



Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/REAURG/>



MISE AU POINT

Comment est réalisé un typage HLA ? How is HLA typing performed?

V. Moalic^{a,b}

^a Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, hôpital Morvan, CHU de Brest, 2, avenue Foch, 29200 Brest, France

^b Inserm U613, 29200 Brest, France

Disponible sur Internet le 3 avril 2008

MOTS CLÉS

Histocompatibilité ;
Typage HLA ;
Polymorphisme ;
Nomenclature HLA

KEYWORDS

Histocompatibility;
HLA typing;
Polymorphism;
HLA nomenclature

Résumé Le système *human leucocyte antigen* (HLA), également connu sous le terme complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), est situé sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme. Il s'agit d'un système caractérisé par son polygénisme et son polymorphisme, qui sont à l'origine de nombreuses études réalisées dans le cadre des transplantations ou de l'auto-immunité. Initialement, la diversité antigénique du HLA a été analysée en utilisant la technique de sérologie. Depuis l'avènement de la technique de PCR au milieu des années 1980, la diversité génétique a pu être étudiée au niveau de l'ADN génomique par des techniques de biologie moléculaire. Cet article propose un court rappel sur le système HLA et sa nomenclature, puis décrit les techniques utilisées en routine dans les laboratoires pour réaliser un typage HLA.

© 2008 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary The human leucocyte antigen (HLA) region, also known as the major histocompatibility complex (MHC), is located on the short arm of chromosome 6 in humans. It is the most diverse and polymorphic genetic system with major functional and medical implications and has been one of the most regarding fields of investigation in transplantation medicine and autoimmunity. Initially, genetic variations at these loci were analyzed by HLA serologic typing. The introduction of polymerase-chain reaction (PCR) in the mid 1980s made possible the analysis of the extensive allelic sequence diversity. After a short description of the HLA system and its nomenclature, the aim of this paper is to present a short review of our current knowledge of the molecular basis of HLA polymorphism and of all the HLA typing methods usually performed in routine.

© 2008 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Le système *human leucocyte antigen* (HLA) ou complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est situé chez l'homme sur le bras court du chromosome 6, sur une distance totale

comprise entre trois et quatre mégabases. Il est divisé en trois régions (Fig. 1) :

- la région de classe I télomérique (loci HLA A, B, Cw) ;
- la région de classe II centromérique (loci HLA DR, DQ et DP),

Adresse e-mail : virginie.moalic@chu-brest.fr.

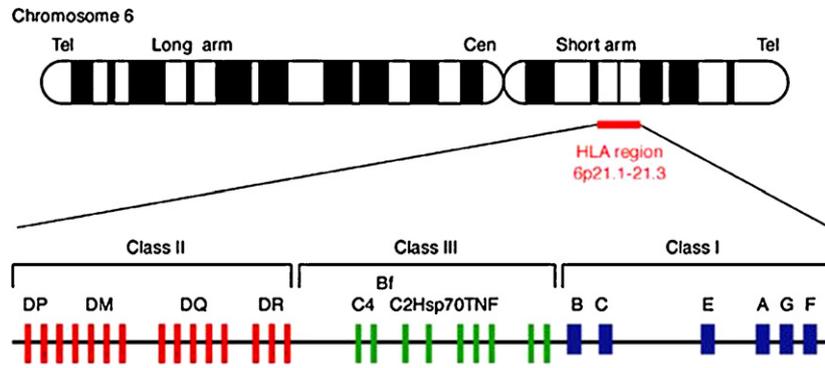


Figure 1 Cartographie des gènes HLA sur le chromosome 6 humain.

- la région de classe III (gènes de la 21-hydroxylase, des protéines du complément. .) [1].

Un locus est défini par la localisation d'un gène sur le chromosome. Les loci HLA ont pour caractéristiques principales leur polygénisme (il contient plus de 200 gènes, dont 40 environ codent pour des molécules HLA) et leur polymorphisme (existence d'un très grand nombre de variants alléliques pour chaque locus). Les molécules HLA de classe I sont distribuées sur l'ensemble des cellules nucléées et sur les plaquettes d'un individu [2]. Les molécules HLA de classe II ont une distribution tissulaire restreinte aux lymphocytes T activés, aux lymphocytes B, aux monocytes, aux macrophages et aux cellules dendritiques [1].

Les gènes *HLA* de classe I se composent de huit parties codantes (exons) séparées par des parties non codantes (introns) [2]. Les gènes de classe II contiennent également cinq ou six exons séparés par des régions introniques [1].

Le polymorphisme HLA peut être étudié par une approche sérologique (étude des antigènes à la surface des cellules) ou par une approche de biologie moléculaire (définition des allèles au niveau de l'ADN par l'étude en général des exons deux et trois pour la classe I et de l'exon deux pour la classe II). Les nomenclatures de sérologie et de biologie moléculaire sont différentes (Fig. 2). La nomenclature sérologique identifie le locus suivi d'un numéro identifiant l'antigène (exemples : HLA-A2, HLA-B27, HLA-DR4). La nomenclature génomique identifie le gène, suivi d'un asté-

risque et d'un numéro à deux chiffres (définit la spécificité de l'allèle) ou quatre à huit chiffres (précise le variant allélique d'un allèle donné). Un typage HLA avec deux chiffres correspond à une résolution générique (par exemple, *HLA-A*02*, *HLA-B*27*, *HLA-DRB1*04*) et peut être utilisé dans le cadre de l'urgence pour la greffe d'organes pour typer un donneur en état de mort encéphalique ou un receveur d'organes. Le typage générique suffit également dans le cadre d'une étude HLA maladie.

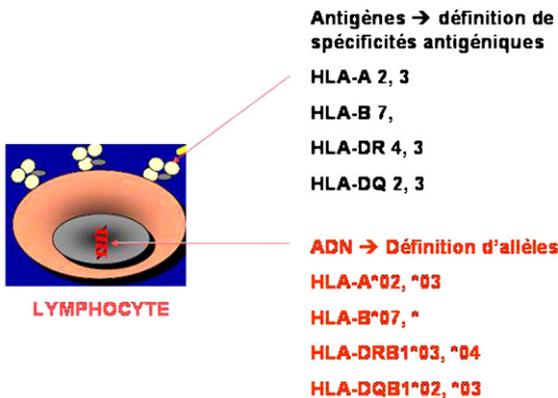
Un typage HLA avec quatre chiffres correspond à une résolution allélique ou spécifique (par exemple, *HLA-A*0201*, *HLA-B*2705*, *HLA-DRB1*0401*), sa principale indication est la recherche d'une compatibilité tissulaire entre un donneur et son receveur dans le cadre d'une allogreffe de moelle osseuse [2]. Plus rarement, il est conseillé pour la détermination de certains allèles associés aux maladies (par exemple, narcolepsie et *DRB1*1501*, *DQB1*0602*) [2].

Le typage HLA peut être réalisé par une technique sérologique de microlymphocytotoxicité, communément appelée LCT [3]. Il est alors réalisable sur cellules du sang périphérique (prélèvement d'un tube hépariné ou d'un tube ACD). Les quatre composants de la LCT sont les suivants :

- les lymphocytes du sujet à typer, qui portent les antigènes HLA à leur surface. Pour les groupages HLA de classe I (loci *HLA-A* et *HLA-B*), les cellules utilisées sont, soit les lymphocytes totaux, soit les lymphocytes T. Pour les groupages HLA de classe II (loci *HLA-DR* et *HLA-DQ*), les cellules utilisées sont les lymphocytes B.

La séparation des cellules mononucléées du sang périphérique est réalisé en utilisant un gradient de densité Ficoll-Isopaque, car chaque population cellulaire du sang périphérique a une densité différente. Une centrifugation permet de recueillir une couche de cellules mononucléées à l'interface plasma Ficoll. Cette couche contient environ 80% de lymphocytes T, 10% de lymphocytes B et 10% de monocytes. La séparation des différentes cellules mononucléées fait ensuite appel à des billes immunomagnétiques, qui retiennent les cellules d'intérêt par couplage à un anticorps monoclonal (anti-CD2 pour les lymphocytes T et anti-CD19 pour les lymphocytes B) [4] :

- une batterie d'anticorps de spécificité anti-HLA connue (anticorps monoclonaux ou alloanticorps humains), qui sont disposés dans les puits d'une plaque de typage ;



Patient homozygote pour le locus B et hétérozygote pour les autres loci

Figure 2 Comparaison des nomenclatures HLA de sérologie et de biologie moléculaire.

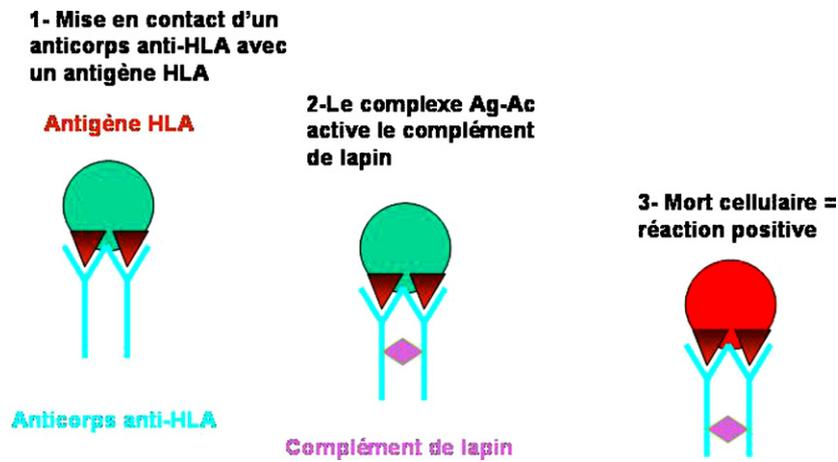


Figure 3 Principe d'une réaction positive en microlymphocytotoxicité.

- le complément de lapin ;
- le colorant dénommé fluoroquençh rajouté en fin de réaction. (Il s'agit d'un mélange d'acridine orange et de bromure d'éthidium).

La lecture des puits de la plaque a lieu au microscope inversé.

S'il y a eu reconnaissance dans un puits de la plaque, entre l'anticorps fixé au fond du puits et l'antigène HLA situé à la surface des lymphocytes du patient, le complexe antigène-anticorps formé active le complément de lapin, qui lyse ainsi les cellules. Les cellules mortes sont marquées d'une fluorescence rouge par le bromure d'éthidium (Fig. 3).

S'il n'existe pas de reconnaissance entre l'antigène de la cellule du patient et l'anticorps fixé au fond de la plaque, le complément n'est pas activé, les lymphocytes ne sont pas lysés. Les cellules vivantes sont marquées d'une fluorescence verte par l'acridine orange (Fig. 4).

Cette technique est la technique de typage historique, rapide et la moins coûteuse. En revanche, la LCT nécessite au départ une bonne viabilité cellulaire. De plus, l'interprétation est parfois difficile, car il existe de nombreuses réactions croisées et les plaques de typage ne montrent pas toujours une bonne discrimination pour la détection des antigènes de classe II.

Un typage HLA peut également être réalisé en faisant appel aux différentes techniques de biologie moléculaire, basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), qui permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin unique qui sert de matrice. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques, dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou *primers* en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. La polymérisation se fait de l'extrémité 5-prime vers l'extrémité 3-prime par une ADN polymérase qui ajoute successivement des désoxyribonucléotides présents dans le mélange en large excès. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice (Fig. 5) [5].

Des applications ont été développées permettant la réalisation des typages HLA. Parmi celles-ci, la technique de PCR-Sequence Specific Primers (SSP) a été développée en 1992 et utilise une ou deux amorces judicieusement choisies pour n'être capables de s'hybrider qu'avec une séquence déterminée spécifique d'un allèle ou d'un groupe d'allèle [6]. L'amplification ne sera vraiment effective que si la séquence de l'amorce est complémentaire de la séquence présente dans l'ADN génomique. Un gel d'électrophorèse en agarose à 2% après coloration de l'ADN au bromure d'éthidium (agent s'intercalant dans l'ADN), visualisé sous

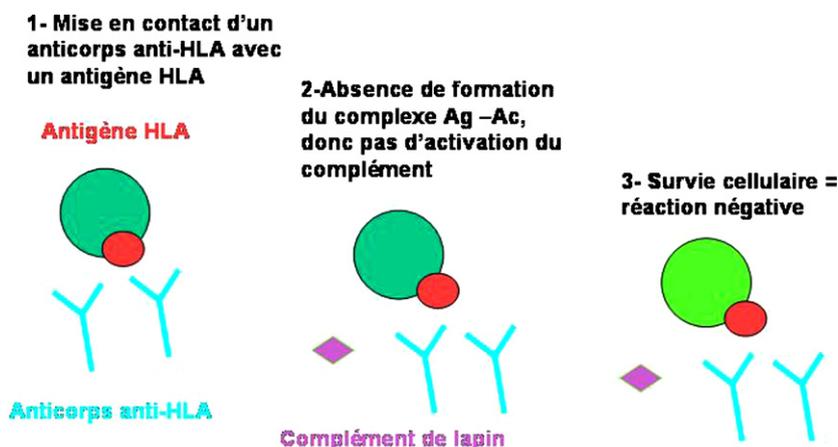


Figure 4 Principe d'une réaction négative en microlymphocytotoxicité.

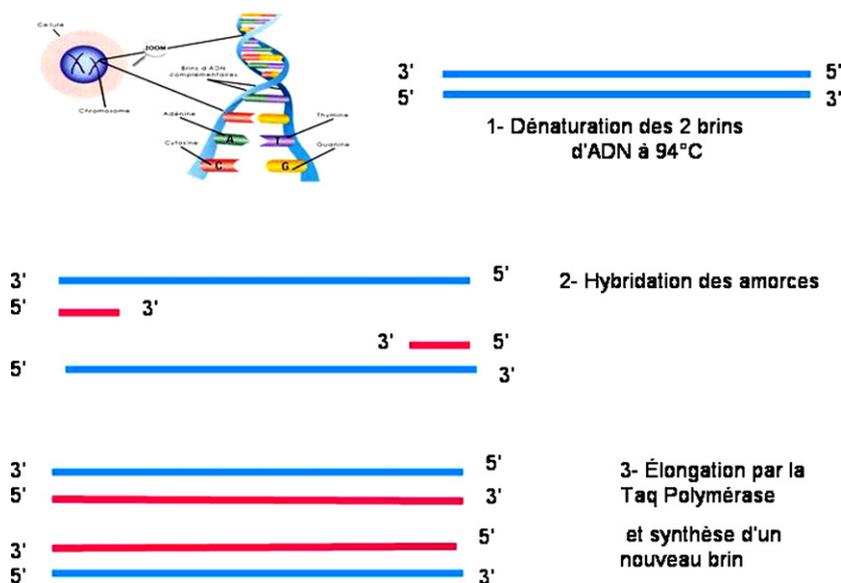


Figure 5 Les principales étapes de la réaction de PCR.

UV permet de voir les fragments amplifiés. Il s'agit d'une technique rapide, plutôt réservé aux typages ponctuels comme la demande de typage HLA pour les dons d'organes. Elle génère très peu d'ambiguïtés de typages (c'est-à-dire que plusieurs possibilités de typage existent pour le même individu), mais elle ne détecte pas les nouveaux allèles.

La technique de PCR–Sequence Specific Oligonucleotides (SSO) consiste en l'utilisation d'amorces localisées dans des séquences conservées, encadrant les régions polymorphes. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur une membrane avant d'être hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées par un marqueur radioactif ou une enzyme [7]. La technique de « reverse dot blot » est une variante de la technique de PCR–SSO. Ce sont les sondes que l'on veut hybrider qui sont fixées sur un support (membrane ou plaque). L'ADN génomique amplifié est marqué au cours de la réaction de PCR, en utilisant des amorces biotinylées et les produits de PCR seront hybridés avec un panel de sondes fixées sur un support solide. La présence de l'hybride est révélée par addition de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline et à son substrat, développant ainsi une réaction colorée (Fig. 6). Cette technique est automatisée, elle permet des typages ponctuels ou en série.

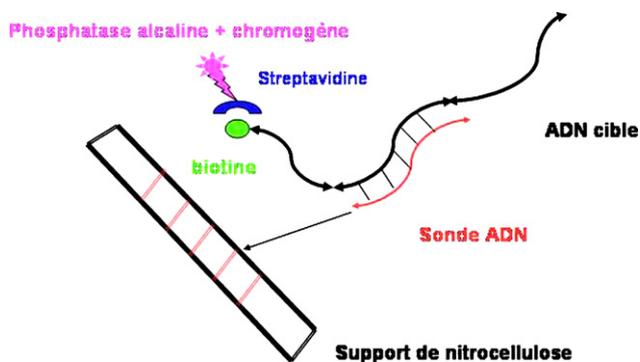


Figure 6 Principe de la technique de reverse dot blot.

L'inconvénient de ces deux techniques est la génération de résultats ambigus, obligeant à lever l'ambiguïté par une technique complémentaire. En revanche, il y a possibilité de détecter un nouvel allèle si l'hybridation à la sonde ne se fait pas correctement ou se réalise de façon inattendue.

Une variante de la PCR–SSO est utilisée dans la technique Luminex™ (Luminex Corp.). Les sondes oligonucléotidiques spécifiques du système HLA sont fixées sur des billes de polystyrène possédant chacune des caractéristiques de fluorescence. Le produit de PCR amplifié est marqué à la biotine au cours de la réaction d'amplification. L'hybridation du produit de PCR sur une bille portant la sonde complémentaire est révélée par un conjugué couplant streptavidine et phycoérythrine. Cette technologie novatrice est bien utilisée pour les typages en série (Fig. 7). Le détail de cette technologie est décrit dans l'article de Dunbar [8].

La dernière technique est celle de séquençage d'un fragment d'ADN amplifié par PCR. Elle nécessite l'utilisation d'un logiciel permettant de comparer la séquence d'ADN du patient aux séquences HLA consensus des banques de données [9]. Pour cela, on marque les fragments d'ADN obtenus par PCR grâce à des marqueurs fluorescents. Une

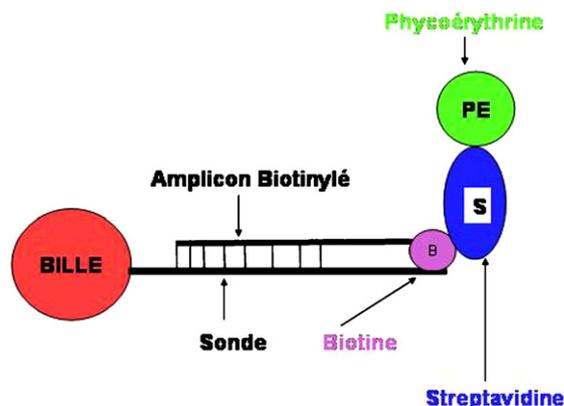
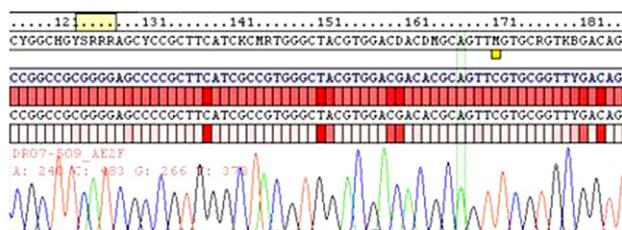


Figure 7 Détection d'allèles HLA par technologie Luminex®.



Chaque pic correspond à un nucléotide avec une couleur par base

C: bleu **A: vert**
G: noir **T: rouge**

Figure 8 Exemple du résultat de la séquence obtenu sur automate.

fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes, présentant la fluorescence détectée et l'interprétation qui en faite en terme de nucléotides (Fig. 8). Le séquençage est réalisé pour l'analyse des gènes HLA de classe I et II, il peut porter sur un allèle ou deux allèles pour un même locus. Il s'agit d'une technique semi-automatisée, qui permet un grand débit de typage et une très bonne résolution, mais qui demeure assez coûteuse. Elle n'est pratiquement utilisée en routine que pour apparier donneur et receveur de cellules souches hématopoïétiques. Elle permet aussi de détecter de nouveaux allèles grâce à la lecture complète de la séquence.

Le développement et l'utilisation des techniques de biologie moléculaire ont permis de démontrer l'extraordinaire polymorphisme et la diversité du système HLA, car chaque année, de nouveaux allèles HLA sont découverts. Les techniques de biologie moléculaire ont permis d'affiner considérablement les typages HLA, ce qui est un enjeu très important pour les allogreffes de moelle osseuse. Paradoxalement, cela a complexifié l'interprétation du typage HLA pour les cliniciens, car une nomenclature de biologie moléculaire cohabite désormais avec une nomenclature sérologique. Cependant, les progrès techniques, alliés au respect des standards d'assurance qualité des laboratoires

d'histocompatibilité (European Federation for Immunogenetics), contribuent à la fiabilité des examens réalisés.

Références

- [1] Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* 2007;48:11–23.
- [2] Cesbron-Gautier A, Gagne K, Retière C, Devys A, Bignon JD. Système HLA. EMC, *Hématologie* 2007, 13-000-M-53.
- [3] Terasaki Pi, Mac Clelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998–1000.
- [4] Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, Bratlie A, Lea T, Ugelstad J, et al. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation – a fast and reliable technique. *Tissue Antigens* 1986;28:301–12.
- [5] Vosberg HP. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum Genet* 1989;83:1–15.
- [6] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 h: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225–35.
- [7] Scharf SJ, Griffith RL, Erlich HA. Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes. *Hum Immunol* 1991;30:190–201.
- [8] Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP™ technology for rapid, high throughput multiplexed nucleid acid detection. *Clin Chim Acta* 2006;363:71–82.
- [9] Erlich HA, Opeltz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity* 2001;14:347–56.