crucial signals

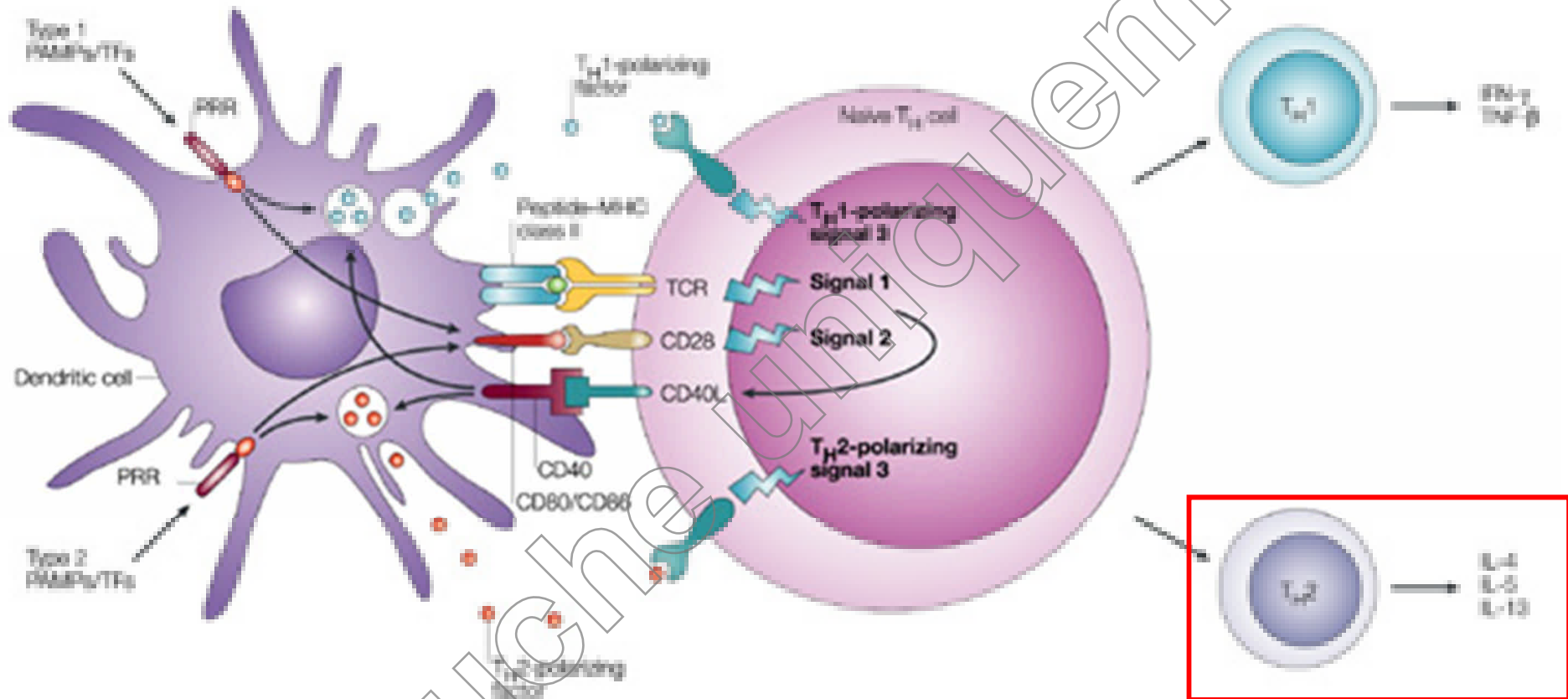
- CD28 - CD86/CD80

- CD154 - CD40

- ICOS - ICOSL

- CD100 - CD72

The 3 signals model for T cell functional polarization



GvH chronique?

Activation des LT

- Engagement du récepteur T
- Nécessité du second signal d'activation
- Les cytokines:

activation T induit la production de cytokines: **IL2 et IFN- γ** , différenciation des CTL et NK

- **IL18** rôle complexe
- G-CSF : greffon cellules souches mobilisées par G-CSF : polarisation TH2

Activation des LT

- Les chémokines :

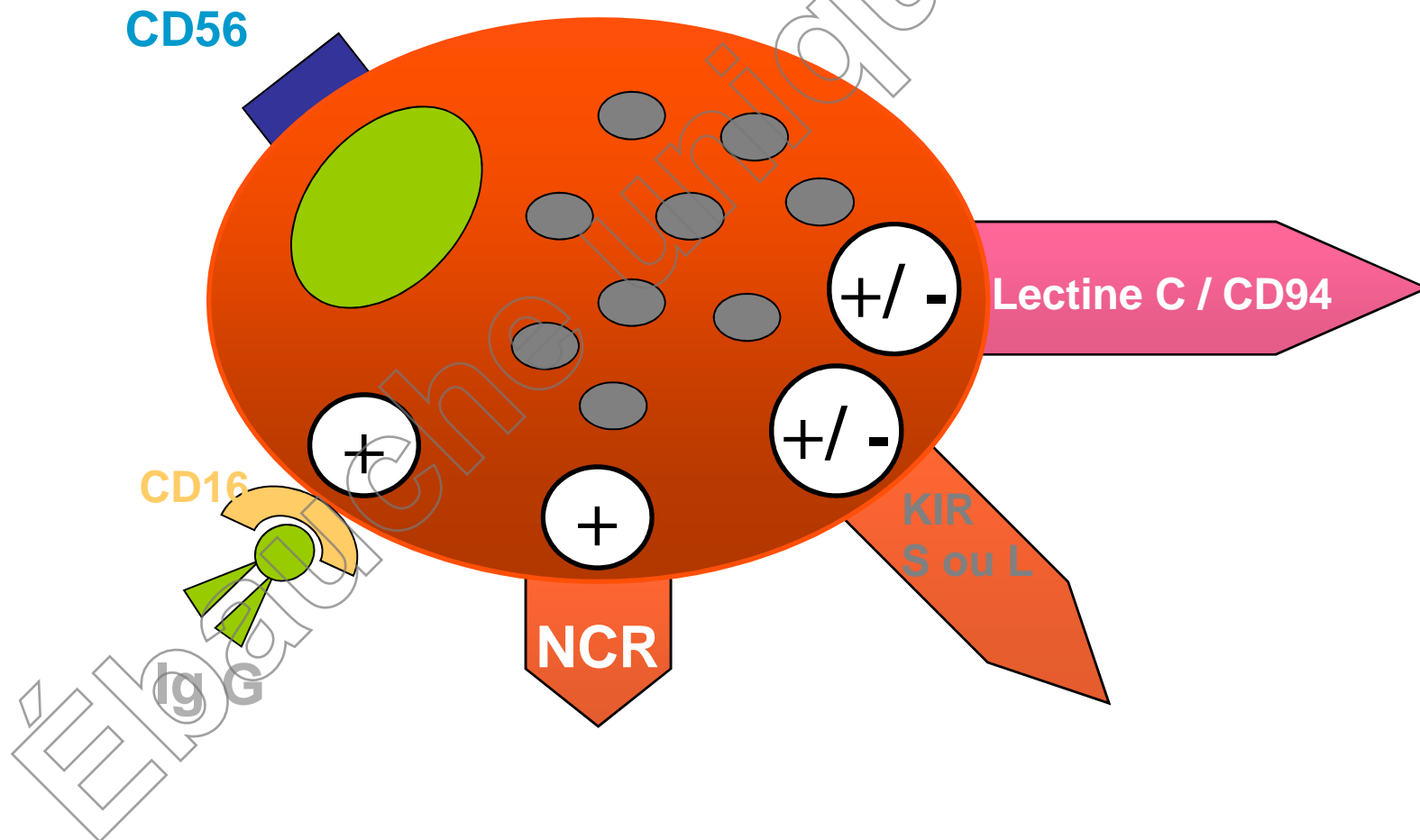
les chémokines inflammatoires (MIP 1a, MIP-2, MCP-1, MCP-3...) sont exprimées par les tissus endommagés = recrutement de cellules effectrices

Proposées comme marqueur de diagnostic précoce?

Les cellules natural Killers = NK

- Apparaissent très tôt après la greffe : production d'IFN- γ , TNF- α
- Lymphocytes sans marqueur T ou B
- Expriment CD16 (Ig Récepteur)
CD56 (molécule adhérence)
- Rôle décisif dans réponse immune innée (production cytokines)
- Répertoire NK stable pour un individu donné
- Cellules régulatrices
- Récepteurs pour CMH I
- Chaque cellule n'expriment pas tous les récepteurs

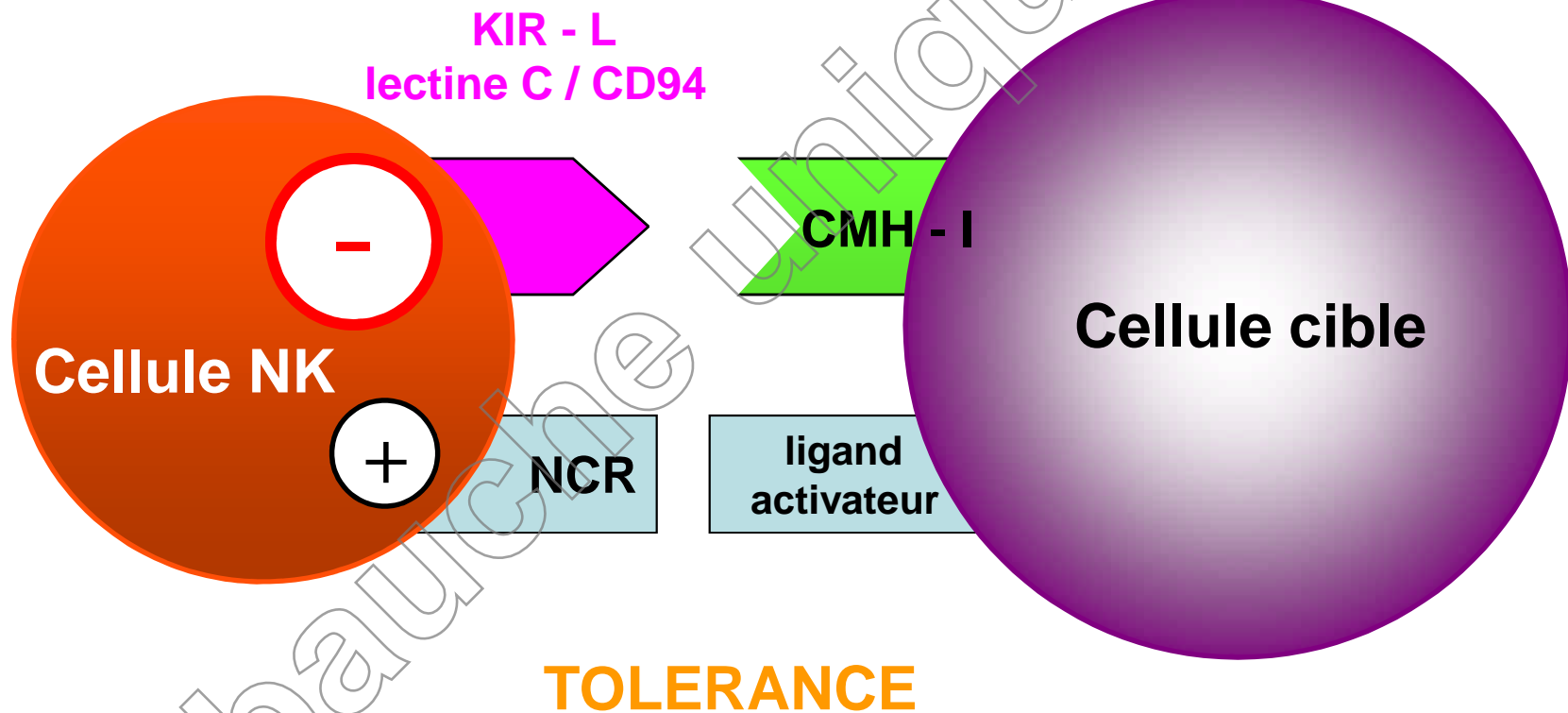
Caractéristiques phénotypiques des cellules Natural Killers



Mécanisme de cytotoxicité

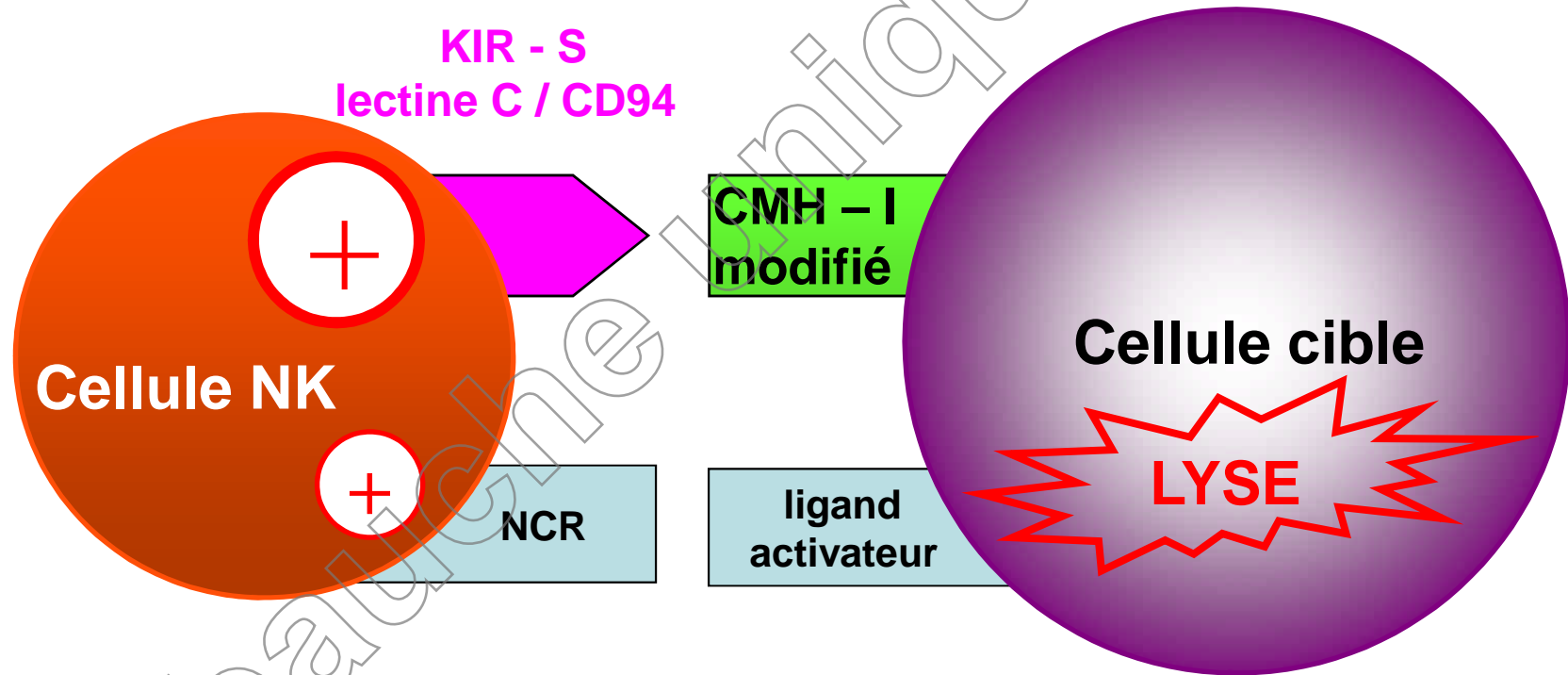
SIGNAL « OFF »

IGNORANCE



Mécanisme de cytotoxicité

SIGNAL « ON »



3ème phase : effecteurs cellulaires et inflammation

- Mise en jeu complexe d'effecteurs multiples :
 - système Perforine-Granzyme

LT et NK – Ca⁺⁺ la perforine est polymérisée

—————> pores dans la mb et le passage du granzyme activateur de caspases —————> mort cellulaire

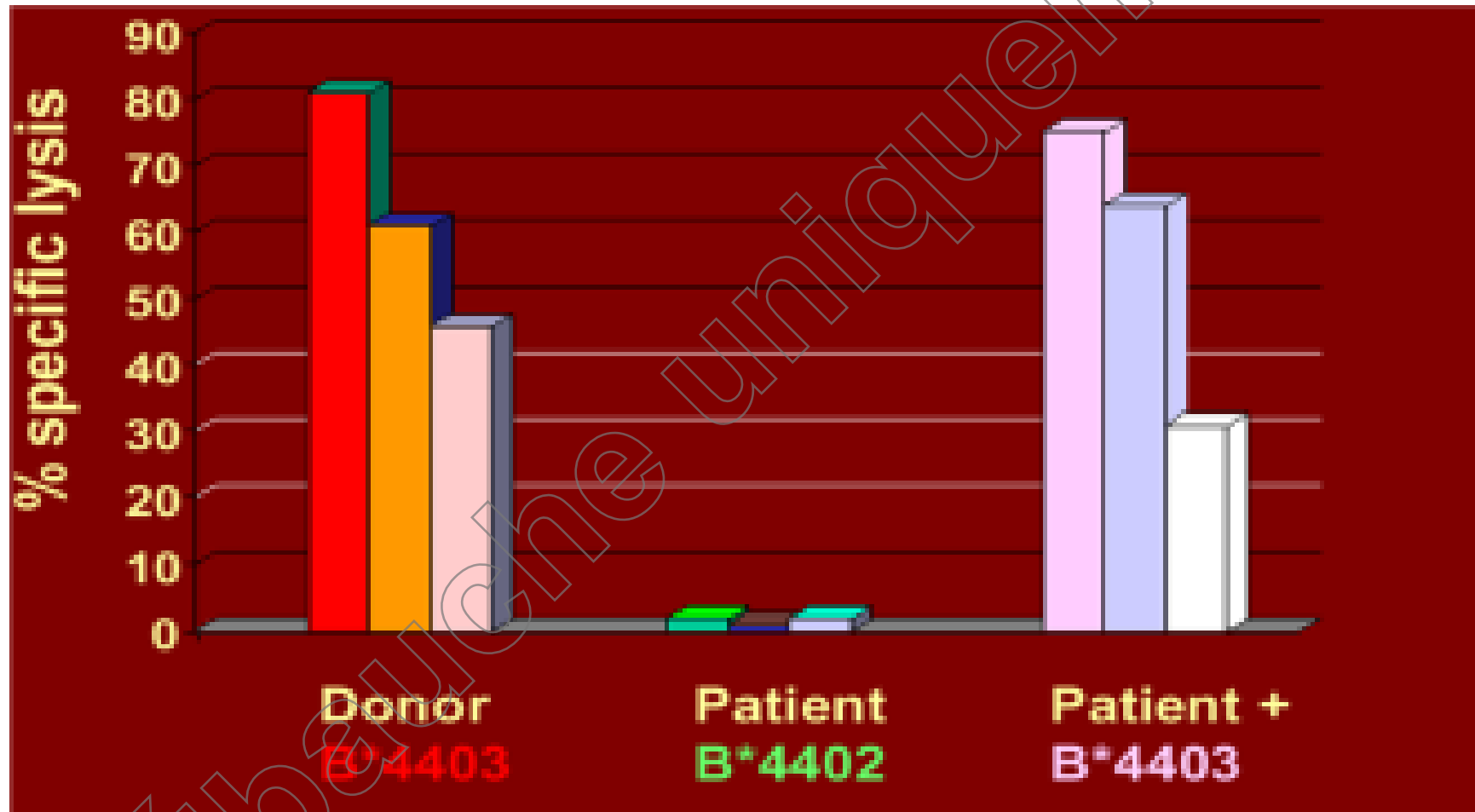
- Fas /FasL : augmentation sur CD4 et CD8

Donneur

- lésions dépendantes des cytokines

TNF α et nécrose tissulaire- IL1

Un seul acide aminé peut être la cible d'une réponse allogénique



Alignements des acides aminés pour les 3 groupes HLA-DP

Polymorphic regions

Groups	HLA-DPB1*	A			B			C			D		E	F				
		8	9	11	33	35	36	55	56	57	65	69	76	84	85	86	87	
1	0901	V	H	L	E	F	V	D	E	D	I	E	V	D	E	A	V	
	1001	—	—	—	—	—	—	—	—	E	—	—	—	—	—	—	—	
	1701	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	M	—	—	—	—	
2	0301	—	Y	—	—	—	—	—	—	—	L	K	—	—	—	—	—	
	1401	—	—	—	—	—	—	—	—	—	L	K	—	—	—	—	—	
	4501	—	—	—	—	—	—	—	E	—	L	K	—	—	—	—	—	
3	0101	—	Y	G	—	Y	A	A	A	E	—	K	—	—	—	—	—	
	0201	L	F	G	—	—	—	—	—	E	—	—	M	G	G	P	M	
	0202	L	F	G	—	L	—	E	A	E	—	—	M	G	G	P	M	
	0401	L	F	G	—	—	A	A	A	E	—	K	M	G	G	P	M	
	0402	L	F	G	—	—	—	—	—	E	—	K	M	G	G	P	M	
	0501	L	F	G	—	L	—	E	A	E	—	K	M	—	—	—	—	
	0601	—	Y	—	—	—	—	—	—	—	L	—	M	—	—	—	—	
	1101	—	Y	—	—	Q	Y	A	A	A	E	L	R	M	—	—	—	
	1301	—	Y	—	—	Y	A	A	A	E	—	—	I	—	—	—	—	
	1501	—	Y	G	—	Q	Y	A	A	A	E	L	R	M	V	G	P	M
	1601	L	F	G	—	—	—	—	—	E	—	—	M	—	—	—	—	
	1901	L	F	G	—	—	—	E	A	E	—	—	I	—	—	—	—	
	2001	—	Y	—	—	—	—	—	—	—	L	K	M	—	—	—	—	
	2301	L	F	G	—	—	—	A	A	E	—	K	M	G	G	P	M	
4601	L	F	G	—	—	—	—	—	—	—	—	M	G	G	P	M		

The six polymorphic pockets A-F encoded by HLA-DPB1 alleles³⁶⁻³⁸ are aligned with *0901 as consensus. Dashes indicate sequence identity to the consensus at this position.³ Only alleles belonging to immunogenicity groups 1-3 according to the classification from Table 2 are listed.

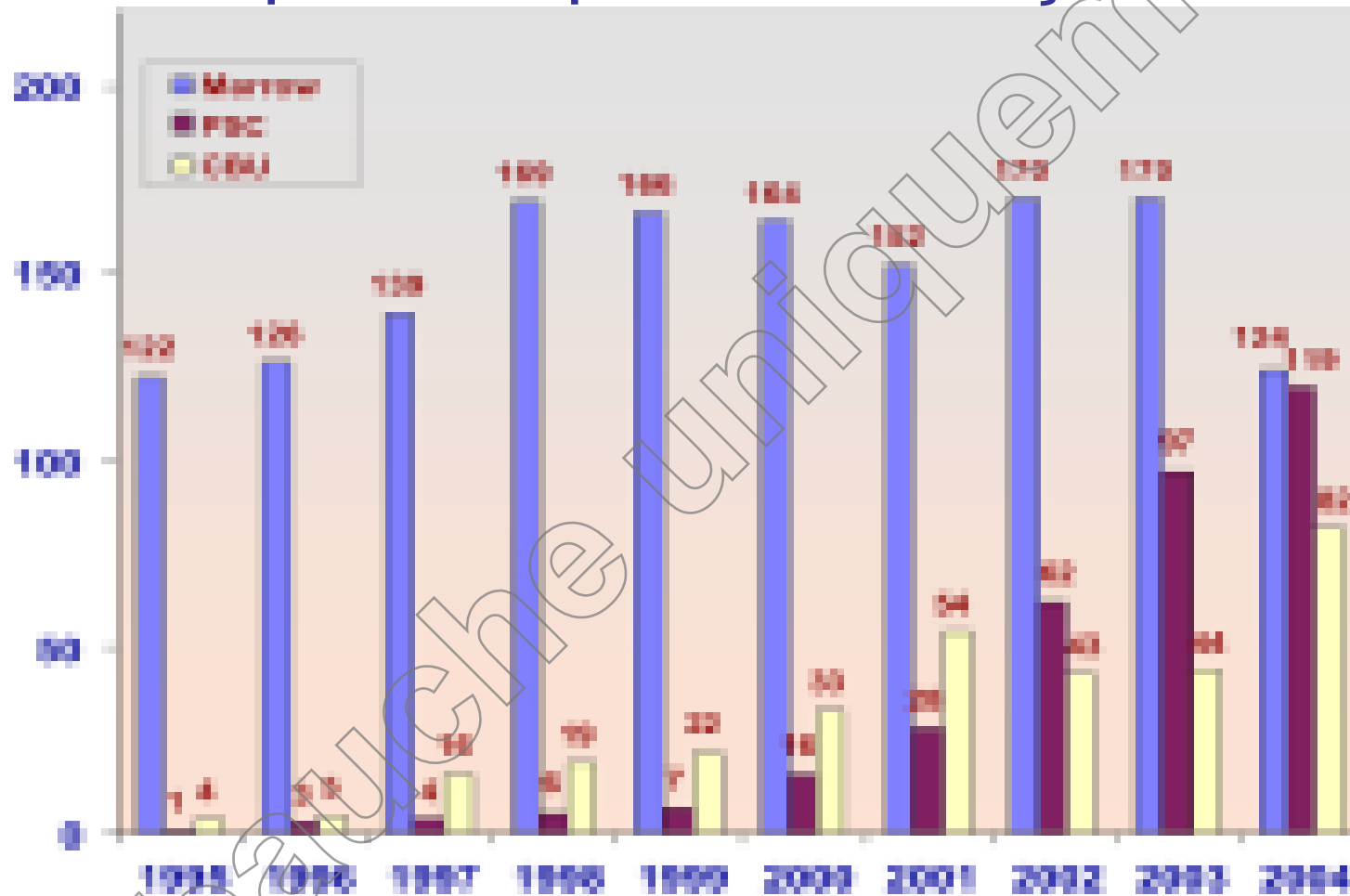
matching fonctionnel par analyse des cellules T alloréactives

- Analyse des cellules du patient avant greffe :
 - Culture mixte : remplacée par typage 4 digits DRB1
 - Précurseur cytotoxiques : remplacés par typage 4 digits classe I
- Analyse des cellules du patient après greffe :
 - utilisation des cellules T responsables de la réponse allogénique in vivo. Rejet aigu ou GvH

Les mismatches permissifs

- Matching structural :
 - HLA matchmaker (greffe d'organe)
 - Histocheck (CSH)
- Matching fonctionnel
 - **Caractérisation des cellules T alloréactives**

Evolution de l'origine des greffons de CSH pour les patients Français

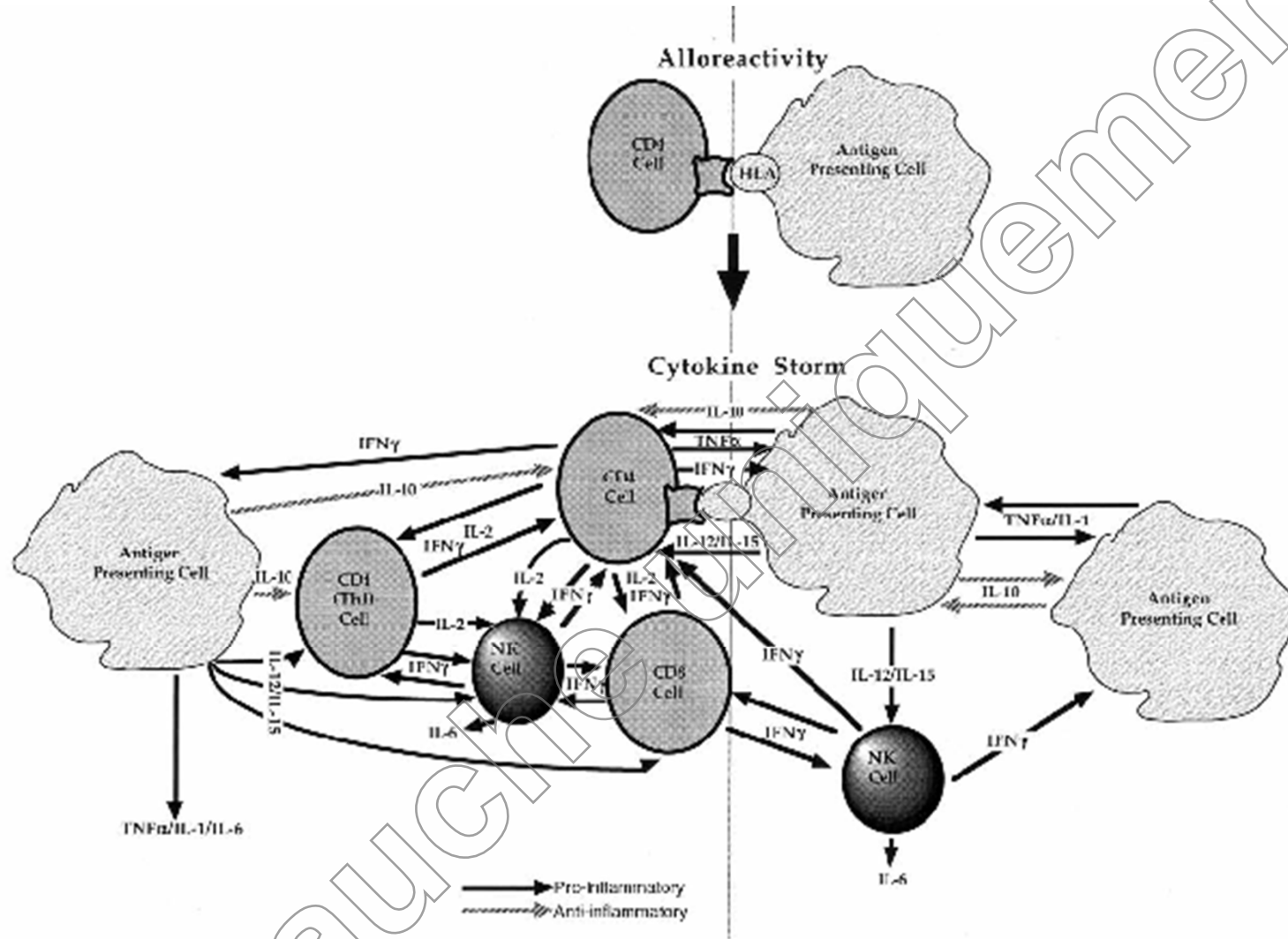


Prévention de la GvH

- Bonne compatibilité –CMH, mineurs, NK....
- Donneur et receveur HLA identiques 1er succès obtenu chez des jumeaux génétiquement identiques
- Compatibilité HLA est aussi nécessaire pour le fonctionnement du système immunitaire (Tc et cellules épithéliales)

Greffe

Receveur



Effet bénéfique de la Gvh : effet anti-leucémique

- Moelles déplétées en cellules T = Gvh ↓
- Mais nombre de rechutes ↑
- Effet des cellules T sur la tumeur amplifié par DLI