

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1996



106 024590 6

N° 32/1

COMPARAISON DE TECHNIQUES DE
TYPAGE HLA-B27



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

obtenu après soutenance du

MEMOIRE

du diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

présentée et soutenue publiquement

le 14 juin 1996 à LIMOGES

par

Géraldine BONNAUDET épouse BONNAUD

née le 16 MAI 1965 aux Essarts

JURY

Monsieur le Professeur COGNE.....Président

Monsieur le Professeur BERTIN.....Juge

Monsieur le Professeur DENIS.....Juge

Monsieur le Professeur HABRIOUX.....Juge

Madame le Docteur DROUET.....Directrice de Thèse

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1996

N° 32

COMPARAISON DE TECHNIQUES DE
TYPAGE HLA-B27



THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

obtenu après soutenance du

MEMOIRE

du diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

présentée et soutenue publiquement

le 14 juin 1996 à LIMOGES

par

Géraldine BONNAUDET épouse BONNAUD

née le 16 MAI 1965 aux Essarts

JURY

Monsieur le Professeur COGNE.....Président

Monsieur le Professeur BERTIN.....Juge

Monsieur le Professeur DENIS.....Juge

Monsieur le Professeur HABRIOUX.....Juge

Madame le Docteur DROUET.....Directrice de Thèse

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

Monsieur le Professeur DENIS François

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE B
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique (C.S)	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BAUDET Jean (C.S)	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien (C.S)	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BERNARD Philippe	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOULESTEIX Jean (C.S)	PEDIATRIE
BOUQUIER Jean-José	CLINIQUE DE PEDIATRIE
BOUTROS-TONI Fernand	BIostatistique ET Informatique MEDICALE
BRETON Jean-Christian (C.S)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
CAIX Michel	ANATOMIE
CATANZANO Gilbert (C.S)	ANATOMIE PATHOLOGIQUE
CHASSAIN Albert	PHYSIOLOGIE
CHRISTIDES Constantin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	ANATOMIE
DUDOGNON Pierre	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DUMAS Michel (C.S)	NEUROLOGIE
DUMONT Daniel	MEDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé	REANIMATION MEDICALE
GAY Roger (C.S)	REANIMATION MEDICALE
GERMOUTY Jean	PATHOLOGIE MEDICALE ET RESPIRATOIRE
HUGON Jacques	HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE-CYTOGENETIQUE
LABROUSSE Claude (C.S)	REEDUCATION FONCTIONNELLE
LABROUSSE François	ANATOMIE PATHOLOGIQUE

LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LAUBIE Bernard (C.S)	ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
LEGER Jean-Marie (C.S)	PSYCHIATRIE D'ADULTES
LEROUX-ROBERT Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
LIOZON Frédéric	CLINIQUE MEDICALE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MENIER Robert (C.S)	PHYSIOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique	CHIRURGIE INFANTILE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
OUTREQUIN Gérard	ANATOMIE
PECOUT Claude (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
PERDRISOT Rémy	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PILLEGAND Bernard (C.S)	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
PIVA Claude (C.S)	MEDECINE LEGALE
PRALORAN Vincent (C.S)	HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
RAVON Robert (C.S)	NEUROCHIRURGIE
RIGAUD Michel	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ROUSSEAU Jacques (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
SAUTEREAU Denis	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
TABASTE Jean-Louis (C.S)	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
TREVES Richard (C.S)	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLAT Jean-Michel	NEUROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VANDROUX Jean-Claude (C.S)	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
VIDAL Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE
WEINBRECK Pierre (C.S)	MALADIES INFECTIEUSES

PROFESSEUR ASSOCIE A MI-TEMPS

MOULIN Jean-Louis 3ème CYCLE DE MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

* C.S = Chef de Service

A Philippe, Sophie et Morgane,

*pour votre patience, votre tendresse et votre
compréhension, que ce travail soit l'occasion de vous
témoigner tout mon amour.*

*A mes parents et à tous ceux de ma famille qui m'ont soutenue
affectueusement tout au long de mes études.*

A notre président de jury,

Monsieur le Professeur COGNE,

Professeur des Universités d'Immunologie

Immunologiste des Hôpitaux

Professeur attentif, nous avons pu apprécier vos compétences et votre confiance.

Que ce travail soit l'occasion de vous exprimer notre sincère reconnaissance et notre profond respect.

A notre directrice de thèse,

Madame le Docteur DROUET,

Praticien Hospitalier- Service d'Immunologie

Ce fut un immense plaisir de travailler à tes côtés. Ta disponibilité, tes connaissances et ta gentillesse nous ont permis la réalisation de ce travail.

Nous t'exprimons notre plus grande admiration et toute notre amitié.

A Monsieur le Professeur BERTIN

Professeur des Universités de Thérapeutique

Rhumatologue des Hôpitaux

Nous vous remercions de l'intérêt que vous portez à ce travail en acceptant de le juger.

Nous vous prions de recevoir le témoignage de notre respectueuse considération.

A Monsieur le Professeur DENIS

Professeur des Universités de Bactériologie Virologie

Biologiste des Hôpitaux

Chef de service

Nous avons pu bénéficier au cours de nos études de la richesse de vos connaissances et de la qualité de votre enseignement.

Nous tenons à vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur HABRIOUX

Professeur des Universités de Biochimie Fondamentale

Nous sommes très honoré de votre présence dans notre jury et nous vous assurons de notre profond respect.

Je remercie l'ensemble du personnel d'Immunologie qui a contribué à l'aboutissement de ce travail.

PLAN

I- INTRODUCTION

II - GENERALITES SUR LE COMPLEXE HLA

1- DEFINITION

2- STRUCTURE DES MOLECULES ET DES GENES HLA DE CLASSE I

2.1- La chaîne lourde α

2.2- La β 2 microglobuline

2.3- Le site de liaison du peptide

2.4- Les gènes de classe I

3- POLYMORPHISME DU SYSTEME HLA DE CLASSE I

3.1- Le polymorphisme allélique

3.2- Les variants HLA-B27

4- FONCTIONS DES MOLECULES HLA DE CLASSE I

4.1- Selection thymique de répertoire T

4.2- Présentation des peptides endogènes aux cellules T CD8+

4.2.1- Le récepteur des cellules T (TCR)

4.2.2- La molécule CD8

4.2.3- Le peptide

4.3- La réponse allogénique au CMH

5- REGULATION DE L'EXPRESSION DES MOLECULES DE CLASSE I

5.1- Les cytokines

5.2- Les virus

5.3- Les oncogènes

III - ASSOCIATION HLA-B27 ET MALADIES

1- GENERALITES

2- LES MALADIES ASSOCIEES A HLA-B27

2.1- La spondylarthrite ankylosante

2.2- Autres maladies associées à HLA-B27

2.2.1- Uveite antérieure aiguë

2.2.2- Les arthrites réactionnelles

a- Le syndrome de Fiessinger Leroy Reiter (FLR)

b- Les autres arthrites réactionnelles (AR)

2.2.3- Les pelvispondylites secondaires aux inflammations intestinales chroniques

2.2.4- Les autres rhumatismes apparentés à la SPA

2.3- Physiopathologie

2.3.1- Les modèles animaux

2.3.2- Rôle structural de la molécule HLA-B27

2.3.3- Infections bactériennes et hypothèse du mimétisme moléculaire

2.3.4- Hypothèse du facteur modifiant HLA-B27

2.3.5- Théorie du peptide arthritogénique

2.3.6- Autres facteurs génétiques

2.3.7- Conclusions

IV - TECHNIQUES DE TYPAGE DU SYSTÈME HLA DE CLASSE I

1- IDENTIFICATION DE L'ANTIGÈNE HLA

1.1- Techniques serologiques.

1.1.1- Lymphocytotoxicité

1.1.2- Cytométrie en flux

a- Principe

b- L'appareil

c- Le phénotypage HLA-B27

1.1.3- Technique immuno-enzymatique

1.2- Technique cellulaire.

2- TECHNIQUE BIOCHIMIQUE: ELECTROPHORESE D'ISOELECTROFOCALISATION (IEF)

3- IDENTIFICATION DES GENES HLA

3.1- Techniques de biologie moléculaire

3.1.1- Extraction de l'ADN génomique

3.1.2- Technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme) ou étude du polymorphisme de taille des fragments de restriction

3.1.3- Les techniques de PCR

a- Principe et description

b- PCR-SSO

c-PCR-RFLP

c- PCR-ASA ou PCR-SSP

3.2- Le séquençage

4- PARTICULARITES DU TYPAGE HLA-B27

V- SUJET DE L'ETUDE

1- STRATEGIE DU LABORATOIRE

1.1- Généralités

1.2- Cytométrie en flux (CMF)

1.3- Microlymphocytotoxicité

2- OBJECTIFS DU TRAVAIL

2.1- Etude de 3 anticorps monoclonaux en cytométrie

2.2- Typage HLA-B27 générique par biologie moléculaire

2.3- Sous-typages HLA-B27 par biologie moléculaire

VI- MATERIELS ET METHODES

1- MATERIELS

1.1- Population de malades

1.2- Population témoin

1.3- Lignées lymphoblastoïdes

1.4- ADN de référence

2- METHODES

2.1- Cytométrie en flux

2.1.1- Anticorps monoclonaux

2.1.2- Cytomètre

2.1.3- Techniques de marquage direct des cellules

a- Ac monoclonal anti HLA-B27 FITC/ Ac monoclonal anti HLA-B7 PE (IMMUNOTECH®). Clone HLA-ABC-m³

b- Ac monoclonal anti HLA-B27 FITC/ Ac monoclonal anti CD3 PE (BECTON DICKINSON®). Clone GS 145.2

c- Ac monoclonal anti HLA-B27 FITC (ONE LAMBDA®). Clone FD705-9E1E10

2.2- Biologie moléculaire

2.2.1- Extraction de l'ADN génomique

a- Technique

b- Réactifs

c- Mesure de la concentration d'ADN

2.2.2- Amplification de l'ADN par PCR-SSP

a- Amorces

b- Mélange réactionnel

c- Programme d'amplification

d- Résultats

2.2.3- Sous-typages HLA-B27 par PCR-SSO

a- Amplification de l'ADN

b- Les sondes oligonucléotidiques

c- Dot-blot

d- Marquage des sondes avec la digoxigénine (dig-dd UTP)

e- Préhybridation

f- Hybridation

g- Lavages

h- Révélation par chémoluminescence

i- Résultats

VII - RESULTATS

1- TYPAGE HLA-B27 PAR TECHNIQUE DE PCR-SSP

1.1- Validation de la technique

1.2- Résultats du typage HLA-B27 dans la population de patients

2- CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)

2.1- Répartition des moyennes de fluorescence

2.1.1- Anticorps monoclonal ONE LAMBDA

2.1.2- Anticorps monoclonal BECTON DICKINSON

2.1.3- Anticorps monoclonal IMMUNOTECH

2.2- Determination des seuils de négativité

2.3- Determination des seuils de positivité

2.4- Etude de la population indéterminée

2.5- Resultats du phénotypage HLA-B7

2.6- Resultats du phénotypage des lignées lymphoblastoïdes

2.7- Réactions croisées avec les Ag du CREG-B7

3- RESULTATS DU SOUS-TYPAGE HLA-B27

4- DONNEES CLINIQUES

VIII- DISCUSSION

1- INTERET DE LA PCR-SSP POUR LE PHENOTYPAGE HLA-B27

2- INTERET DE LA CYTOMETRIE DE FLUX

2.1- Lyse des érythrocytes

2.2- Nombre de leucocytes et de lymphocytes dans le sang

2.3- Concentration de l'anticorps

2.4- Population de cellules analysées

2.5- Reconnaissance d'épitopes différents

2.6- Les sous-types HLA-B27

IX- CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

I

INTRODUCTION

C'est en 1973 que fut découverte l'association spectaculaire entre l'antigène HLA-B27 et la spondylarthrite ankylosante (SPA). Depuis, elle a été confirmée dans les différents groupes ethniques étudiés. Bien que le complexe HLA ne soit qu'un des éléments d'une susceptibilité polygénique et polyfactorielle, cette association constitue un élément prédisposant que le clinicien s'attache à rechercher lorsqu'il existe des symptômes évoquant une SPA.

Parmi les moyens dont on dispose pour réaliser le phénotypage HLA-B27, la cytométrie en flux (CMF) semble la mieux adaptée en première intention. Mais, comme toutes les techniques sérologiques, elle a ses limites et demande dans certains cas à être confirmée par une technique de référence qui pourrait être une technique de biologie moléculaire.

Le but de cette étude est de définir une conduite de typage HLA-B27 en routine avec comparaison d'anticorps produits par différents clones pour l'analyse en cytométrie de flux, et la mise au point d'une technique de biologie moléculaire pour le contrôle des échantillons douteux en CMF.

Dans un second temps nous analyserons les différents paramètres pouvant influencer l'interprétation du phénotypage en CMF et notamment les différents sous-types HLA-B27. Pour cela, une technique de sous-typage par biologie moléculaire sera développée.

II

GENERALITES

1-DEFINITION

Le complexe HLA (Human Leucocyte Antigens) est constitué par un groupe de gènes dont le rôle est essentiel pour l'organisme tout entier. Marqueurs du soi, ils ont une influence déterminante sur la spécificité et la régulation de la réponse immunitaire. Ils constituent ainsi le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de l'homme, aussi appelé Complexe Majeur de Présentation et d'Histocompatibilité (CMPH) par COLOMBANI (1993) et Histoglobine par BUDHER. Le CMPH est défini comme l'ensemble des molécules impliquées dans la présentation de peptides au récepteur des cellules T (TCR).

Le premier CMH identifié fut celui de la souris (le système H2) par Görer en 1936 lors de travaux sur la survie de greffes. Depuis, des CMH ont été trouvés chez toutes les espèces de mammifères étudiées.

Chez l'homme, le CMH est le système HLA localisé sur le bras court du chromosome 6, où il occupe un segment d'environ 3600 kb comptant plus de 86 gènes identifiés. Trois régions sont individualisées du centromère vers le télomère correspondant respectivement aux gènes de classe II, III et I, (figure 1).

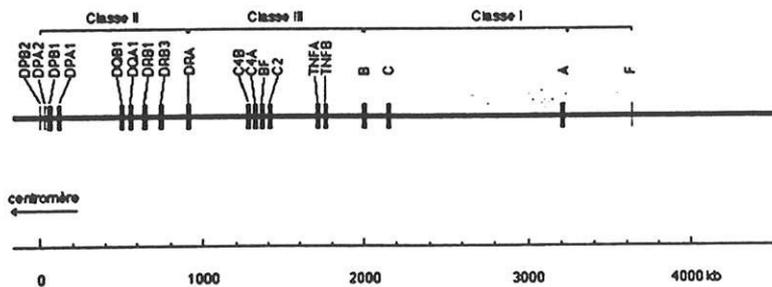


Figure 1

Carte moléculaire de la région HLA [COLOMBANI, 1993]

La région HLA-D contient les gènes de classe II codant pour les chaînes α et β des molécules HLA de classe II, les gènes TAP1 et TAP2 codant pour une protéine transporteuse de peptides et les gènes LMP2 et LMP7 codant pour des éléments du protéasome (figure 2).

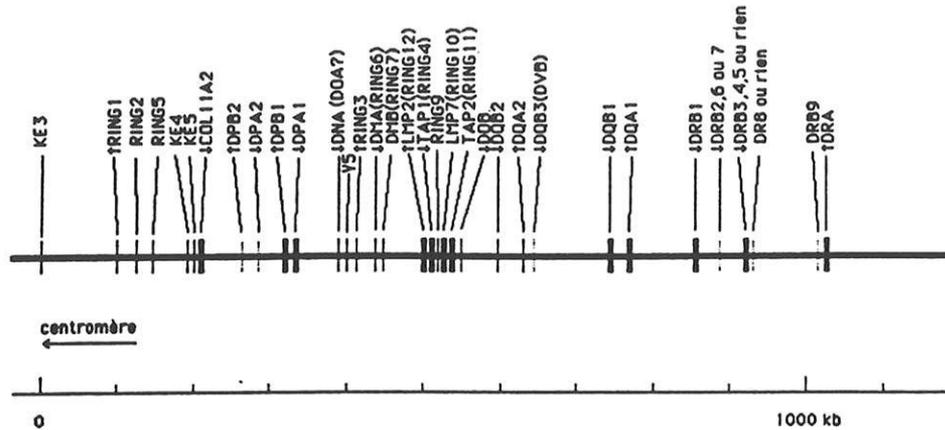


Figure 2

Carte moléculaire de la région HLA de classe II [COLOMBANI,1993]

La région de classe III est caractérisée par la présence des gènes du complément C4B, C4A, BF et C2, ainsi que par de nombreux autres gènes dont les produits ne sont connus que dans un nombre limité de cas (ex : HSP70, TNFA et TNFB) (figure 3).

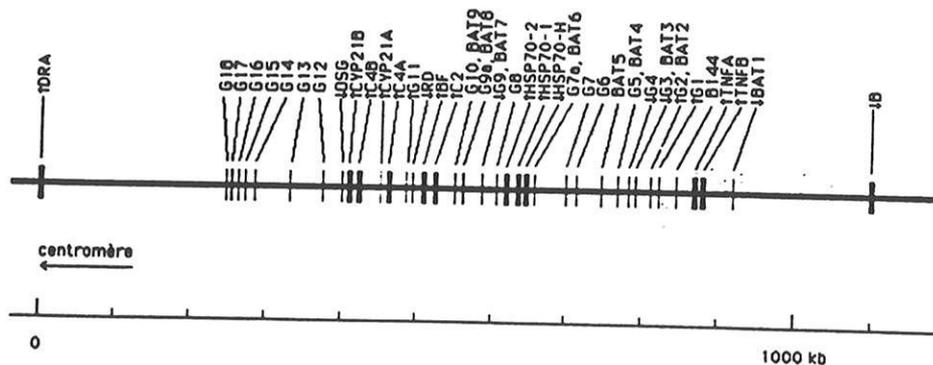


Figure 3

Carte moléculaire de la région HLA de classe III [COLOMBANI,1993].

La région de classe I contient environ 20 gènes de classe I dont 8 sont officialisés à la nomenclature (A, B, C, E, F, G, H, J). Les gènes de classe I codent pour une chaîne lourde protéique, qui associée à la $\beta 2$ microglobuline constitue la molécule HLA exprimée à la membrane de la plupart des cellules nucléées de l'organisme (figure 4).

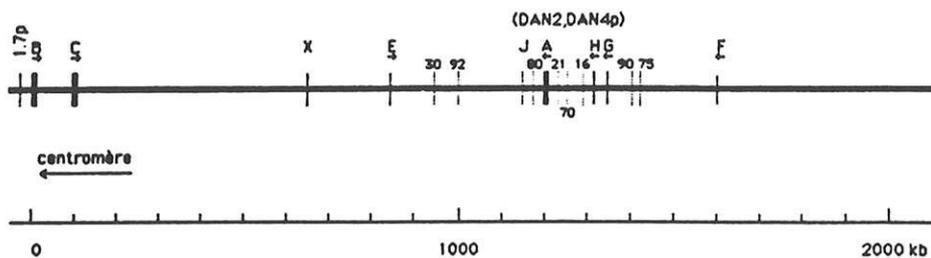


Figure 4

Carte moléculaire de la région HLA de classe I [COLOMBANI,1993]

Tous ces gènes sont caractérisés par leur polymorphisme, leur transmission haplotypique et leur expression codominante.

Ce travail ne reprendra que les caractéristiques des molécules HLA de classe I.

2-STRUCTURE DES MOLECULES ET DES GENES DE CLASSE I

Les molécules classiques (A,B,C) de classe I sont des glycoprotéines hétérodimeriques associant de façon non covalente une chaîne lourde (H ou α) de poids moléculaire 44 kDa, implantée dans la membrane cellulaire, hautement polymorphe, codée par un gène de classe I, et une chaîne légère ou $\beta 2$ -microglobuline, de poids moléculaire 11,5 kDa, non polymorphe, codée par le gène $\beta 2m$ du chromosome 15, et qui n'est pas implantée dans la membrane cellulaire (figure 5).

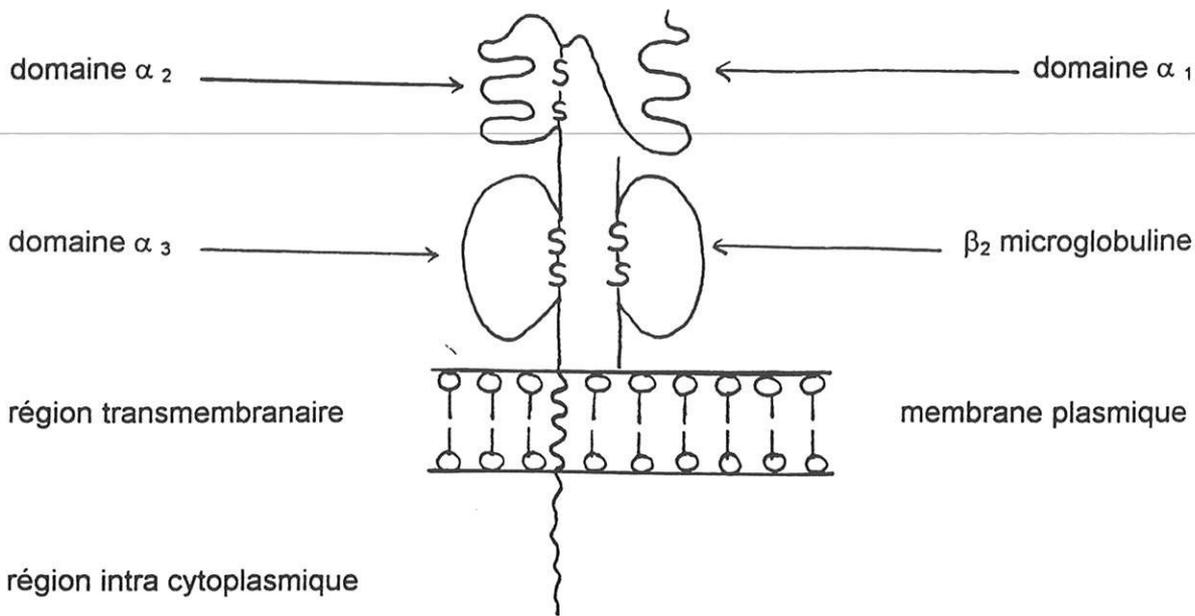


Figure 5

Représentation de la molécule HLA de classe I.

2.1-La chaîne lourde α

La chaîne lourde compte 345 résidus d'acides aminés et comprend 3 régions :

- Une région extracellulaire de 274 acides aminés, organisés en 3 domaines α_1 , α_2 , α_3 . Les domaines α_1 et α_2 sont symétriques. Chacun est formé d'un feuillet β composé de 4 chaînes β antiparallèles couplées à une hélice α . Les deux feuillets β de α_1 et α_2 s'associent pour former un seul feuillet supportant les deux hélices α . Le domaine α_3 est suivi d'un polypeptide de liaison de 13 résidus avant l'entrée dans la membrane.

- Une région transmembranaire composée de 27 acides aminés pour la plupart hydrophobes, assurant l'ancrage dans la double couche lipidique.

- Une région intracytoplasmique composée de 28 acides aminés, et possédant des sites de phosphorylation.

2.2- La $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2 m$)

La $\beta 2 m$ est un polypeptide de 99 acides aminés. Elle est sécrétée en large excès par rapport à la chaîne lourde et, bien qu'elle ne fasse pas partie du site antigénique HLA, elle est nécessaire à l'expression des molécules de classe I à la membrane. Ainsi, la cellule Daudi qui ne peut synthétiser la $\beta 2$ -microglobuline, n'exprime pas les antigènes HLA de classe I.

2.3- Le site de liaison du peptide.

L'interaction entre les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forme une cavité de 2,5 nm sur 1 nm dont le fond est un feuillet β plissé et les bords des hélices α (figure 6).

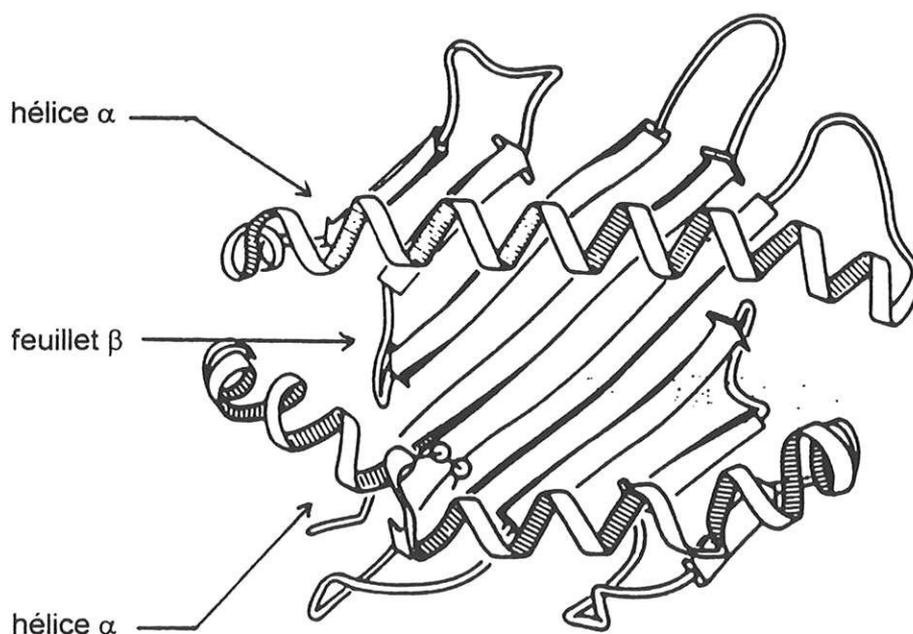


Figure 6

Structure des domaines α_1 et α_2 de la molécule HLA de classe I

[COLOMBANI, 1993].

Cette cavité est située au sommet de la molécule et a été identifiée au site de liaison du peptide. En effet, c'est dans cette zone que se situent les résidus

polymorphes qui vont interagir avec les peptides de molécules antigéniques du soi ou du non-soi. Cette cavité est constituée de replis formant des poches. Six poches ont été identifiées (A, B, C, D, E, F) le long de la fente. Elles ont la capacité de se combiner ou non à différentes chaînes latérales de peptides. Les poches B, C, D et E sont situées à la jonction du feuillet β et de l'hélice α . Les poches A et F sont situées à l'extrémité de la fente et sont limitées par les extrémités des hélices α_1 et α_2 .

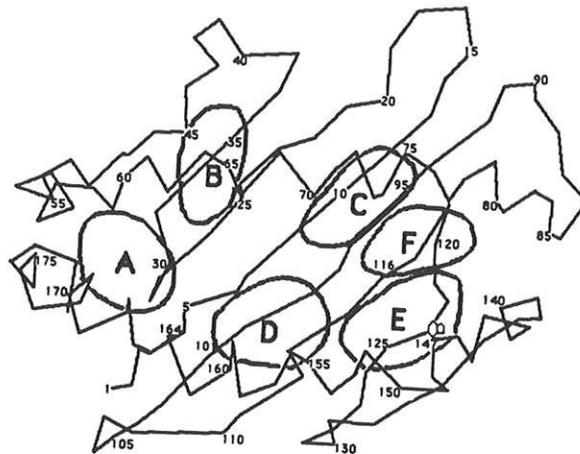


Figure 7

Poches du sites de liaison de la molécule HLA

La cavité est bordée d'acides aminés dont certains sont importants pour leur reconnaissance par le récepteur des cellules T (TCR).

2.4- Les gènes de classe I

Les gènes de classe I comportent 8 exons et 7 introns. Le premier exon code la région 5' non traduite et le peptide signal. Les exons 2, 3 et 4 codent respectivement les trois domaines extramembranaires. Les exons 5, 6 et 7 codent le peptide de connexion, les régions transmembranaire et cytoplasmique et la région 3' non traduite. L'exon 8 code seulement la région 3' non traduite pour les

gènes du locus B. Il code également la fin de la chaîne intracytoplasmique pour les gènes du locus A (figure 8).

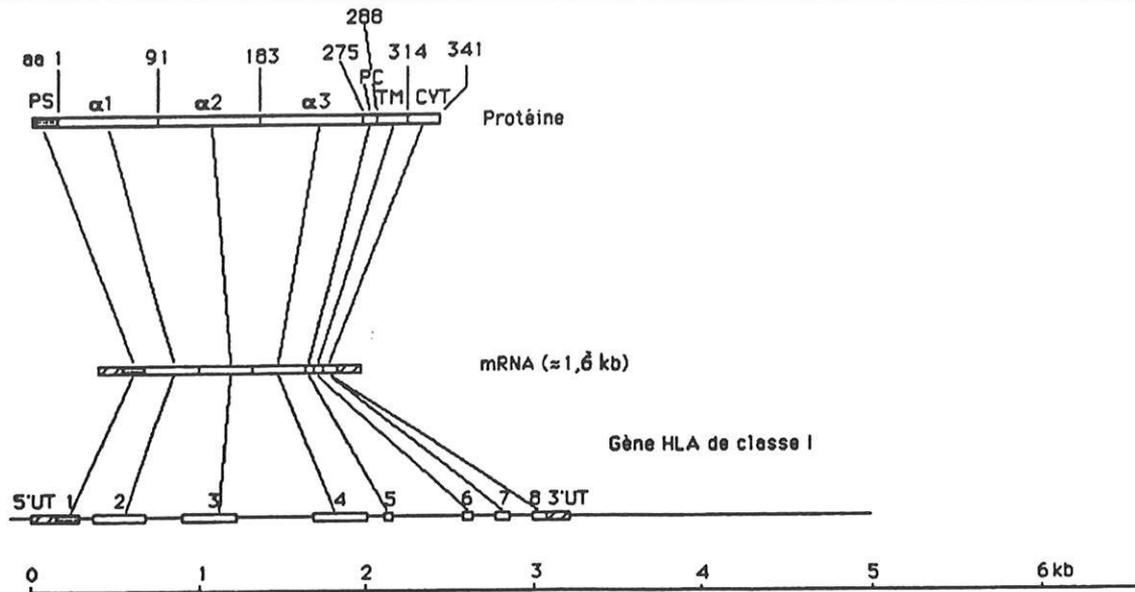


Figure 8

Structure des gènes HLA de classe I [COLOMBANI,1993]

3-LE POLYMORPHISME DU SYSTEME HLA.

3.1- Le polymorphisme allélique.

Le polymorphisme allélique qui s'est constitué au cours de l'évolution est la caractéristique principale des gènes du CMH. La région de classe I chez l'homme contient plusieurs loci appelés HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K, L. A chaque locus correspond de nombreux allèles ou spécificités sans que toutes soient aujourd'hui connues. La nomenclature de 1994 fait état de 190 allèles HLA de classe I : 50 allèles A, 97 allèles B, 34 allèles C, 4 allèles E, 4 allèles G, 1 allèle F.

Les allèles présents sur la région du CMH d'un seul brin d'ADN constituent un haplotype. Les gènes du CMH sont transmis selon une loi mendélienne simple et sont exprimés de façon codominante. Chaque individu

reçoit un haplotype paternel et un haplotype maternel. L'ensemble constitue le génotype codant pour les antigènes HLA exprimés à la surface des cellules et définissant le phénotype. Ainsi, il existe un grand nombre de combinaisons génotypiques possibles, dépassant théoriquement 10^{10} .

La comparaison des séquences d'acides aminés permet de définir les régions variables et les régions conservées des molécules HLA de classe I. Le polymorphisme structural est restreint aux domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$, constitutifs du site de liaison du peptide et de la région de contact avec le TCR.

Lors de sa mise en évidence, la reconnaissance de l'allèle HLA-B27 était immunologique c'est à dire faisant appel à des techniques sérologiques et notamment la microlymphocytotoxicité dépendante du complément. Or, cette reconnaissance peut être soit monoépitopique, c'est le cas des anticorps monoclonaux qui ne reconnaissent qu'un seul épitope, celui-ci étant spécifique d'un allèle ou partagé par plusieurs allèles, soit polyépitopique, c'est le cas des alloserums reconnaissant plusieurs épitopes. Or, la reconnaissance immunologique qu'elle soit mono ou polyépitopique, ne permet pas d'exclure des réactions croisées. Ainsi, il existe un groupe d'allèles auquel appartient la spécificité HLA-B27 ayant une forte homologie de séquence d'acides aminés et donc reconnu par un même anticorps. Ce groupe de réaction croisée est appelé CREG-B7 et comporte chez les caucasiens les spécificités B7, B13, B40 (subdivisé en B60 et B61), B41 et B42, B47, B22 (subdivisé en B54, B55, B56), et B27. Concernant la reconnaissance polyépitopique des spécificités de la série HLA-B, il existe deux spécificités supertypiques HLA-Bw4 et HLA-Bw6 se comportant comme un système diallèlique, où chaque spécificité supertypique a une fréquence phénotypique voisine de 60%. Chaque spécificité HLA-B est associée soit à Bw4, soit à Bw6. Ainsi, l'allèle B27 est associé à Bw4 sauf le variant B*2708 qui est associé à Bw6.

3.2- Les variants B27 et leur fréquence

Dans la population caucasienne, la fréquence de l'allèle B27 est de 4%. Elle est de 2,5% dans les populations noires, de 2,8% chez les Indiens des Indes et de 3,7% chez les asiatiques.

Pour la spécificité HLA B27 il existe une microhétérogénéité à l'origine de nombreux variants. Actuellement 9 déterminants HLA-B27 sont connus: B*2701, B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706, B*2707, B*2708, B*2709.

Initialement décrit à l'aide de clones T cytotoxiques allogéniques, les séquences en acides aminés de ces variants sont actuellement toutes connues

Ces sous-types diffèrent les uns des autres par un ou très peu d'acides aminés localisés dans les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule HLA de classe I. (Figure 9).

- *Le sous-type B*2705* est retrouvé dans toutes les populations. Il représente 90% des HLA-B27 dans la population caucasienne, 45% chez les Orientaux et est le sous-type prédominant dans la plupart des populations étudiées [LOPEZ DE CASTRO - 1989]. Tous les Indiens d'Amérique du Nord sont B*2705. L'hypothèse actuellement retenue est celle reconnaissant B*2705 comme l'ancêtre commun aux 9 sous-types identifiés.

- *Le sous-type B*2701* diffère de B*2705 par 3 substitutions d'acides aminés au niveau des résidus 74-77 et 81 du domaine $\alpha 1$. Ce variant HLA-B27 n'a été retrouvé que dans la population caucasienne où il est très rare [LOPEZ DE CASTRO - 1989].

- *Le sous-type B*2702* diffère de B*2705 par 3 substitutions d'acides aminés en position 77-80 et 81 du domaine $\alpha 1$ [MOSES - 1995]. Comme B*2701, il n'a été retrouvé que dans la population caucasienne avec une fréquence de 10% [LOPEZ DE CASTRO - 1989]. C'est l'allèle prédominant dans la population Juive.

- *Le sous-type B*2703* diffère de B*2705 par une mutation ponctuelle responsable de la substitution d'un acide aminé en position 59. Cet allèle n'a été retrouvé que dans les populations Négroïdes notamment d'Afrique de l'Ouest [HILL - 1991].

•Le sous-type B*2704 diffère de l'allèle B*2705 par 2 substitutions d'acides aminés en position 74 et 152. Ce variant n'a été retrouvé que dans la population Asiatique [LOPEZ-LARREA et coll. 1995].

•Le sous-type B*2706 diffère de B*2705 par 4 substitutions d'acides aminés en position 74-114-116 et 152. Comme B*2704, il n'a été retrouvé que chez les Orientaux [LOPEZ-LARREA et coll. 1995].

•Le sous-type B*2707 décrit par Choo et al. en 1991 n'a été retrouvé que dans une famille d'Indiens asiatiques et résulte probablement d'une recombinaison entre B*2705 et un autre allèle HLA-B. Il diffère de B*2705 par la substitution de 5 acides aminés en position 97-113-114-116 et 131.

•Le sous-type B*2708 a initialement été identifié sérologiquement comme un variant HLA-B7 : B7Qui. Il a été trouvé avec une fréquence de 0,087% au Pays de Galles. Le séquençage nucléotidique de cet allèle a mis en évidence une différence de 33 nucléotides avec B*0702 et de seulement 5 avec B*2705. Suite à ces travaux, ce variant a été officiellement désigné B*2708. Il diffère de la molécule B*2705 par substitution de 4 résidus acides aminés en position 77-80-82 et 83. Or, ces acides aminés participent à la détermination des épitopes publiques Bw4 et Bw6. Ainsi, tous les sous-types B27 sont Bw4 sauf le sous-type B*2708 qui est Bw6. Une hypothèse a été émise, suggérant que certaines spondylarthropathies HLA-B27 négatives et HLA-B7 positives sérologiquement, exprimaient peut-être l'allèle B*2708 [HILDEBRAND et coll. 1994].

•Le sous-type B*2709 récemment identifié [DEL PORTO et coll - 1994] est identique à l'allèle B*2705 sauf pour un acide aminé en position 116. Ce variant représente 3,3% des allèles B27 dans la population Italienne. Dans cette population, aucun des 37 patients étudiés présentant une spondylarthropathie, ne possède cet allèle [MAURO D'AMATO et coll.1994].

La microhétérogénéité de la spécificité HLA-B27 est donc localisée au niveau des résidus 59 à 152 des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule. La position de ces résidus acides aminés dans la détermination des différents sous-types est représentée sur la figure 10.

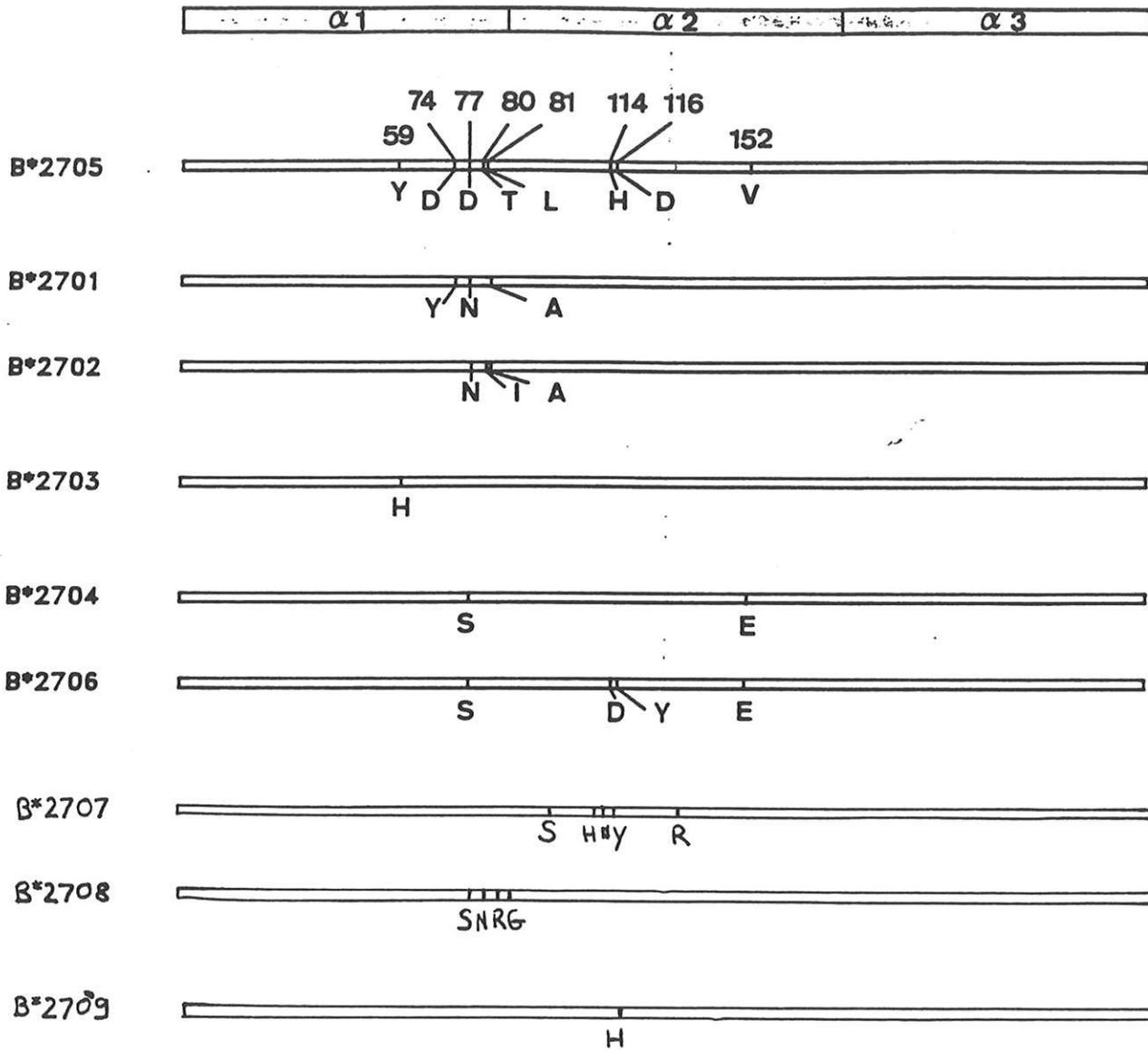


Figure 9

Localisation des substitutions d'acides aminés
pour les 9 sous-types HLA-B27



Figure 10

Localisation des résidus polymorphes pour les 9 sous-types HLA-B27

[FELTKAMP et coll.].

4-FONCTIONS DES MOLECULES HLA DE CLASSE I

Les antigènes du CMH sont essentiels aux phénomènes de reconnaissance immune, c'est à dire distinguer le soi du non-soi et éliminer ce dernier.

4.1-Sélection thymique du répertoire T

Parmi les cellules T ayant recombinié leurs gènes du TCR (récepteur des cellules T), seules sont sélectionnées dans le thymus celles dont le TCR interagit avec les régions polymorphiques des molécules du CMH exprimées sur les cellules épithéliales corticales. Il y a donc dans le thymus une sélection positive des cellules T capables de reconnaître les molécules HLA de classe I et de classe II appartenant au soi.

Ensuite, les TCR des cellules T sélectionnées capables de se combiner avec une forte affinité à des antigènes du soi présentés par les molécules du CMH de classe I sont éliminées par délétion clonale. C'est la sélection négative des clones T autoréactifs.

Ainsi, seulement 5% des cellules T thymiques échappent à cette double sélection positive puis négative. Les autres disparaissent par apoptose due à l'activation d'endonucléases provoquant la fragmentation de l'ADN.

Ce processus établit la tolérance T aux structures autologues, nécessaire au fonctionnement normal de la réponse immunitaire.

4.2-Présentation des peptides endogènes aux cellules T CD8 \oplus .

Les lymphocytes T CD8 \oplus reconnaissent un peptide endogène c'est à dire synthétisé par la cellule (Antigène du soi ou peptide viral) et présenté par les molécules HLA de classe I, alors que les lymphocytes T CD4 \oplus reconnaissent un peptide exogène présenté par une molécule HLA de classe II.

On appelle **restriction par le CMH** le processus par lequel les antigènes de classe I et de Classe II servent de système de guidage pour les lymphocytes T.

4.2.1-Le récepteur des cellules T : TCR

Les lymphocytes T possèdent un récepteur composé de deux chaînes polypeptidiques comportant des domaines variables codés par des gènes V et D et des domaines constants codés par des gènes J et C. La multitude de combinaisons possibles entre ces différents domaines est à l'origine de la diversité des TCR ($>10^7$) capables de reconnaître tous les antigènes existants.

4.2.2- Le peptide

Les molécules HLA de classe I s'assemblent dans le réticulum endoplasmique (RE) avec la $\beta 2$ microglobuline et un peptide endogène issu du cytosol de la cellule ou de protéines transloquées dans le RE. Un complexe enzymatique, le protéasome, a pour fonction de dégrader les protéines intracytoplasmiques. Ce complexe est formé de 16 sous unités protéiques et est codé par les gènes LMP₂ et LMP₇ localisés dans la région HLA de classe II. Les peptides cytosoliques issus de la dégradation protéique sont transportés vers le RE. Leur passage transmembranaire est assuré par des pompes dont les gènes TAP₁ et TAP₂ sont localisés dans la région HLA de classe II. En stabilisant les molécules HLA, ces peptides et la $\beta 2$ microglobuline permettent le transport et l'expression de la molécule HLA à la surface de la cellule. Cela s'applique aux peptides d'origine virale et aux peptides du soi.

Les cellules T reconnaissent par leur TCR à la fois les régions polymorphiques du CMH de classe I et les peptides antigéniques présentés dans la cavité formée par les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$.

Cette cavité n'est pas une structure lisse, mais elle possède différentes sous-régions formées de saillies et de poches avec lesquelles les résidus du peptide peuvent interagir. Des substitutions d'acides aminés au sein de la cavité modifient la position des poches. Ces bases structurales permettent de comprendre comment chaque molécule de classe I peut lier tel ou tel peptide avec une plus ou moins grande affinité.

Ainsi, la molécule HLA-B27 contient exclusivement des peptides sous forme nonamérique avec un acide aminé particulier : arginine en position 2. Cet acide aminé définit le point d'ancrage principal avec la molécule HLA. Le nonapeptide est fixé par ses deux extrémités aux côtés opposés de la cavité. Les chaînes latérales de certains acides aminés s'étendent dans les poches formées au sein de la région variable de la chaîne lourde de classe I

La capacité d'un peptide de se lier à une molécule particulière du CMH dépend de la nature des chaînes latérales de ce peptide et de leur complémentarité avec les poches de la cavité de la molécule HLA.

4.2.3- La molécule CD8

Les lymphocytes T matures sont porteurs soit de la molécule CD4, soit de la molécule CD8. La molécule CD8 est un dimère constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β . Lors de la reconnaissance du complexe peptide-molécule HLA par la cellule T, la molécule CD8 s'associe au domaine $\alpha 3$ de la chaîne lourde de classe I afin de stabiliser l'interaction TCR-peptide-CMH nécessaire au déclenchement des mécanismes effecteurs qui ont pour objectif d'éliminer la structure étrangère en lysant la cellule présentatrice.

4.3- La réponse allogénique au CMH

Le CMH induit une réponse immunitaire particulièrement intense lors d'un contact allogénique provoqué artificiellement, notamment lors de transfusion de produits sanguins ou de transplantation de tissu. La réponse T restreinte anti (CMH self + peptide étranger) et la réponse T allogénique anti (CMH allo +/- peptide) sont similaires. L'intensité de la réponse allogénique est due au nombre élevé de cibles moléculaires reconnues par les lymphocytes T sur les cellules allogéniques.

5- REGULATION DE L'EXPRESSION DES MOLECULES DE CLASSE I

Les molécules HLA de classe I A, B et C sont exprimées à la surface de la plupart des cellules nucléées de l'organisme. Les molécules HLA-G sont retrouvées sur la membrane des cellules trophoblastiques et au niveau de l'oeil. Les molécules HLA-E, F et H ne sont pas détectables à la membrane cellulaire bien que certains allèles de ces gènes semblent pouvoir être transcrits.

L'expression à la surface des molécules de classe I nécessite l'association de la chaîne lourde α à la $\beta 2$ microglobuline et au peptide. En l'absence de $\beta 2$ microglobuline, la chaîne lourde ne subit pas le mécanisme de maturation dans l'appareil de Golgi et est dégradée dans le cytoplasme.

Les mécanismes régulant l'expression des molécules du CMH sont importants pour la modulation de la réponse immunitaire. Plusieurs facteurs peuvent modifier l'expression des produits du CMH de classe I.

5.1- Les cytokines

- Les interférons (IFN) α , β et surtout γ induisent l'expression des molécules de classe I de façon importante (x 2 à 5 fois). L'interferon agit sur les séquences « enhancers » qui activent la transcription du gène.

- Le $\text{TNF}\alpha$ et β (Tumor Necrosis Factor) augmente l'expression des molécules de classe I en stimulant leur transcription dans diverses cellules tumorales humaines, dans les cellules endothéliales ou dans les fibroblastes. Il agit en synergie avec l'IFN γ en amplifiant la transcription des gènes HLA de classe I.

- Le GM-CSF (Granulocyte monocyte colony stimulating factor) augmente l'expression des molécules de classe I.

- L'interleukine 4 augmente l'expression des molécules de classe I.

5.2- Les virus

La plupart des virus augmentent l'expression des molécules de classe I sauf certains (adénovirus-2) qui en diminuent l'expression. Cet effet est dû à l'action de la glycoprotéine virale E3/19K qui peut s'associer à la chaîne lourde α et à la β 2 microglobuline. Cette association bloque le transport intracellulaire des molécules de classe I.

5.3- Les oncogènes

Une action directe d'oncogènes sur la transcription des gènes de classe I est responsable d'une diminution d'expression des molécules de classe I et de la progression tumorale.

III

ASSOCIATIONS

HLA-B27

ET MALADIES

1- GENERALITES

Les premiers travaux sur HLA et maladies ont été accomplis en 1967 par Kourilsky et Amiel et concernaient des maladies malignes. Toutefois, les relations entre les maladies malignes et HLA sont parmi les moins spectaculaires. La recherche d'une relation à un allotype HLA de certaines maladies présente un intérêt diagnostique et surtout physiopathologique.

Les maladies en relation avec le système HLA sont de 2 types:

D'une part, les modifications ou pertes d'expression des molécules HLA qui concernent:

- les cancers où l'expression des molécules HLA est diminuée.
- les pathologies auto-immunes où l'expression des molécules HLA est augmentée.
- les anomalies congénitales avec absence de molécules HLA de classe I et/ou de classe II.

D'autre part, les maladies pour lesquelles il existe une relation avec la fréquence d'un allèle HLA. Cette relation peut-être soit une liaison, soit une association.

Les liaisons ou « linkage », sont dues à la proximité entre les loci HLA et le locus portant le gène directement responsable de la maladie. Du fait de la transmission haplotypique du CMH, le gène responsable est transmis avec le gène HLA.

Les maladies liées au HLA sont:

- les perturbations métaboliques telles que l'hémochromatose idiopathique et l'hyperplasie congénitale des glandes surrénales par déficit en 21 hydroxylase.
- les déficit immunitaires congénitaux touchant les Ig A et les fractions C2 et C4 du complément.

Les associations entre un marqueur HLA et une maladie déterminée concernent surtout les maladies de type auto-immun, les phénomènes d'hypersensibilité et certaines maladies pour lesquelles on ne dispose pas de renseignements

immunopathologiques telles que la narcolepsie et la rétinopathie de birdshot.

La probabilité que l'association soit due au hasard est calculée en tenant compte de la fréquence de l'allèle dans une population de référence de même groupe ethnique. Ainsi, la valeur du χ^2 et la valeur correspondante de p permettent de définir si l'association est due au hasard. Dans le cadre des allèles HLA, le polymorphisme peut être source de fausses associations si on se limite au seuil de significativité de $p=0,05$. Ainsi, on utilise une valeur de p corrigée c'est à dire multipliée par le nombre de comparaisons effectuées.

Le risque relatif (RR) mesure l'intensité de l'association de la maladie au marqueur HLA. Il représente le risque qu'un sujet porteur du marqueur a de développer la maladie par rapport à un sujet non porteur.

$$RR = \frac{\text{sujets malades présentant l'Ag HLA} \times \text{sujets normaux ne présentant pas l'Ag HLA}}{\text{sujets malades ne présentant pas l'Ag HLA} \times \text{sujets normaux présentant l'Ag HLA}}$$

Lorsque le RR est inférieur à 1, le marqueur HLA est protecteur, alors que lorsque le RR est supérieur à 1, le risque de développer la maladie est accru.

Les principales pathologies associées à HLA et leur RR sont reportées dans le tableau 1 [COLOMBANI,1993].

Les associations impliquant directement un ou plusieurs haplotypes HLA de classe I ou de classe II relèvent de mécanismes immunopathologiques. Ainsi, en raison de sa fonction de présentation des peptides au TCR lors de la constitution du répertoire T puis lors de la réponse immunitaire, le CMH peut être responsable d'auto-immunité T vis à vis du complexe CMH-self + peptide-self.

L'autoimmunité T est liée à l'émergence de clones T autoréactifs. Ces clones peuvent proliférer s'il y a rupture de l'un des mécanismes de tolérance naturelle au soi. Ces mécanismes sont la délétion clonale,

l'anergie clonale, la suppression par des cellules T suppressives (Ts) des clones autoreactifs, ou l'innocuité des clones autoreactifs en raison de leur faible nombre ou de l'absence de stimulation par les complexes CMH-peptides. Dans ce dernier cas, un stimulus exogène (bactérien ou viral) peut être responsable de la rupture de tolérance avec stimulation de clones autoreactifs.

Le stimulus exogène agit par mimétisme moléculaire entre le peptide microbien et le peptide autologue; les clones ainsi stimulés reconnaissent le complexe CMH-peptide self par réaction croisée avec le complexe CMH-peptide microbien. Puis, l'expansion du clone T déborde les autres mécanismes de contrôle (anergie, cellulesTs).

Pour que le stimulus exogène puisse induire une réponse, les molécules du CMH doivent être capable de présenter le peptide. Il existe une spécificité allotypique pour certains peptides, ceci rendant compte de l'association de la pathologie à un allotype particulier. De plus les tissus cibles de l'auto-aggression sont ceux qui synthétisent la protéine dont est dérivé le peptide. Ce modèle de rupture de la tolérance au soi peut contribuer à expliquer l'association entre HLA-B27 et la SPA.

Pathologie	HLA	RR
Spondylarthrite ankylosante	B 2 7	88
Syndrome de Reiter	B27	37
Arthrite réactionnelle	B27	38
Uvéite antérieure	B27	10
Diabète insulino-dépendant	DR3 DR4 DR3,DQ201/DR4,DQ302 # DQB Asp57-/- # DR15,DQ6	3 6 47 107 0,2
Lupus érythémateux disséminé	DR3,C4AQ0	6
Syndrome de Sjögren	DR3	10
Thyroïdite d'Hashimoto	DR3	3
Maladie de Basedow	DR3	4
Maladie d'Addison	DR3	6
Dermatomyosite	DR3	4
Cirrhose biliaire primitive	DR3	8
Hépatite chronique active	DR3	2
Glomérulonéphrite extra-membranaire	DR3	12
Syndrome de Guillain-Barré, forme chronique	DR3	5
Dermatite herpétiforme	DR3	15
Myasthénie	DR3	3
Néphropathie aux sels d'or	DR3	5
Syndrome néphrotique de l'enfant, corticorésistant	DR3	3
Syndrome néphrotique de l'enfant, corticosensible	DR7	7
Arthrite rhumatoïde	DR401,Dw4 DR404,Dw14	6-10 5-14
Arthrite rhumatoïde juvénile séropositive	DR401/DR404 #	36
Maladie cœliaque	DR3 DR7 DQ2(β 201, α 501)	11 5 60
Pemphigus vulgaris	DR6,DQ503 DR402	> 20 > 20
Syndrome de Goodpasture	DR2	16
Sclérose en plaques	DR2	4
Névrite optique	DR2	2
Maladie de Berger	DR4	4
Psoriasis	Cw6	13
Maladie de Behcet	B51	6
Thyroïdite de Quervain	B35	14
Narcolepsie	DR2(15)	135
Rétinopathie <i>birdshot</i>	A29	100
Déficit de 21-OH, classique précoce	B47*	16
Déficit de 21-OH, forme tardive	B14*	40
Hémochromatose idiopathique	A3*	8

TABLEAU 1
PRINCIPALES MALADIES ASSOCIÉES AU HLA [COLOMBANI, 1993].

2- LES MALADIES ASSOCIEES A HLA B 27

2.1- La spondylarthrite ankylosante (SPA)

La SPA est classiquement considérée comme une maladie relativement rare, touchant 1/1000 des caucasoïdes. C'est une maladie inflammatoire avec atteinte préférentielle des articulations vertébrales et du pelvis, plus fréquente chez l'homme. Après de nombreuses poussées évolutives entrecoupées de phases de rémission, une fusion des articulations vertébrales se produit et le résultat est la classique "colonne bambou". La SPA peut se compliquer de manifestations systémiques telles que uvéite antérieure aiguë ou valvulopathie aortique.

En 1973, Brewerton et Scholstein découvrent l'intense association entre l'allotype HLA-B27 et la spondylarthrite ankylosante. Cette association a été confirmée dans diverses populations. Ainsi chez les caucasiens 90% des sujets présentant une SPA sont HLA-B27 contre 6% chez les témoins.

Chez les non caucasiens, la relation entre HLA-B27 et la SPA a été retrouvée mais la fréquence de l'association est variable et en général moins intense que chez les caucasiens. (tableau 2).

<i>Auteurs</i>	<i>Populations</i>	<i>Années</i>	<i>Nombre SPA</i>	<i>Fréq. B27 SPA</i>	<i>Fréq. B27 Témoins</i>
ENQUÊTES CHEZ LES NOIRS					
Khan Ruderman	États-Unis	1976	33	48 %	2 %
	États-Unis	1977	18	50 %	2 %
ENQUÊTES CHEZ LES JAUNES					
Somosaki Shirakura Chan	Japon	1975	27	67 %	0,03 %
	Japon	1976	36	92 %	2 %
	Chine	1982	69	88 %	7 %
ENQUÊTES CHEZ LES AMÉRINDIENS					
Gofton Calin	Haïda Bella Coola Pima	1975	17	100 %	50 %
			3	100 %	26 %
		1977	16 ♂	50 %	18 %
			22 ♀	9 %	18 %

Tableau 2

HLA-B27 et SPA chez les non caucasoïdes [SEIGNALET].

Dans toute les populations étudiées on retrouve un parallélisme entre la fréquence de HLA-B27 et la fréquence de la SPA. Ainsi chez les Australiens et les noirs africains, HLA-B27 est presque absent et la SPA est exceptionnelle. Chez les Japonais, HLA-B27 n'atteint pas 1% et la SPA est très rare ainsi que chez les noirs-américains où la fréquence de HLA-B27 est de 2%. Dans les tribus d'Amérindiens, HLA-B27 dépasse les 20% et les SPA sont particulièrement nombreuses.

Tous les sujets atteints de SPA ne sont pas HLA-B27. Les deux variétés de SPA paraissent semblables, exceptés l'âge moyen de survenu qui est plus précoce, les complications oculaires du type uvéite antérieure aiguë et l'existence de formes familiales [MOLLER et coll. 1984] qui concernent essentiellement les formes HLA-B27 positives.

Le phénotypage HLA-B27 apporte une aide majeure au diagnostic de SPA notamment dans les formes débutantes limitées à des dorsalgies ou des talalgies, les formes atypiques prenant l'aspect d'une polyarthrite rhumatoïde séro-négative, les formes féminines bien que certains auteurs [JEANNET et coll, 1975; HILL et coll, 1976] ont trouvé une relation aussi fréquente chez les femmes que chez les hommes, les formes avec troubles du rythme cardiaque et les formes frustes.

De plus, la recherche de HLA-B27 dans une SPA est importante pour établir le pronostic et le dépistage. Ainsi la présence de HLA-B27 doit inciter à une surveillance ophtalmologique et conduire à une enquête familiale afin de dépister des formes précoces de SPA.

2.2- Autre maladies associées à HLA-B27.

2.2.1- Uvéite antérieure aiguë (UAA)

La SPA et l'UAA sont deux maladies souvent intriquées. Selon Feltkamp, 25% des sujets atteints de SPA développeront une UAA et 20% des UAA auront une SPA.

L'association entre l'UAA et l'allotype HLA-B27 a été mise en évidence par Brewerton en 1973 avec une fréquence de 55% et un risque relatif de 19,1. Il existe deux catégories d'UAA :

- L'UAA HLA-B27 +: elle touche les hommes dans 80% des cas. L'uvéite est souvent aiguë mais de bon pronostic. Par contre, 80% présentent des signes radiologiques de sacro-iliite évoluant souvent vers une SPA confirmée.
- L'UAA HLA-B27 -: elle touche les femmes dans 66% des cas. Le pronostic oculaire est plus réservé en raison de la tendance à la chronicité de l'uvéite. Seulement 4% présentent des signes radiologiques de sacro-iliite.

Ainsi, le phénotypage HLA-B27 permet dans le cas présent de classer les UAA et ainsi de prévoir la surveillance de celles risquant de développer une SPA afin de diagnostiquer et de traiter précocement ce rhumatisme.

2.2.2- Les arthrites réactionnelles

a- Le syndrome de Fiessinger Leroy Reiter (FLR)

Au decours d'une infection intestinale ou uréthrale, surviennent une conjonctivite et une arthrite, incluant souvent une sacro-iliite pour former le classique syndrome uréthro-conjonctivo-synovial.

L'agent déclenchant est dans plus de la moitié des cas Chlamydia trachomatis.

Chez les caucasiens, l'association du FLR avec HLA-B27 est retrouvée dans 79% des cas contre 6% chez les témoins [BREWERTON et coll.,1973]. La présence d'HLA-B27 doit faire craindre une évolution vers la SPA qui demeure cependant rare.

b- Les autres arthrites réactionnelles(AR).

Les AR sont des arthrites inflammatoires, aseptiques, secondaires à une infection non articulaire, souvent intestinale ou uréthrale. Elles évoluent le plus souvent vers la guérison sans séquelles, rarement vers la transformation en SPA [SANY et coll.1982, AMOR et coll.1984].

Les arthrites réactionnelles sont induites par de nombreux germes, l'agent causal restant inconnu dans certains cas. Dans les populations caucasoïdes, 71% des AR à Yersinia, Salmonella, Campylobacter, Shigella, Chlamydia sont HLA-B27 [AHO et coll. 1973]. Le RR est de 38. Le phénotype HLA-B27 confère à ces arthrites un risque plus fort d'évolution vers la SPA. Cependant, la relation entre HLA-B27 et l'arthrite réactionnelle à gonocoque reste discutée [AHO et coll.1973, WAGNER et coll.1975]. Les AR à méningocoque, streptocoque, *Bucella abortus* et *Mycoplasma pneumoniae* sont indépendantes de HLA.

2.2.3- Les pelvispondylites secondaires aux inflammations intestinales chroniques

La rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn n'ont aucune relation avec HLA-B27 dans leurs formes habituelles. Toutefois, les SPA qui compliquent parfois ces inflammations intestinales chroniques s'accompagnent d'une nette augmentation de HLA-B27 [BREWERTON et coll 1974, MORRIS et coll.1974]. En moyenne chez les caucasoïdes, 77% des SPA compliquant une RCH ou une maladie de Crohn sont HLA-B27. En contre partie, HLA-B27 n'est pas corrélé au arthrites périphériques compliquant ces inflammations intestinales [MORRIS et coll.1974].

2.2.4- Les autres rhumatismes apparentés à la SPA.

Une franche élévation de HLA-B27 à été observée dans les arthropathies du psoriasis pustuleux [KAROVEN et coll.1975, KOUSA et coll.1976], dans la dactylie [DE CEULAER et coll.1976] et dans l'hyperostose avec atteinte manubrio-sternale et sacro-iliite unilatérale [BERANECK et coll.1984].

2.3- Physiopathologie

L'intense association entre HLA-B27 et la SPA est connue depuis 1973. Cependant, seulement une faible proportion des sujets HLA-B27 développent une SPA. Ceci implique que la présence de HLA-B27 est dans la majorité des cas nécessaire mais non suffisante pour engendrer une SPA. C'est une maladie

polyfactorielle nécessitant la conjonction de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux.

2.3.1- Les modèles animaux

Des rats porteurs des transgènes B*2705 et β_2 microglobuline humains développent une maladie inflammatoire affectant le tube digestif, les articulations vertébrales et périphériques, l'appareil génital mâle, la peau, les phanères et le cœur. La croissance de ces animaux dans un environnement stérile évite l'inflammation intestinale et articulaire. [HAMMER et coll. 1990]. Une expérience similaire sur des souris transgéniques pour les gènes B*2702 et β_2 microglobuline humains, montre que les souris élevées dans un environnement bactérien développent une spondylarthropathie, alors que celles élevées dans des conditions stériles ne sont pas malades. De plus, si le gène β_2 microglobuline humain n'est pas transféré, les souris ne développent pas la maladie [WEINREICH et coll. 1995].

Ces expériences démontrent la nécessité de l'expression de la molécule HLA-B27 à la surface des cellules ainsi que la nécessité d'un environnement bactérien.

D'autre part, la quantité des molécules HLA-B27 à la surface des cellules est importante pour le développement d'une maladie inflammatoire [TAUROG, 1993].

2.3.2- Rôle structural de la molécule HLA-B27

La SPA semble associée de façon équivalente à chacun des sous-types HLA-B27 excepté les sous-types B*2703-06-09. Cependant, Taurog et coll ont rapporté quelque cas de maladies associées à HLA-B*2703 et B*2706. Le polymorphisme HLA-B27 et l'association de la SPA à la majorité des sous-types suggère que la susceptibilité est en relation avec une séquence conservée plutôt qu'une séquence variable de la molécule HLA-B27.

L'étude des séquence d'acides aminés des molécules HLA de classe I révèle que l'allèle HLA-B27 présente une identité avec de nombreuses molécules

HLA-B sauf dans la région de la fente présentant le peptide. Ceci laisse supposer le rôle important de la fonction de présentation de peptides dans le processus physiopathologique. Cependant, le polymorphisme HLA-B27 de chaque sous-type est localisé essentiellement dans cette fente. Néanmoins, Benjamin et Parham (1990) ont montré qu'il existait un motif de six résidus (His-9, Glu-45, Cys-67, Lys-70, Ala-71, Gln-97) unique à HLA-B27 et conservé dans tous les sous-type HLA-B27 (figure 11).

	Positions in sequence shared by HLA-B27 subtypes						Residues shared with HLA-B27
	9	45	67	70	71	97	
B*27 01-06	H	E	C	K	A	N	
B14,Bw65	Y	E	C	N	T	W	2/6
B8	D	E	F	N	T	S	1/6
B7,Bw42	Y	E	Y	Q	A	S	2/6
Bw58	Y	T	M	S	A	R	1/6
Bw57	Y	M	M	S	A	V	1/6
B37	H	T	S	N	T	R	1/6
B49,Bw41,Bw60	H	K	S	N	T	R	1/6
B18	H	T	S	N	T	R	1/6
B51	Y	T	F	N	T	T	0/6
B44,Bw47	Y	K	S	N	T	R	0/6
B13.2	Y	M	S	N	T	T	0/6
Bw62,B13.1	Y	M	S	N	T	R	0/6
Bw46	Y	M	Y	Q	A	R	0/6
HLA-A ^a (25 sequences)	Y F T S	M	V M	Q H	S	R I M	all 0/6
HLA-C ^a (17 sequences)	Y F C D S	G	Y	Q	A	R W	all 1/6
HLA-E	H	M	A	T	A	W	2/6
HLA-F	S	M	A	N	A	G	1/6
HLA-G	S	M	T	H	A	W	1/6

Figure 11

Résidus conservés dans les sous-types HLA-B27 [BENJAMIN et PARHAM. 1990]

Ces résidus sont spatialement très proche les uns des autres et localisés à proximité de la poche B, décrite par Garret et coll (1989) dans les molécules HLA-A2 et A68. Les résidus formant cette poche B dans la molécule HLA-B27, (Glu-45, Cys-67, Val-34, Gly-26, Thr-24), sont conservé pour tous les sous-types HLA-B27 associés à la SPA, et leur combinaison est propre à HLA-B27. Ainsi, tous les sous-types HLA-B27 possèdent le même motif structural leur permettant de présenter un peptide propre.

En 1988, Taurog, et El Zaatari ont remarqué que le résidus Cys-67 de la molécule HLA-B27 avait la possibilité de former un pont dissulfure avec un groupement thiol présent sur un fragment peptidique à l'intérieur de la fente. Des expériences de mutagenèse ont montré que le changement de cet acide aminé pouvait entraîner des modifications conformationnelles majeures sur la fente et interférer avec la capacité à présenter certains peptides antigénique. Si le groupement thiol est contenu dans un peptide dérivé du tissu synovial et si les conditions de pH nécessaires à la formation du pont dissulfure existent seulement dans certaines articulations, alors ce modèle est capable d'expliquer la spécificité tissulaire rencontrée dans la SPA.

2.3.3- Infections bactériennes et hypothèse du mimétisme moléculaire

L'association des arthrites réactionnelles aiguës avec les infections intestinales ou génito-urinaires ont incité à de multiples études pour rechercher une association similaire dans la SPA.

En 1976, Ebringer décrit une réaction croisée entre la molécule HLA-B27 et certains antigènes de Klebsiella. Cette réaction contre le soi pourrait causer des dégâts tissulaires à l'origine des manifestations cliniques. Une comparaison des séquences protéiques a permis l'identification d'une région de même séquence commune à la molécule HLA-B27 et à une protéine de Klebsiella, Salmonella, Yersinia et Shigella [SCHWIMMBECK et coll, 1987]. Cette région impliquée dans la réaction croisée est localisée dans l'hélice $\alpha 1$ de la molécule HLA-B27 entre les résidus 61 et 84.

D'autre part, un taux d'immunoglobulines (Ig) de type A anti-Klebsiella très augmenté à été observé dans le sérum de patients présentant une SPA active. De même, les sujets sains HLA-B27 positifs, ont un taux plus élevé d'IgA anti- Klebsiella que les individus sains HLA-B27 négatif. Ebringer considère ces sujets HLA-B27 positif comme porteurs d'une pré-SPA et propose que la SPA soit considérée comme une arthrite réactionnelle induite par Klebsiella.

Ce mécanisme du mimétisme moléculaire induit par une réponse immune anti-bactérienne ne peut être à lui seul responsable de la pathogénie. En effet il ne peut expliquer la spécificité tissulaire de la SPA, les molécules HLA de classe I étant exprimées sur la quasi totalité des cellules de l'organisme.

2.3.4- Hypothèse du facteur modifiant HLA-B27

En 1979, Geczy et coll débutent des expériences qui révéleront une modification de HLA-B27 sur les lymphocytes des sujets atteint de SPA.

Ainsi, les cellules HLA-B27 positives de SPA, mais pas celles de sujets normaux, exposent un déterminant à leur surface qui croise avec un déterminant exprimé par certaines bactéries entériques [SULLIVAN et coll. 1988]. Ces auteurs expliquent l'absence de pathologie chez la plupart des sujets HLA-B27 par le fait qu'il existe une différence dans les molécules B27 exprimées. Au cours des études initiales ils trouvèrent qu'un anti-serum réagissait contre des lignées de Klebsiella de façon différente selon qu'il provenait de sujets HLA-B27 avec ou sans SPA. De plus, les cellules B27 des patients sans SPA pouvaient être converties en phénotype SPA par l'incubation en présence de filtrat de culture de Klebsiella contenant le facteur modifiant. Lorsque ces études furent étendues à la reconnaissance par les CTL, ils montrèrent que les cellules du sang périphérique des sujets HLA-B27 avec SPA stimulaient l'induction de CTL spécifiques chez un sujet HLA identique. Ces CTL lysaient les cellules des patients HLA-B27 avec SPA, mais pas celles des sujets HLA-B27 sans SPA.

Geczy et coll supposèrent que les Klebsiella sécrétaient un facteur modifiant qui se liait à HLA-B27 et proposèrent l'hypothèse que les cellules humaines pouvaient acquérir le gène bactérien codant ce facteur de manière à

exprimer les molécules HLA-B27 modifiées. Ces découvertes sont controversées depuis que d'autres équipes ont été incapable de les reproduire. De plus, ce facteur modifiant ne permet pas d'expliquer pourquoi dans la SPA les articulations sacro-iliaques sont affectées.

2.3.5- Théorie du peptide arthritogénique

Selon cette théorie, la maladie serait le résultat d'une réponse médiée par les cellules T auto-réactives contre un peptide trouvé seulement dans les tissus articulaires et pouvant être spécifiquement lié et présenté par tous les sous-types HLA-B27. Cependant, dans des conditions normales, le peptide est présenté à un taux trop faible pour être reconnu par les cellules T. L'émergence de clones T auto-réactifs pourrait résulter d'une infection bactérienne à *Klebsiella*, *Yersinia* ou *Shigella*, souvent retrouvée dans les antécédents des patients. Ces bactéries possèdent une protéine ayant un motif séquentiel similaire au peptide arthritogénique [OLDSTONE, 1987]. L'infection bactérienne sensibiliserait des cellules T qui pourraient alors détecter un faible taux de peptides arthritogéniques et initier une réponse contre le soi. Celle-ci serait amplifiée par les peptides relargués lors des lésions tissulaires.

Dans cette hypothèse, le peptide arthritogénique est l'équivalent du facteur modifiant de Geczy et coll. De plus, cette théorie laisse place à plusieurs explications possible pour l'absence de pathologie chez la quasi totalité des sujets HLA-B27. Ainsi, une mutation ponctuelle sur un acide aminé du peptide peut suffire à détruire l'affinité de la molécule HLA pour ce peptide. D'autre part, si une infection bactérienne est l'événement initiateur de la SPA, l'absence d'une telle infection peut prévenir la maladie. De plus, lors de l'induction de la tolérance au soi, le peptide arthritogénique peut atteindre des concentrations thymique convenable chez la plupart des individus et la délétion clonale des cellules T auto-réactives peut ainsi prévenir la défaillance de la tolérance au soi. La confirmation du modèle du peptide arthritogénique serait apportée par l'élution et l'identification du peptide à partir de molécules HLA-B27 présentent au niveau

des lésions, ainsi que l'isolement des clones T spécifiques du complexe B27-peptide.

C'est pourquoi, de nombreuses recherches, ont été consacrées au peptide présenté dans la fente de la molécule HLA-B27. Cette fente possède six poches (A à F) à l'intérieur desquelles les chaînes latérales du peptide sont accrochées. Ainsi, il a été démontré que le résidu Glu-45 de la poche B se liait avec un Arginine en position 2 du peptide [JARDETZKY et coll. 1991]. Les molécules HLA-B27 dont le résidu 45 a été modifié ne lient plus Arg-2 mais Gln-2.

Cependant, la poche B n'est pas la seule responsable de la liaison d'un peptide particulier. En effet, l'allèle HLA-B73 possède la même poche B que HLA-B27 et il lie aussi Arg-2. Mais, les différences sur les autres régions de la molécule (notamment au niveau de la poche F) lui confère une spécificité peptidique différente [FELTKAMP et coll. 1996].

De même, B*2703 diffère de B*2705 au niveau du résidu Tyr-59, lequel est impliqué dans la liaison de l'extrémité N-terminale du peptide. Du fait de cette mutation, ce sous-type présente des peptides différents de ceux présenté par B*2705. Ceci pourrait expliquer la rareté de l'association de ce sous-type à la SPA [HILL et coll. 1991].

L'allèle B*2709 décrit récemment, diffère de B*2705 par substitution d'un acide aminé en position 116 [DEL PORTO et coll. 1994]. Cet acide aminé prend part à la constitution de la poche F et est déterminant pour la liaison avec l'extrémité C-terminale du nonapeptide présenté [ELLIOT et coll. 1993]. Ainsi, B*2709 accepte difficilement les nonapeptides avec un Arginine ou un Tyrosine en position 9, tandis que B*2705 se lie avec une grande affinité à ces mêmes peptides [FIORILLO et coll. 1995]. Si l'absence d'association du sous-type B*2709 avec la SPA se confirme, l'hypothèse physiopathologique du peptide arthritogénique serait alors renforcée.

2.3.6- Autres facteurs génétiques

La prévalence de la SPA chez les sujets HLA-B27 est de 2% mais cette prévalence atteint 20% chez les parents au premier degré d'un sujet HLA-B27 atteint de SPA [GILLILAND, 1987]. Une étude réalisée chez des jumeaux par Jarvinen [1995] révèle que le taux de concordance entre les deux jumeaux est de 50% chez les jumeaux HLA-B27 monozygotes et seulement de 20% chez les jumeaux HLA-B27 dizygotes. Ces données laissent supposer que des facteurs génétiques autres que B27 doivent aussi jouer un rôle pathologique. Des associations entre la SPA et d'autres antigènes HLA tels que Cw1, Cw2 et A2 ont été rapporté, mais elles ne sont le fait que d'un déséquilibre de liaison entre le gène HLA-B27 et ces gènes. En revanche, Islam a observé une association à HLA-DR8 en plus de celle à HLA-B27 parmi les patients Japonais présentant à la fois une SPA et une UAA. De même, Leirislo- Repo trouve que les arthrites induites par Salmonella sont associées avec HLA-DR8 en Finlande. Des études récentes montrent que l'hétérozygotie B-27/ B-60 augmente le risque de développer une SPA bien que cela ne soit pas observé dans toutes les populations examinées [FELTKAMP et coll. 1996].

Les différents allotypes du transporteur peptidique associé au processing de l'antigène (TAP) ainsi que du protéasome sont également distribués chez les patients et chez les témoins. Ainsi, le polymorphisme des gènes TAP et du protéasome ne semblent pas impliqués dans la physiopathologie de la SPA. Les études de Pløegh et Taurog chez des animaux transgéniques le confirment.

2.3.7- Conclusions

Le mécanisme physiopathologique expliquant l'association entre HLA-B27 et la SPA n'est toujours pas entièrement élucidé. Il reste le sujet de nombreuses recherches car sa compréhension pourrait avoir des applications pratiques quant à la mise en place d'un traitement préventif.

IV

TECHNIQUES DE TYPAGE HLA DE CLASSE I

L'identification des allèles HLA peut être réalisée par une reconnaissance de l'antigène HLA, par une méthode biochimique ou par une étude du polymorphisme au niveau des gènes.

1- IDENTIFICATION DE L'ANTIGÈNE HLA

1.1- TECHNIQUES SEROLOGIQUES

La serologie a été la base de la définition du système HLA.

1.1.1- Lymphocytotoxicité [TERASAKI ET MC CLELLAND, 1964].

La lymphocytotoxicité dépendante du complément est actuellement la technique la plus utilisée pour le groupage HLA de classe I et est considérée comme la technique de référence.

Le principe de cette méthode repose sur la capacité d'un anticorps à reconnaître un déterminant antigénique à la membrane d'une cellule cible. La réaction antigène-anticorps va activer le complément qui va conduire à la lyse de la cellule cible.

La recherche d'un antigène HLA se fait sur des lymphocytes du sang périphérique isolés sur un gradient de Ficoll. Le sang prélevé sur anticoagulant (Héparine) est déposé sur une phase de Ficoll de densité 1,077. Après centrifugation, les globules rouges et les polynucléaires neutrophiles se situent au dessous du Ficoll alors que les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes se situent à l'interface Ficoll-plasma.

Dans un premier temps, la suspension lymphocytaire est incubée en présence d'un immun-sérum. Dans un second temps, on ajoute le complément de Lapin qui va agir pendant 60 minutes. Enfin, est ajouté un colorant vital (bleu trypan, eosine ou acridine orange) qui va pénétrer dans les cellules mortes mais pas dans les cellules

acridine orange) qui va pénétrer dans les cellules mortes mais pas dans les cellules vivantes. La lecture de la lyse se fait à l'aide d'un microscope inversé. On évalue la proportion de cellules mortes par rapport aux cellules vivantes.

Le résultat est donné selon des normes internationales:

- <10% de cellules mortes=1
- 10 à 20% de cellules mortes=2
- 20 à 50% de cellules mortes=4
- 50 à 75% de cellules mortes=6
- >75% de cellules mortes=8

Un résultat inférieur ou égal à 2 est négatif.

Un résultat supérieur ou égal à 6 est positif.

Les réactions intermédiaires sont douteuses.

Les inconvénients de cette technique sont:

- L'utilisation du complément de lapin qui peut être la source de faux négatifs.
- La nécessité d'utiliser des cellules viables;
- L'utilisation d'anticorps

La difficulté principale est d'obtenir des serum contre toutes les spécificités. Pour les allèles rares, on effectue des échanges entre laboratoires. Le développement de la production des anticorps monoclonaux par des souris immunisées avec des cellules humaines ou des molécules HLA purifiées pourra résoudre ces difficultés.

- Technique longue et délicate.

Les avantages de cette technique sont:

- Sa sensibilité
- Sa reproductibilité.
- La conservation possible des lymphocytes par congélation dans de l'azote liquide.
- La validation du test par la visualisation des cellules.

1.1.2- Cytométrie en flux

L'utilisation de la cytométrie en flux pour la détermination de l'Ag HLA-B27 a été décrite en 1987 par Albrecht et coll.. Depuis, elle est utilisée pour le dépistage des patients HLA-B27 dans environ 20% des laboratoires HLA.

a- principe

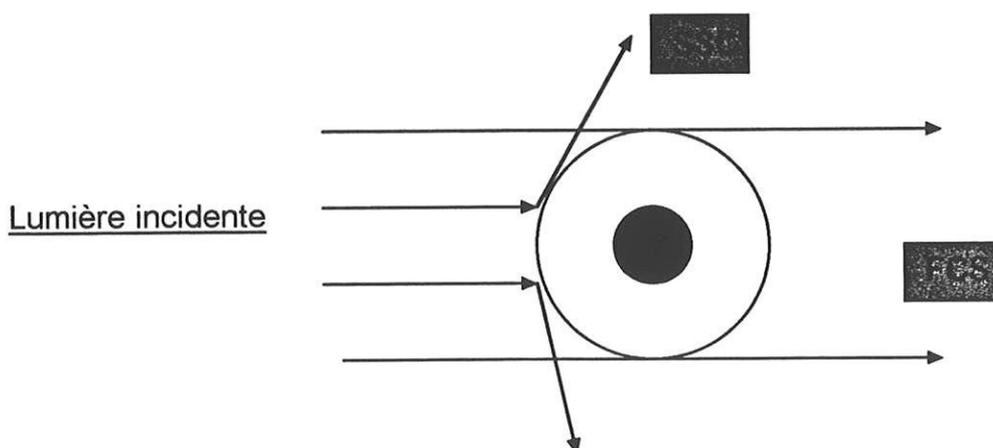
La CMF est une technique d'analyse cellulaire, basée sur l'examen dans une veine liquide de diverses cellules. L'échantillon à analyser progresse à l'intérieur de cette veine liquide et les cellules sont contraintes à passer devant une source lumineuse. Après interception de la lumière incidente, la cellule émet un certain nombre de signaux:

- Diffraction de la lumière sous un petit angle ($<15^\circ$) (FSC=FAS=Forward Angle Scatter).

L'intensité de la lumière diffractée peut être corrélée à la taille et la viabilité cellulaire puisque les cellules mortes diffusent moins de lumière dans cette direction.

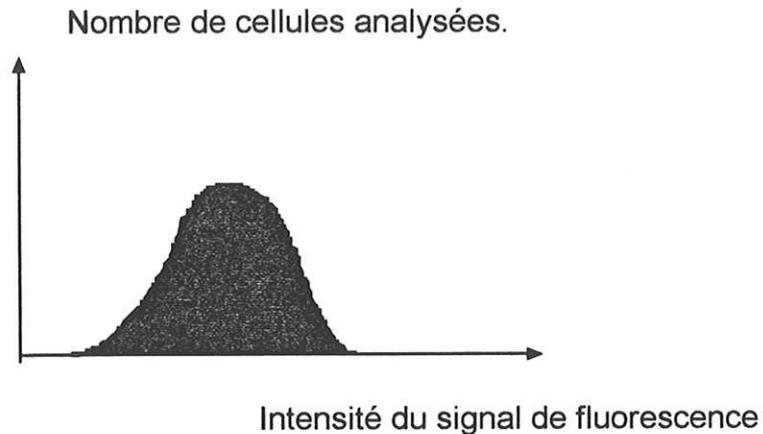
- Diffraction de la lumière sous un angle droit (SSC=RAS=Right Angle Scatter).

L'intensité de la lumière diffractée sous un grand angle dépend de la réfringence du cytoplasme, de la morphologie de la cellule et du rapport nucléocytoplasmique.



- Le signal de fluorescence est spontanée (autofluorescence des cellules), ou secondaire à l'excitation de fluorochrome ayant une affinité pour un constituant cellulaire (étude de l'ADN, de l'ARN, des protéines).

L'utilisation de fluorochromes couplés à un anticorps monoclonal permet l'étude des antigènes cellulaires.



b- Appareil

La source lumineuse est un laser (Light Amplification by Stimulated Emission Radiation) , composé d'un tube contenant quelques molécules de gaz (Argon). Les électrons périphériques des molécules de gaz sont excités sous l'effet du courant, puis lorsque l'électron revient à son niveau fondamental, un photon est émis.

Les lasers permettent une excitation à une longueur d'onde donnée et la finesse du faisceau concentre la lumière sur une surface proche de la section d'une cellule.

Les lasers à Argon émettent à une longueur d'onde de 438 et 514 nm et par conséquent excitent entre autre la fluorescéine, la phycoérythrine, le bromure d'ethidium.

Lors de l'éclairement de la cellule par le faisceaux lumineux, chaque cellule émet des signaux optiques (lumière diffusée, fluorescence). Ces différents signaux

doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers le système de détection: photomultiplicateurs (PMT).

Pour cela, ils sont sélectionnés par différents circuits optiques composés d'une alternance de miroirs dichroïques (les longueurs d'ondes non réfléchies sont transmises) et de filtres interférentiels qui détruisent les longueurs d'ondes non transmises.

La lumière est acheminée par l'intermédiaire d'une fibre optique puis captée par un photomultiplicateur qui transforme les signaux lumineux en signaux électriques.

Les résultats:

Les photomultiplicateurs sont reliés à un système informatique qui permet l'analyse des signaux et leur présentation graphique.

L'analyse d'un signal unique est effectuée sur un histogramme qui donne la distribution du nombre de cellules étudiées (ordonnées) en fonction de l'intensité du signal (abscisse).

L'analyse simultanée de deux paramètres se fait sur un graphe biparamétrique où chaque cellule est représentée par un point dont l'abscisse est proportionnelle à l'intensité d'un paramètre et l'ordonnée à l'intensité d'un autre. Par exemple, le cytogramme d'analyse des signaux de lumière diffusée par les leucocytes du sang périphérique permet de sélectionner une population cellulaire.

c- Phénotypage HLA-B27.

L'analyse en CMF de l'Ag HLA-B27 se fait sur sang total prélevé sur héparine, citrate ou EDTA. Les globules rouges sont éliminés par choc hypotonique puis les leucocytes sont incubés en présence d'un anticorps monoclonal anti B27 marqué par un fluorochrome. Les cellules sont analysées en CMF. La population est sélectionnée sur le cytogramme en fonction de la taille et de la structure de la cellule. On peut alors obtenir un histogramme de l'intensité de fluorescence des cellules sélectionnées. Une

amplification des résultats est obtenue par l'utilisation d'un module logarithmique permettant de mieux visualiser les faibles intensités de fluorescence.

L'intérêt de cette technique d'IF directe sur sang total est sa rapidité. Pour chaque anticorps monoclonal utilisé, un seuil de positivité est déterminé de façon à n'avoir aucun faux négatif. Par contre en raison de l'existence de réactions croisées de l'anticorps monoclonal anti HLA-B27 avec d'autres spécificités du groupe CREG B7, des faux positifs sont possibles. Ainsi, selon l'anticorps monoclonal utilisé, de nombreuses réactions sont ininterprétables et doivent être contrôlées.

1.1.3-Techniques immuno-enzymatique.

Une technique ELISA sandwich a été décrite pour la détection de molécules HLA-B27 solubles [POULETTY, 1993]. Les molécules HLA de classe I sont associées à la β_2 microglobuline et expriment des épitopes polymorphiques reconnus par des anticorps monoclonaux. La concentration sérique de ces molécules est très variable d'un individu à l'autre et selon l'allèle. Ainsi, les molécules HLA-B27 solubles sont peu nombreuses [SHIMIZU et coll., 1991].

La technique est réalisée sur une plaque ELISA sur laquelle sont fixés les anticorps monoclonaux anti HLA-B27 et anti B7. Un témoin positif (molécules B7 solubles) et un témoin négatif sont nécessaires à chaque analyse.

Le serum ou le plasma à tester est incubé en présence de l'anticorps monoclonal. Après plusieurs lavages, un anticorps anti β_2 microglobuline conjugué à la peroxydase est déposé. La réaction est révélée par addition d'OPD (orthophénylène-diamine) puis une mesure de l'absorbance à 490 nm est réalisée.

L'étude réalisée par Pouletty et coll. en 1993 trouve une bonne corrélation avec la microlymphocytotoxicité (99,2%). Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de cellules viables.

En revanche, elle présente les mêmes inconvénients que les autres techniques sérologiques quant aux réactions croisées. Le principal inconvénient est l'existence de faux négatifs dus à un taux de molécules solubles inférieur au seuil de détection ou à des substances interférant avec les molécules solubles.

1.2- Technique cellulaire.

La mise en évidence de spécificités HLA peut être réalisée par les tests de lymphocytotoxicité à médiation cellulaire.

Les clones T cytotoxiques (CTL) peuvent être soit allospécifiques, générés au cours d'une réaction allogénique in-vitro, soit spécifiques d'un peptide viral reconnu dans le contexte de présentation par une molécule HLA de classe I (clones HLA restreints). Les clones T vont proliférer en présence de l'antigène auquel elles ont été sensibilisées puis, lyser les cellules cibles. Cette lyse cellulaire peut être quantifiée par la mesure du relargage de chrome radioactif.

Cette technique n'est pas réalisée pour le phénotypage HLA en routine, mais elle permet parfois une définition plus fine de certaines spécificités par rapport aux méthodes sérologiques. Elle est utilisée dans le suivi des greffes de moelle allogéniques et en recherche.

2- TECHNIQUE BIOCHIMIQUE: Electrophorèse d'iso-electro-focalisation (IEF)

L'IEF est réalisée en gel de polyacrylamide. Chaque glycoprotéine HLA membranaire atteint son équilibre autour de son point isoélectrique. Cette technique a contribué à la mise en évidence de spécificités HLA de classe I mais reste une technique confidentielle, plus du domaine de la recherche.

3- IDENTIFICATION DES GÈNES HLA

3.1- Techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire reposent sur la connaissance du polymorphisme des séquences nucléotidiques.

3.1.1- Extraction de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) génomique.

Cette extraction réalisée à partir de sang prélevé sur anticoagulant, comporte cinq étapes.

- Lyse des globules rouges par choc hypotonique.
- Lyse des globules blancs par le SDS (sodium dodecyl sulfate) et la protéinase K.
- Extraction des protéines dégradées (Phenol-chloroforme-NaCl...)
- Précipitation de l'ADN avec de l'éthanol absolu.
- Conservation de l'ADN après resuspension dans un tampon Tris-EDTA.

3.1.2-Technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme) ou étude du polymorphisme de taille des fragments de restriction

Cette méthode repose sur la présence ou l'absence de sites de restriction polymorphes. Ces sites sont en déséquilibre de liaison avec des variations alléliques des séquences codantes.

Après isolement de l'ADN génomique, celui-ci est digéré par des enzymes de restriction puis les différents fragments sont séparés par électrophorèse. Ces fragments sont ensuite transférés sur une membrane. Ils sont identifiés à l'aide de sondes spécifiques marquées.

Cette méthode n'est plus utilisée en raison du temps de réalisation (15 jours), de la difficulté de l'interprétation et de l'impossibilité d'obtenir certains sous typages.

3.1.3- Techniques utilisant la PCR (Polymerase Chain Reaction).

a-Principe et description.(figure 12)

Cette technique a été initialement utilisée pour le génotypage des allèles HLA de classe II. La PCR est une amplification enzymatique d'un fragment spécifique d'ADN. Le fragment amplifié est déterminé par l'utilisation de 2 amorces oligonucléotidiques situées de part et d'autre de la séquence d'acides nucléiques. L'amplification élective de cette séquence consiste en la répétition de cycles comportant les étapes suivantes:

- Dénaturation de l'ADN à 94°C: séparation des deux brins.
- Hybridation de chaque amorce en face de leur séquence complémentaire.
- Extension à partir de chaque amorce dans le sens 5'-3' d'une séquence complémentaire à la séquence cible.

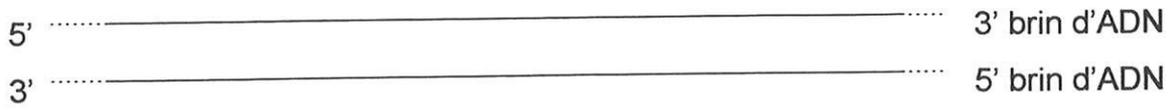
L'amplification est exponentielle puisqu'à chaque cycle il y a doublement de la séquence comprise entre les deux amorces.

Ainsi en 20 cycles la séquence initiale est amplifiée plus d'un million de fois. Le contrôle du produit amplifié se fait par électrophorèse en gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. Ce composé s'intercale entre les bases de l'ADN et permet leur visualisation sous lumière ultra-violette.

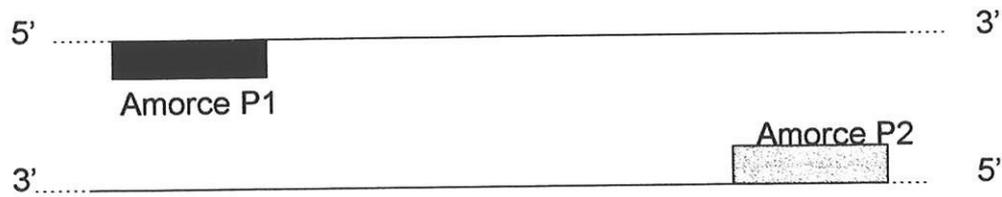
Figure 12: Principe de la PCR

1^{er} cycle

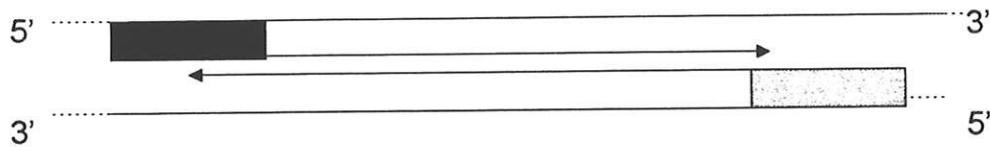
DÉNATURATION



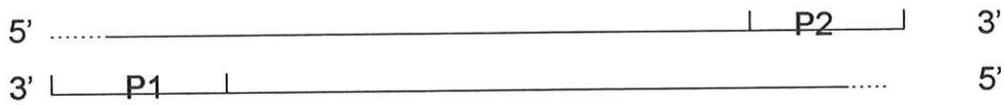
HYBRIDATION



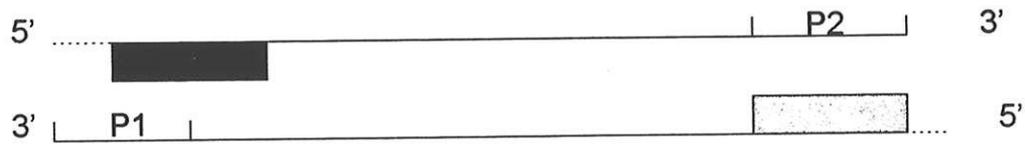
EXTENSION

2^{ème} cycle

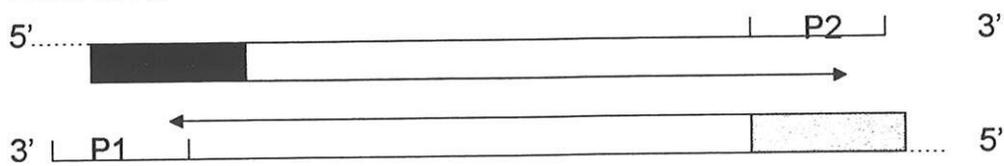
DÉNATURATION



HYBRIDATION



EXTENSION



b- PCR SSO (PCR Séquence Spécific Oligonucleotide probe hybridation).

Cette technique est une PCR utilisant des amorces localisées dans une région consensus mais encadrant une région très polymorphe. Les produits amplifiés sont fixés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose (Dot-Blot). Puis, des sondes oligonucléotidiques spécifiques de séquences vont s'hybrider seulement si la séquence complémentaire est présente dans la séquence d'ADN amplifiée. La fixation de la sonde peut être révélée par la présence d'un marqueur radioactif ou mieux, par la digoxigénine. Dans ce cas, la détection est faite en utilisant un anticorps anti digoxigénine conjugué à la phosphatase alcaline. L'adjonction du substrat provoque la chémoluminescence détectée par autoradiographie.

c- PCR-RFLP

Cette technique est une analyse des fragments de restriction après amplification de l'ADN. Le produit amplifié est digéré par des enzymes de restriction puis, les fragments sont séparés par électrophorèse afin d'identifier les différents fragments spécifiques des allèles étudiés.

d- PCR-ASA (Amplification Spécifique d'Allèle) ou PCR-SSP

Cette méthode est fondée sur la présence ou l'absence du produit génomique amplifié. L'utilisation d'amorces spécifiques d'une séquence nucléotidique permet une amplification spécifique d'un allèle. On vérifie par électrophorèse la présence ou l'absence du produit d'amplification. Chaque réaction ne permet l'identification que d'un allèle, il est donc nécessaire de réaliser autant de réactions qu'il y a de spécificités à identifier.

3.2- Séquençage des gènes HLA.

La détermination des séquences des gènes codant pour les molécules HLA devrait permettre une identification sans ambiguïté des allèles et leur comparaison. Actuellement, des techniques rapides de clonage et de séquençage des gènes sont réalisées mais elles ne sont pas applicables en routine.

4-Particularité du typage HLA-B27.

La microlymphocytotoxicité dépendante du complément est la technique la plus utilisée pour l'identification de l'Ag HLA-B27 et reste la technique de référence. L'analyse en CMF de l'Ag HLA-B27 est réalisée par les laboratoires ayant à leur disposition un cytomètre (environ 20% des laboratoires HLA). L'intérêt de cette technique d'immuno-fluorescence directe sur sang total est sa rapidité et son faible coût.

Les techniques immunoenzymatiques, biochimiques, de biologie moléculaire et de séquençage ne sont utilisées en routine par aucun laboratoire, à notre connaissance, pour le typage HLA-B27.

Des techniques de typage HLA-B27 par PCR-SSP [OLERUP O. 1994] et PCR-SSO [DOMINGUEZ et coll. 1992, LOPEZ-LARREA et coll. 1995] ont été rapporté, mais ne semblent pas être utilisé en routine. Une technique d'identification des sous-types HLA-B27 par séquençage direct des 2^{ème} et 3^{ème} exons vient d'être publiée [BLASCZYK.R et coll.1996]. Cette methode a permis l'identification d'un nouvel allèle HLA-B27 (B*27053) qui diffère de B*2705 par une simple substitution en position 146 du 3^{ème} exon.

V

SUJET DE L'ÉTUDE

1-STRATEGIE DU LABORATOIRE

1.1-Généralités

Le typage HLA-B27 est un examen largement prescrit en raison de la forte association entre cet allèle et la SPA.

Le laboratoire d'immunologie du CHU de Limoges reçoit environ 500 demandes de typage HLA-B27 par an. Jusqu'en 1990, cet allèle était recherché seulement par une méthode de microlymphocytotoxicité. Depuis 1991, l'antigène HLA-B27 est recherché par immunofluorescence directe avec analyse en CMF et contrôle en microlymphocytotoxicité.

1.2- La cytométrie en flux (CMF)

L'anticorps monoclonal utilisé est produit par le clone HLA-ABC-m³ et couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (Behring®). Le marquage des cellules est réalisé sur sang total après lyse des globules rouges par technique « Q-prep » (Coulter®). Le signal d'immunofluorescence est analysé en cytométrie.

L'avantage de cette technique est la rapidité d'analyse (environ 30 minutes) mais son interprétation reste dans certains cas douteuse.

Le signal d'immunofluorescence émis par les lymphocytes marqués est analysé et transcrit sur un graphique. Les seuils de négativité et de positivité pour cet anticorps sont déterminés en fonction de la moyenne de fluorescence des cellules. Ils ont été déterminés au laboratoire en 1991 après analyse d'un échantillon de sujets HLA-B27 positifs et d'un échantillon de sujets HLA-B27 négatifs.

Le typage des cellules en cytométrie de flux étant un examen de dépistage des sujets HLA-B27 positifs, une sensibilité du test de 100% est recherchée. Le seuil de négativité correspond à la plus petite valeur observée dans l'échantillon HLA-B27 positifs.

Le seuil de positivité est déterminé de façon à ne pas avoir de faux positifs. Ce seuil correspond à la plus grande valeur observée dans l'échantillon HLA-B27 négatif.

Ainsi, les valeurs admises au laboratoire sont:

- seuil de négativité=1
- seuil de positivité=5,8
- entre ces deux valeurs, le résultat est ininterprétable et le typage HLA-B27 est réalisé en microlymphocytotoxicité.

Ces seuils permettent une identification de 90% des sujets testés, 10% devant être contrôlés en microlymphocytotoxicité. Les résultats douteux sont dus aux réactions croisées avec les antigènes du CREG B7 et aux cellules exprimant les Ag HLA à un faible niveau.

1.3- Microlymphocytotoxicité.

Cette technique de référence est réalisée au laboratoire d'immunologie pour le phénotypage HLA de classe I dans le cadre de la recherche d'une association HLA et maladie, des transplantations et des recherches de paternité.

Les anticorps utilisés sont des anticorps polyclonaux obtenus par les alloserums de femmes enceintes. Pour le phénotypage HLA-B27, on utilise des plaques à 60 puits sur lesquelles sont déposés les alloserums permettant l'identification de l'antigène HLA-B27, et des antigènes appartenant au CREG B7(Tableau 5).

Tableau 5
Plan de plaque

COU B7	BOY B7	VER B7	BRI B7+B27	BEHRING B7+B27	E-199-2 B7+B27
E-533 B13	MEG B40	CHA B27	E943-2 B27	BEHRING B27	CRA B27
E227 B13	PER B13	E851 B17	E861 B17	E919 B17+B63	CAR B17
				Témoin +	Témoin -

L'avantage de cette technique par rapport à la cytométrie est l'identification des antigènes appartenant au CREG B7. Mais, comme la cytométrie cette technique repose sur l'expression des molécules HLA à la membrane des cellules et donc dans environ 5% des cas, son interprétation est délicate.

2- Objectifs du travail.

Cette étude doit permettre de déterminer une politique de typage HLA-B27 en routine la plus fiable possible. La CMF serait conservée en première intention car le laboratoire dispose d'un cytomètre, la technique est rapide et son coût est modéré. Les contrôles seraient effectués en biologie moléculaire. Dans un second temps, l'influence des différents sous-types HLA-B27 sur la qualité du phénotypage en CMF sera analysée.

2.1- Etude de 3 anticorps monoclonaux en cytométrie.

Actuellement, il existe sur le marché plusieurs anticorps monoclonaux commercialisés pour le phénotypage HLA-B27. Ces anticorps sont produits par les clones:

- HLA-ABC-m3
- GS 145.2
- FD 705-9E1E10

Ces anticorps reconnaissent des épitopes différents de la molécule HLA de classe I.

Une première partie de cette étude est de tester et comparer ces 3 anticorps monoclonaux sur un échantillon de sujets pour lequel un phénotypage HLA est demandé. Les résultats seront analysés afin de déterminer le seuil de positivité, le seuil de négativité et la valeur prédictive de chaque anticorps.

2.2- Typage HLA-B27 générique par biologie moléculaire.

La mise au point d'une technique de génotypage HLA-B27 par PCR-SSP dérivée d'un protocole d'Olerup (1994), permettra pour chaque patient de

déterminer la présence ou l'absence de l'allèle HLA-B27. Les résultats de cette technique serviront de référence pour la comparaison des résultats obtenus en CMF. Une population témoin HLA-B27 positive et des ADN de lignées de référence HLA-B27 positives permettront de valider cette technique.

2.3- Sous typage HLA-B27 par biologie moléculaire.

La mise au point d'une technique de sous typage HLA-B27 par PCR-SSO selon le protocole de Lopez-Larrea (1995) permettra d'identifier l'allèle HLA-B27 de chaque sujet dans la population témoin et dans la population de patients. Ainsi, la fréquence de chaque sous-type pour chaque population sera évaluée.

Cette technique sera validée par le sous-typage d'ADN de références correspondant aux sous-types B*2701-B*2702 B*2703-B*2704-B*2705-B*2706-B*2707 et B*2708. Le sous-typage B*2709, décrit après que ce travail ait débuté ne sera pas réalisé.

Pour chaque allèle HLA-B27, l'intensité de la fluorescence en CMF sera analysée afin d'évaluer l'influence des sous-types.

VI
MATERIELS ET
METHODES

1- MATERIELS

1.1- Population de malades

Pour la réalisation de cette étude, 304 échantillons de sang ont été prélevés sur anticoagulant (Citrates, EDTA ou Héparine). Tous ces échantillons correspondent à des demandes de typage HLA, soit pour la recherche d'une association HLA et maladie, soit pour une greffe d'organe ou de tissus, prescrites au CHU de Limoges. Cette étude a été réalisée entre Mai 1995 et Octobre 1995.

Pour chacun de ces prélèvements, une étude du phénotypage en CMF et une extraction d'ADN génomique est effectuée.

1.2- Population témoin

La population de sujets sains nous ayant servi de référence pour cette étude était constituée des donneurs du « panel » (n=94) et des donneurs de moelle osseuse (n=652). Chaque témoin avait été au préalable phénotypé par la technique de microlymphocytotoxicité et était connu comme porteur ou non de l'antigène HLA-B27.

Cette population témoin nous a permis de valider les techniques de biologie moléculaire et d'évaluer la répartition des sous-types HLA-B27 dans la population Limousine.

1.3- Les lignées lymphoblastoïdes (lignées EBV)

Des lignées de référence des Workshop HLA possédant les gènes HLA de classe I et β 2 microglobuline humaine, ont été cultivées.

Cinq lignées (TS1, WEWAKI, PAR, TO, SNA.BLL) exprimant respectivement les allèles B*2705, B*2704, B*2706, HLA-B13, HLA-B7, ont été testées en CMF. Cet examen a permis de comparer les moyennes de fluorescence obtenues avec les cellules humaines du sang périphérique. D'autre part les

lignées exprimant les molécules HLA-B7 et HLA-B13 ont montrées l'existence ou non de réactions croisées avec certains antigènes appartenant au CREG-B7.

1.4- ADN de référence

Au cours de ce travail huit ADN de référence possédant chacun un allèle HLA-B27 différent (B*2701 à B*2708) ont permis de valider la technique de sous typage HLA-B27. Ces ADN ont été fournis par le Dr Lopez-LARREA (Madrid-Espagne).

2- METHODES

2.1- La cytométrie en flux (CMF)

2.1.1- Les anticorps monoclonaux

Il existe actuellement 3 clones produisant des anticorps monoclonaux anti HLA-B27 commercialisés:

le clone HLA-ABC-m3 produit une Ig G_{2a} de souris conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Cette Ig est associée à une Ig G₁ monoclonale anti HLA-B7 couplée à la phycoerythrine (IMMUNOTECH®).

le clone GS 145.2 (BECTON DICKINSON®) produit une Ig G₁, kappa anti HLA-B27 conjuguée à la FITC. Cet anticorps est associé à un anticorps monoclonal anti CD3 (clone Sk7) conjugué à la phycoerythrine, pour l'identification des lymphocytes T.

le clone FD705-9E1E10 (ONE LAMBDA®) produisant une Ig G_{2b}, kappa anti HLA-B27 couplée à la FITC.

Trois anticorps monoclonaux dérivant de chacun de ces 3 clones ont été testés pour le phénotypage HLA-B27 en CMF sur les 304 patients et les 6 lignées lymphoblastoïdes:

- Ac monoclonal anti HLA-B27 couplé à la FITC + Ac monoclonal anti HLA-B7 couplé à la PE (IMMUNOTECH®).

- Ac monoclonal anti HLA-B27 couplé à la FITC + Ac monoclonal anti CD3 couplé à la PE (BECTON DICKINSON®)

- Ac monoclonal anti HLA-B27 couplé à la FITC (ONE LAMBDA®)

2.1.2- Le cytomètre.

L'analyse des cellules a été réalisée sur un cytomètre Profil 2 (COULTER®). La source lumineuse est un laser à argon de 15 mV émettant à 488 nm. Les signaux de fluorescence sont sélectionnés par des filtres dichroïques: filtre « band-pass » à 525 nm pour la FITC et filtre « band pass » à 560 nm pour la PE.

2.1.3- Techniques de marquage direct des cellules du sang total.

a- Ac monoclonal HLA-B27 FITC / Ac monoclonal HLA-B7 PE (IMMUNOTECH®). Clone HLA-ABC-m³.

L'utilisation de ce réactif permet un double marquage des molécules HLA-B7 et HLA-B27 à la surface des leucocytes.

Prélèvement: Le sang collecté sur tube citraté, hépariné ou EDTA est marqué dans les 12 heures suivant le prélèvement et conservé à température ambiante.

Marquage: Dans un tube à hémolyse de 5 ml, 50 µl de sang homogénéisé sont mélangés à 10 µl de conjugué.

Après avoir vortexé 3 secondes, le tube est incubé 15 minutes à température ambiante à l'obscurité.

Lyse: 2 ml de solution NH₄Cl sont ajoutés (150mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 0,1mM EDTA, pH=7,4; se conserve 10 jours à 4°C). Après avoir vortexé 3 secondes le tube est incubé 10 minutes à température ambiante à l'obscurité puis centrifugé 5 minutes à 1500 rpm. Le surnageant est éliminé.

Lavage: on resuspend le culot dans deux ml de PBS-BSA (140mM NaCl; 2,7mM KCl; 1,5mMKH₂PO₄; 8,1mM Na₂HPO₄; pH=7,4; 0,5%BSA). Après avoir vortexé 3 secondes, le tube est centrifugé 5 minutes à 1500 rpm puis le surnageant est éliminé.

Le culot est resuspendu dans 400µl de PBS et vortexé 3 secondes. Le tube bouché est incubé 15 minutes à 4°C à l'obscurité. L'analyse est effectuée dans les deux heures suivant le marquage.

L'analyse des cellules marquées se fait sur cytomètre (Coulter Epics° Profile Analyseur). Cent µl de l'échantillon sont aspirés.

Les paramètres analysés sont la diffraction de la lumière sous un angle droit (SSC), la diffraction de la lumière sous un petit angle (FSC), le signal de fluorescence LFL1 émis par la FITC (anticorps anti HLA-B27) et le signal de fluorescence LFL2 émis par la PE (anticorps anti HLA-B7).

Les photomultiplicateurs (PMT) sont réglés de façon à obtenir des signaux électriques interprétables: PMT Voltages SSC=440 volt

FL1=1300 volt

FL2=1152 volt

Une compensation de la fluorescence FL2 de 15% par rapport à FL1 est nécessaire.

Les résultats:

Le cytogramme représentant la répartition des cellules en fonction de leur taille (FSC) et de leur structure (SSC) permet de sélectionner la population lymphocytaire.

A partir de cette population lymphocytaire, un histogramme de l'intensité de fluorescence LF1 émis par la FITC (Ac anti HLA-B27) est réalisé ainsi qu'un histogramme de l'intensité de fluorescence LF2 émis par la PE (Ac anti HLA-B7) Trois mille cellules lymphocytaires sont analysées.

Le pourcentage de cellules fluorescentes et la moyenne de fluorescence pour chaque fluorochrome sont déterminés.

b- Ac monoclonal anti HLA-B27 FITC / Ac monoclonal anti CD3 PE (Becton Dickinson®). Clone GS 145.2

L'utilisation de ce réactif permet un double marquage des molécules HLA-B27 et CD3 à la surface des leucocytes.

Prélèvement: Le sang collecté sur tube citrate, hépariné ou EDTA est marqué dans les 12 heures suivant le prélèvement et conservé à température ambiante.

Marquage: Dans un tube à hémolyse de 5 ml, 50 µl de sang homogénéisé sont mélangés à 30 µl de conjugué.

Après avoir vortexé 3 secondes, le tube est incubé 15 minutes à température ambiante à l'obscurité.

Lyse: 2 ml de solution de lyse diluée au 1/10^{ème} extemporanément (10 x lysing Solution Concentrate. Becton Dickinson) sont ajoutés. Après avoir vortexé 3 secondes, le tube est incubé 10 minutes à température ambiante à l'obscurité, puis centrifugé 5 minutes à 1500 rpm. Le surnageant est éliminé.

Lavage: Le culot est resuspendu dans deux ml de PBS. Après avoir vortexé 3 secondes, le tube est centrifugé 5 minutes à 1500 rpm et le surnageant est éliminé.

Le culot est resuspendu dans 400µl de PBS et vortexé 3 secondes. Le tube bouché est incubé 15 minutes à 4°C à l'obscurité. L'analyse est effectuée dans les deux heures suivant le marquage.

L'analyse des cellules marquées se fait sur cytomètre (Coulter Epics® Profile Analyseur). Cent µl de l'échantillon sont aspirés.

Les paramètres analysés sont la diffraction de la lumière sous un angle droit (SSC), la diffraction de la lumière sous un petit angle (FSC), le signal de fluorescence LFL1 émis par la FITC (anticorps anti HLA-B27) et le signal de fluorescence LFL2 émis par la PE (anticorps anti CD3).

Les photomultiplicateurs (PMT) sont réglés de façon à obtenir des signaux électriques interprétables: PMT Voltages SSC=401 volt

FL1=1000 volt

FL2=1000 volt

Une compensation de la fluorescence FL2 de 15% par rapport à FL1 est nécessaire.

Les résultats:

Le cytogramme représentant la distribution des cellules en fonction de leur taille (FSC) et de leur structure (SSC) permet de sélectionner la population lymphocytaire.

A partir de cette population lymphocytaire, un histogramme de l'intensité de fluorescence LF1 émis par la FITC (Ac anti HLA-B27) est réalisé. Trois mille cellules lymphocytaires sont analysées.

Un second cytogramme représentant la répartition des cellules en fonction de leur structure (FSC) et de la fluorescence LF2 émise par la PE (anticorps anti CD3) permet de sélectionner la population de lymphocytes CD3. A partir de cette population lymphocytaire CD3, un histogramme de l'intensité de fluorescence LF1 émis par la FITC (anticorps anti HLA-B27) est réalisé.

Le pourcentage de cellules fluorescentes et la moyenne de fluorescence sont déterminés pour la population lymphocytaire totale et pour la population de lymphocytes CD3.

c- Ac monoclonal anti HLA-B27 FITC (ONE LAMBDA®) Clone FD705-9E1E10.

L'utilisation de ce réactif permet un simple marquage des molécules HLA-B27 à la surface des leucocytes.

Prélèvement: Le sang collecté sur tube citraté, hépariné ou EDTA est marqué dans les 12 heures suivant le prélèvement et conservé à température ambiante.

Marquage: Dans un tube à hémolyse de 5 ml 100 µl de sang homogénéisé sont mélangés à 1 µl de conjugué.

Après avoir vortexé 3 secondes, on incube 15 minutes à 4°C, à l'obscurité.

Lyse: La lyse des globules rouges est automatisée selon la technique «Q Prep» (COULTER®).

Le tube bouché est incubé 15 minutes à 4°C à l'obscurité.

L'analyse est effectuée dans les deux heures suivant le marquage. L'analyse des cellules marquées se fait sur cytomètre (Coulter Epics° Profile Analyseur). Cent µl de l'échantillon sont aspirés. Les paramètres analysés sont la diffraction de la lumière sous un angle droit (SSC), la diffraction de la lumière sous un petit angle (FSC), le signal de fluorescence LFL1 émis par la FITC (anticorps anti HLA-B27).

Les photomultiplicateurs (PMT) sont réglés de façon à obtenir des signaux électriques interprétables: PMT Voltages SSC=447 volt

FL1=1284 volt

Résultats: Le cytogramme représentant la distribution des cellules en fonction de leur taille (FSC) et de leur structure (SSC) permet de sélectionner la population lymphocytaire .

A partir de cette population lymphocytaire, un histogramme de l'intensité de fluorescence LF1 émis par la FITC (Ac anti HLA-B27) est réalisé. Trois mille cellules lymphocytaires sont analysées.

Le pourcentage de cellules fluorescentes et la moyenne de fluorescence sont déterminés pour la population lymphocytaire.

2.2- La biologie moléculaire

2.2.1- Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN a été réalisée selon la technique du " salting-out ". Le protocole utilisé est une technique rapide, réalisable en 50 minutes. Il est possible d'utiliser des échantillons de sang total frais ou congelés, prélevés sur EDTA ou ACD [MILLER et coll., 1988].

a- technique

- Transférer 500 µl de sang total dans un tube de 1,5 ml. Un ml de tampon de lyse 1X est ajouté. Après agitation délicate par inversion pendant 30 secondes

et centrifugation à 13000 rpm pendant 1 minute, laver avec de l'eau distillée puis centrifuger à 13000 rpm pendant 1 minute.

- Le surnageant et l'excès de liquide sont éliminés puis le culot est

resuspendu dans:

- 80 µl de tampon protéinase K 5X,
- 30 µl de protéinase K (10 mg/ml, dissout dans de l'eau distillée),
- 20 µl de SDS à 20 %.
- 240 µl d'eau distillée.

•Le tube est incubé dans un bain thermostaté sous agitation, à 55° pendant 30 minutes.

•Après retour du tube à température ambiante, 100 µl de NaCl 6M sont ajoutés et mélangés vigoureusement pendant 15 secondes. Les protéines précipitées sont centrifugées à 13000 rpm pendant 6 minutes. Le surnageant est transféré dans un tube de 1,5 ml puis centrifugé à 13000 rpm pendant 3 minutes.

•Transférer le surnageant dans un tube de 1,5 ml. Un ml d'éthanol absolu est ajouté. Après précipitation de l'ADN celui-ci est centrifugé à 13000 rpm pendant 2 minutes, puis lavé 1 fois avec de l'éthanol à 70 %. Centrifuger l'ADN à 13000 rpm pendant 2 minutes. Eliminer l'éthanol et essuyer les parois du tube. Dissoudre l'ADN dans 50 à 200 µl de tampon Tris EDTA en vortexant pendant 30 secondes.

b- Réactifs

- Tampon Tris-HCl 1 M, pH 7,5.
- Tampon de lyse 1X :
 - Sucrose 0,3 M
 - Tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,5
 - MgCl₂, 6H₂O 5mM
 - Triton 100 x 1%
- Tampon Protéinase K 5X:
 - NaCl 0,375 M
 - EDTA 0,12 M, pH 8.0
- Tampon SDS 20 %.

- Tampon NaCl 6 M.

c-Mesure de la concentration de l'ADN.

La mesure de la concentration d'ADN se fait par lecture de la densité optique à 260 nm. La concentration d'ADN est donnée par la formule :

$$\text{DO}_{260} \times \text{facteur de dilution de l'ADN} \times 50 = \mu\text{g/ml}$$

Le degré de pureté de l'ADN est donné par le rapport :

$$R = \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$$

si $R = 1,80$ l'ADN est pur

si $R < 1,5$ ou $> 2,5$ refaire l'extraction

L'ADN ainsi extrait se conserve à 4°.

2.2.2- Amplification de l'ADN par PCR-SSP= Typage HLA-B27 générique

Cette technique a été mise au point à partir des travaux d'OLERUP (1994).

a- Les amorces.

Pour cette technique, le choix des amorces est essentiel afin d'amplifier spécifiquement l'allèle HLA-B27.

Une seule séquence commune aux 9 sous-types HLA-B27 et spécifique de l'allèle HLA-B27 a été trouvée. Elle est localisée au niveau des nucléotides 207 à 210 de l'exon 2 du gène HLA-B (Figure 13).

Cette séquence permet le choix d'une première amorce (3'-B27) complémentaire des nucléotides 199 à 219 du brin d'ADN 5'.

Cette amorce est composée de 21 bases:

5' CAG TCT GTG CCT TGG CGT TGC 3'

Cette séquence présente une base G en position terminale alors que l'allèle B*2701 présente une base T. Compte tenu de cette différence, l'introduction d'une base guanine (G) à la place d'une base cytosine (C) est volontaire et contribue à augmenter la spécificité de l'hybridation.

Le Tm de cette amorce est de 68°C (13 bases G et C, et 8 bases A et T).

Une seconde amorce est déterminée (5'B27). Elle est complémentaire des nucléotides 76 à 94 du brin d'ADN 3'. Cette amorce est composée de 19 bases:

5' GCT ACG TGG ACG ACA CGC T 3'

Le Tm de cette amorce est de 62°C (12 bases G et C, et 7 bases A et T).

Les nucléotides 76 à 94 ne présentent pas de motif spécifique de l'allèle HLA-B27. Ils sont aussi présents au niveau des allèles HLA-B40, B41, B44, B45, B47, B49 et B50. Cependant, la spécificité de l'amorce 3' est suffisante pour que le fragment encadré par ces 2 amorces soit spécifique de l'allèle HLA-B27.

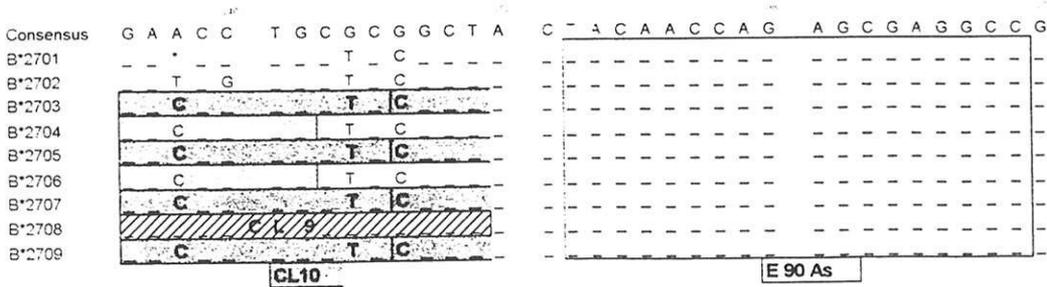
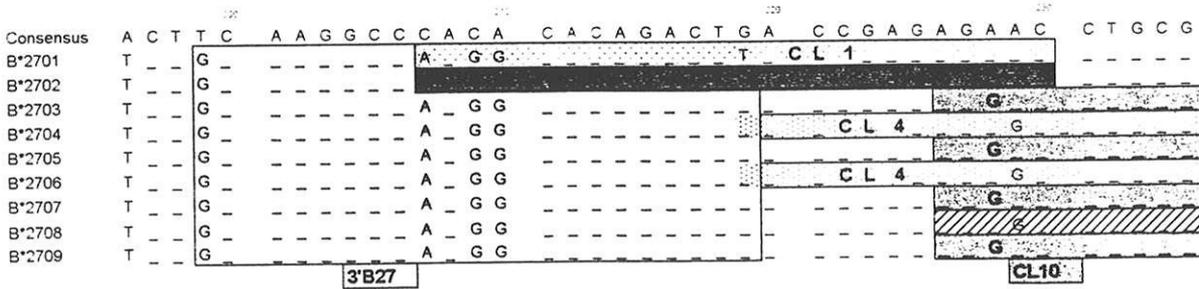
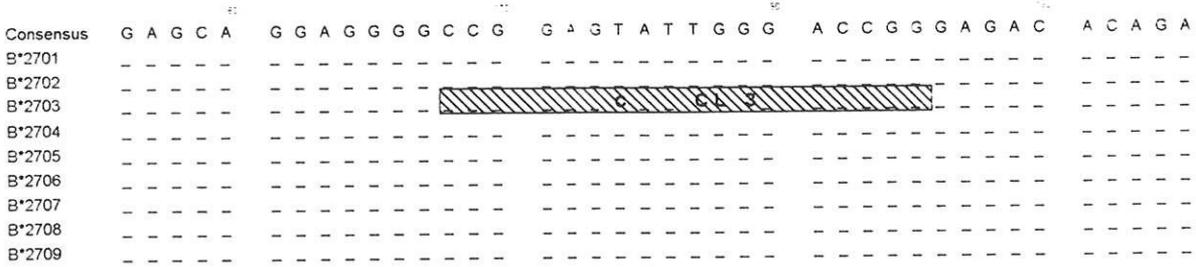
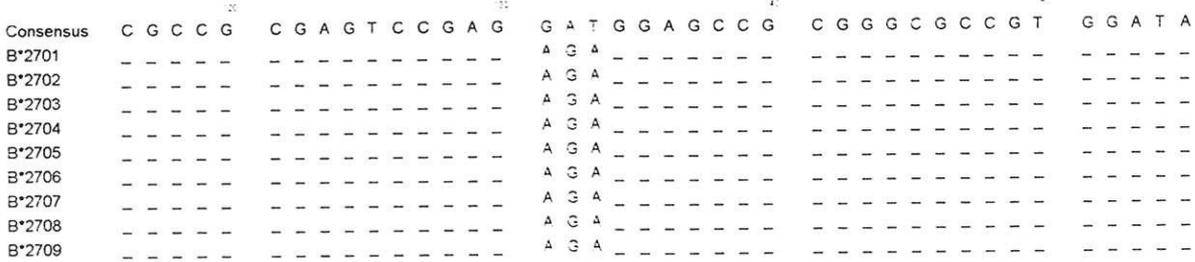
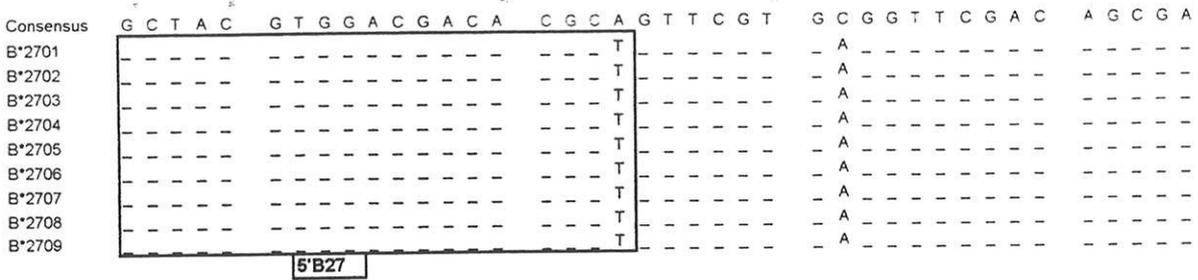
Le fragment ainsi amplifié est composé de 144 bp., constituées à 66% par la Guanine et la Cytosine. De plus, les amorces utilisées sont constituées à 63% par des bases Guanine et à 62% par des bases Cytosine. Ainsi, pour obtenir une amplification de ce fragment, il est nécessaire d'ajouter au mélange réactionnel du glycerol.

Une seconde paire d'amorces encadrant un fragment de 475 bp du gène de l'hormone de croissance humaine (HGH) sert de contrôle interne à la réaction. Les séquences de ces amorces sont:

HGH3= 5' CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A 3'

HGH4= 5' ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C 3'

Figure 13
Exon 2 du gène HLA-B27



b- Mélange réactionnel.

Chaque amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 15 μ l. Les composants de ce mélange réactionnel sont:

Tampon Taq Biobrobe[®] contenant du chlorure de magnésium (1,5mM).

Taq polymérase Bioprobe[®]: 2,5U/ 100 μ l

d NTP: 200 μ M chacun

glycerol: 7,5%

amorces 5' B27, 3' B27, HGH 3, HGH 4: 0,3 μ M chacune

ADN: 100ng

Rouge crésol: 75 μ g/ ml

c- Programme d'amplification.

La réaction PCR est réalisée sur thermocycleur PERKLIN ELMER 9600. Après une dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 1 minute et 50 secondes, 30 cycles d'amplification sont effectués. Chacun de ces cycles comprend une phase de dénaturation à 94°C pendant 20 secondes, une phase d'hybridation des amorces à 59°C pendant 50 secondes et une phase d'extension à 72°C pendant 30 secondes.

Une élongation terminale est réalisée à 72°C pendant 2 minutes.

d- Résultats.

L'amplification des fragments d'ADN est contrôlée par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%, contenant 0,5 μ g/ ml de bromure d'éthidium. Celui-ci s'intercale entre les bases de l'ADN et permet la visualisation des produits amplifiés sous lumière ultra-violette.

L'amplification de chaque ADN est validée par l'existence d'une bande de 475 bp correspondant à un fragment du gène de l'hormone de croissance humaine.

L'existence d'une bande supplémentaire de 144 bp correspond au fragment de l'exon 2 du gène HLA-B27 et permet de conclure à la présence du

gène HLA-B27 dans l'échantillon amplifié. L'absence de cette bande permet d'exclure cet allèle.

2.2.3- Sous typages HLA-B27 par PCR-SSO

Cette technique a été mise au point à partir des travaux de DOMINGUEZ et coll. (1992) et LOPEZ-LARREA et coll. (1995).

a- Amplification de l'ADN

Les produits d'amplification obtenus par la technique de PCR-SSP HLA-B27 ne peuvent pas être utilisés pour l'identification des sous-types HLA-B27.

En effet, le polymorphisme de chaque sous-type est localisé en dehors du fragment amplifié sauf pour l'allèle HLA-B*2703 (Figure 13).

Une paire d'amorces encadrant un fragment de 165 bp de l'exon 2 du gène HLA permet l'identification des sous-types HLA-B*2701, B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706 et B*2708. Un fragment de B*2707 est amplifié par ces amorces mais il ne présente pas de motifs polymorphe permettant son identification.

- L'amorce 5' est celle utilisée pour la technique de PCR-SSP (5'-B27).

Elle est composée de 19 bases:

5' GCT ACG TGG ACG ACA T CGC T 3'

Ces bases sont complémentaires des nucléotides 76 à 94 du brin d'ADN 3'. Cette amorce n'est pas spécifique de l'allèle HLA-B27, elle s'hybride aussi avec les allèles HLA B40, B41, B44, B45, B47, B49 et B50.

- L'amorce 3' (E 90 As) est complémentaire des nucléotides 252 à 269 du brin d'ADN 5'. Cette amorce est composée de 18 bases:

5' GGC CTC GCT CTG GTT GTA 3'

Le Tm de cette amorce est de 58°C (11 bases G et C, 7 bases A et T). Cette amorce ne présente aucune spécificité puisqu'elle s'hybride avec la séquence consensus de l'exon 2 du gène HLA-B. Ainsi, cette paire d'amorce peut amplifier les allèles HLA-B27, B40, B41, B44, B45, B47, B49 et B50.

L'identification du sous-type HLA-B*2707 nécessite l'amplification d'un fragment d'ADN de 272 bp localisé dans l'exon 3 du gène HLA-B (Figure 14).

•L'amorce 5' (E91 BS) est complémentaire des nucléotides 1 à 20 du brin d'ADN 3'.

Cette amorce est composée de 21 bases:

5' GGG TCT CAC ACC CTC CAG AGC 3', et son Tm est de 70°C (14 bases G et C, 7 bases A et T).

Elles s'hybride avec les allèles HLA-B*2707, B*0702, B*0703, B*0801, B*4201, B*4801, B*3505, B*4002, B*4003, B*4005, B*3903.

•L'amorce 3' (E181 As) est complémentaire des nucléotides 255 à 272 du brin d'ADN 5'.

Cette amorce est composée de 18 bases:

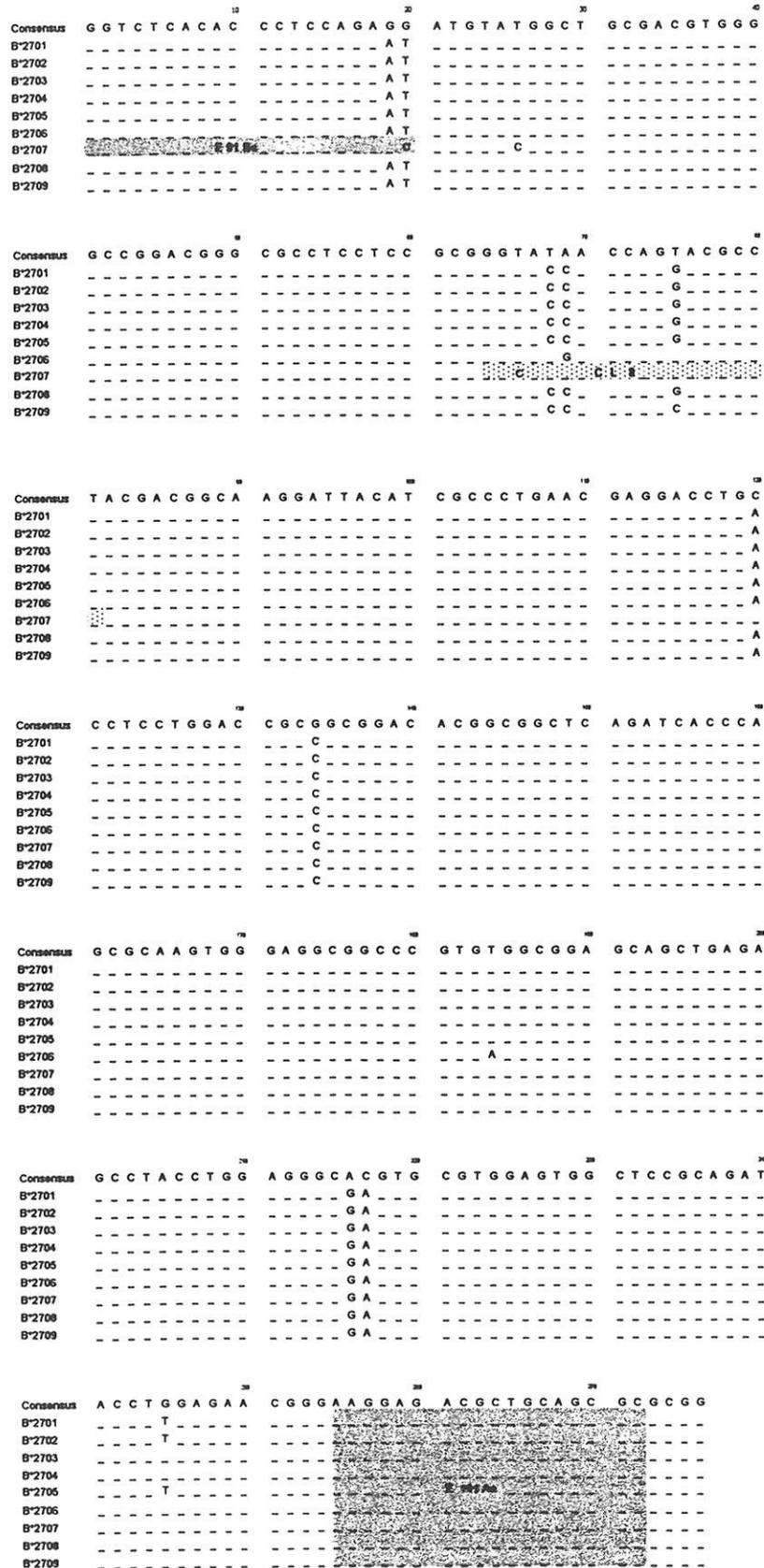
5' GCG CTG CAG CGT CTC CTT 3' et son Tm est de 60°C (12 bases G et C, 6 bases A et T). Elle s'hybride avec de nombreux allèles HLA-B sauf, B*4001, B*4101, B07, B08 et B*4801.

Ainsi, cette paire d'amorces peut amplifier les allèles HLA B*2707, B*4002, B*4003, B*4005, B*3903, B*4201, B*3505.

L'amplification du fragment de l'exon 2 est effectuée dans un volume réactionnel de 50µl composé de:

- tampon Taq BIOPROBE® contenant du chlorure de magnésium 1,5 mM
- Taq polymérase Bioprobe®: 2,5U/ 100µl
- dNTP: 200µm chacun
- glycerol: 7,5%
- amorces 5' B27 et E 90 As à 0,3µM
- ADN: 300 ng
- rouge crésol: 75µg/ ml.

Figure 14
Exon 3 du gène HLA-B*27



Après une dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 1 minute et 50 secondes, 30 cycles d'amplification sont effectués. Chacun de ces cycles comprend une phase de dénaturation à 94°C pendant 20 secondes, une phase d'hybridation des amorces à 55°C pendant 50 secondes et une phase d'extension à 72°C pendant 30 secondes. Une élongation terminale est réalisée à 72°C pendant 2 minutes. L'amplification du fragment d'ADN est contrôlée par une électrophorèse. Chaque ADN peut être amplifié puisque seul le sous-typage des sujets HLA-B27 positifs en PCR-SSP est réalisé. Il n'y a donc pas de contrôle interne de la réaction d'amplification.

L'amplification de l'exon 3 est effectuée avec un volume réactionnel de 30µl. Seules les amorces diffèrent par rapport au mélange réactionnel de l'exon 2. De même, les cycles d'amplification sont identiques. L'amplification du fragment d'ADN est contrôlée par une électrophorèse. Parmi les allèles HLA-B27, seul l'allèle HLA-B*2707 est amplifié par cette réaction. Ainsi, l'amplification d'un fragment de 475 bp du gène de l'hormone de croissance sert de contrôle interne de la réaction d'amplification.

b- Les sondes oligonucléotidiques

Pour chaque sous-type à identifier, une sonde oligonucléotidique est utilisée. Dans cette étude, le sous-type HLA-B*2709 n'a pas été recherché.

Le sous-type HLA-B*2701 est identifié par une sonde CL1 s'hybridant avec les nucléotides 207 à 230 de l'exon 2. Cette sonde est spécifique de l'allèle HLA-B*2701.

Le sous-type HLA-B*2702 est identifié par une sonde CL2 s'hybridant avec les nucléotides 207 à 230 de l'exon 2. Cette sonde est spécifique de l'allèle HLA-B*2702.

Le sous-type HLA-B*2703 est identifié par une sonde CL3 s'hybridant avec les nucléotides 167 à 185 de l'exon 2. Cette sonde est spécifique de l'allèle HLA-B*2703.

Les sous-types HLA-B*2704 et B*2706 sont identifiés par une sonde CL4 s'hybridant avec les nucléotides 219 à 242 de l'exon 2. Cette sonde est spécifique de ces deux allèles. Etant donné la faible probabilité que nous avons de retrouver un sujet porteur de l'un de ces 2 sous-types, l'identification spécifique de chacun de ces sous-types n'a pas été réalisé.

Le sous-type HLA-B*2705 est identifié par une sonde CL10 s'hybridant avec les nucléotides 226 à 249 de l'exon 2. Cette sonde permet l'identification des allèles B*2703, B*2705, B*2707, B*2709 et B*4701.

Les sous-types B*2703 et B*2707 étant identifiés par d'autres sondes, on peut par élimination différencier ces 3 allèles HLA-B27. Mais il n'est pas possible de différencier les allèles HLA-B*2705, B*2709 et B*4701.

Le sous-type B*2707 est identifié par la sonde CL8 s'hybridant avec les nucléotides 64 à 81 de l'exon 3. Cette sonde permet l'identification des allèles HLA-B*2707, B*4002, B*4005, B*4201.

Le sous-type B*2708 est identifié par la sonde CL9 s'hybridant avec les nucléotides 226 à 249 de l'exon 2. Cette sonde permet l'identification des allèles HLA-B*2708, B40, B*4101, B*4501 et B*5001 (Tableau 4)

c- Dot-Blot

Les produits d'amplification sont dénaturés par la soude (25µl de NaOH 0,4 N, 25mM EDTA pour 15 µl de produit amplifié) pendant 10 minutes à température ambiante.

Cinquante µl d'ADN simple brin sont déposés à l'aide d'un dot-blotter (CERALABO®) sur une membrane de nylon puis lavés avec 100µl de tampon TE (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH=8).

La membrane est séchée à 80°C pendant 1 heure.

d- Marquage de chaque sonde oligonucléotidique avec la digoxigénine (dig-dd UTP, Boehringer®)

Le marquage a été effectué selon les recommandation du fabricant:

- Tampon TdT5x (terminal deoxynucléotidyl transférase): 8µl

- CoCl₂: 8µl.
- Digoxigenin-11-dd UTP: 2µl.
- TdT: 2µl.

2,5 µl de sonde oligonucléotidique à 20 µM sont ajoutés à 2,5 µl du mélange précédant.

Le marquage de la sonde se fait à 37°C pendant 30 minutes. La sonde ainsi marquée se conserve plusieurs mois à -20°C.

e- Préhybridation

Pour chaque sonde oligonucléotidique, une membrane de nylon sur laquelle sont déposés les produits dénaturés, est utilisée.

La membrane est incubée 1 heure à 65°C avec un tampon d'hybridation:

- 50mM Tris HCl pH8
- 3 M Tetramethylammonium chloride
- 2 mM EDTA
- 0,1% SDS
- 100µg/ ml Herring sperm DNA
- 5x Solution Denhardt

f- Hybridation

La sonde marquée est ajoutée dans le tube contenant la membrane de nylon et le tampon d'hybridation. La température d'hybridation dépend de la longueur de la sonde et de sa composition. Les sondes CL1, CL2, CL3, CL8 vont s'hybrider à 50°C pendant 12 heures.

Les sondes CL4, CL9 et CL10 vont s'hybrider à 60°C pendant 12 heures.

Tableau 6: Allèles HLA-B identifiés par PCR-SSO

	Exon 2								Exon 3		
	Amorce 5'B27	Amorce E 90 As	CL 1	CL 2	CL 3	CL 4	CL 9	CL 10	Amorce E 91 Bs	Amorce E181As	CL 8
2701	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
2702	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
2703	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
2704	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
2705	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
2706	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
2707	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2708	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
2709											
3505									+	+	-
4001	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4002	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
4003	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
4004	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	
4005	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
0702									+	-	
0703									+	-	
0801									+	-	
4201									+	+	+
4501	+	+	-	-	-	-	+	-			
4801									+	-	
4901	+	+	-	-	-	-	-	-			
5001	+	+	-	-	-	-	+	-			
3903									+	+	-
4101	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
4701	+	+	-	-	-	-	-	+			
4401	+	+	-	-	-	-	-	-			
4402	+	+	-	-	-	-	-	-			
4403	+	+	-	-	-	-	-	-			

g- Lavages

Les membranes sont lavées 2 fois dans un tampon SSC 2X (0,3 M NaCl-30mM Citrate de Sodium) 0,1% SDS, 10 minutes à température ambiante, puis un lavage dans 100ml d'une solution de Tetramethylammonium chloride (TMAC) 3M, EDTA 2mM, Tris HCl, pH=8 50mM, SDS 0,1% est effectué pendant 30 minutes à 68°C pour CL1, CL2, CL8, CL9, CL10 et à 59°C pour CL3.

h- Révélation par chémoluminescence

Après un bref rinçage des membranes dans un tampon 1 (NaCl 150mM, Acide maléique 100mM, pH=7,5), les membranes sont incubées 30 minutes à température ambiante dans un tampon 2 (NaCl 150mM, Acide maléique 100mM, pH=7,5), contenant 1% d'agent bloquant (Boehringer®).

Puis, chaque membrane est incubée avec 20 ml d'un anticorps antidigoxigénine couplé à la phosphatase alcaline, diluée à 75mU/ ml dans le tampon 2, pendant 30 minutes.

L'excès d'anticorps conjugué est éliminé par 2 lavages de 15 minutes à température ambiante en tampon 1.

Après un bref rinçage dans un tampon 3 (100mM Tris-HCl pH=9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂), chaque membrane est introduite dans un sac plastic contenant 2 ml de CSPD® 25mM dilué au 1/100^{ème} dans le tampon 3. Après avoir incubé 10 minutes à 37°C, les membranes sont légèrement essuyées, puis exposées 15 minutes à 1 heure avec un film d'autoradiographie.

i- Résultats

Chaque sonde oligonucléotidique est validée par des ADN de référence dont le sous-type HLA-B27 est connu. Ces ADN servent de témoins positifs et négatifs à chaque réaction d'hybridation.

2.3- Analyse statistique

L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel Lotus 1-2-3 et du logiciel Microsoft-Excel.

Les comparaisons de résultats ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS.

VII

RESULTATS

1- TYPAGE HLA-B27 PAR TECHNIQUE DE PCR-SSP.

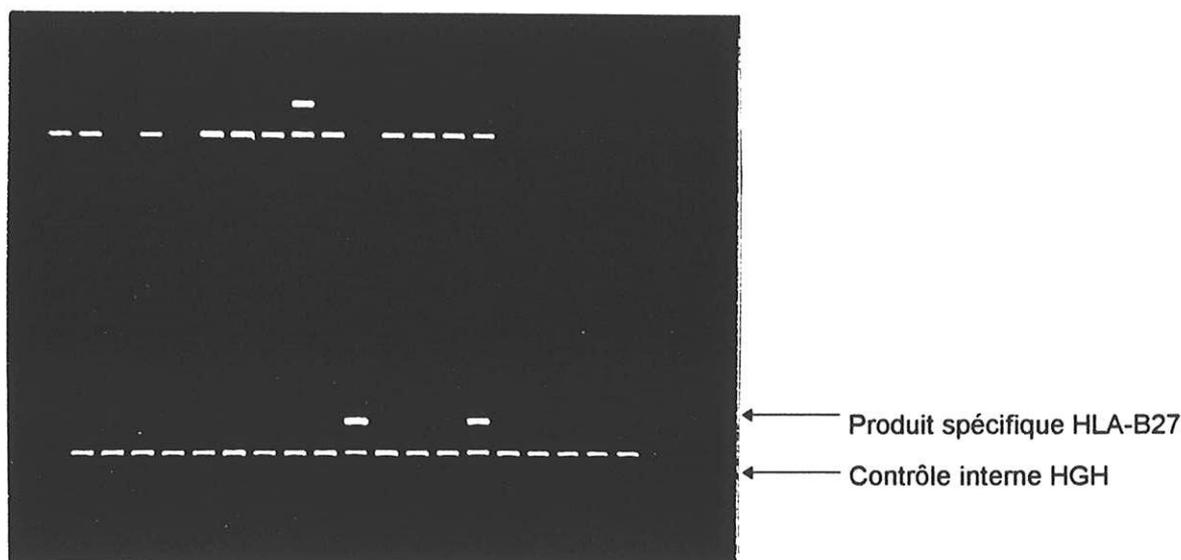
1.1- Validation de la technique.

Cette technique dérivée d'un protocole décrit par OLERUP, a été adaptée et validée au laboratoire pour cette étude.

Elle a été mise au point à partir de sujets témoins pour lesquels un phénotypage complet HLA avait été déterminé par lymphocytotoxicité. Après avoir défini les conditions optimales d'amplification, cette technique de PCR-SSP a été validée sur une population de 116 individus dont le phénotypage HLA était connu par lymphocytotoxicité, sur 6 lignées lymphoblastoïdes de référence cultivées au laboratoire et sur 8 ADN de références fournis par le Docteur LOPEZ-LARREA (Madrid, Espagne).

Figure 15

Résultat d'une PCR-SSP HLA-B27.



Parmi les 116 individus, 27 étaient HLA-B27+ et 89 étaient HLA-B27-. Sur les 6 lignées lymphoblastoïdes, 3 étaient HLA-B27+ et 3 étaient HLA-B27-. Les ADN de référence étaient tous HLA-B27+ mais chacun possédait un sous-type différent (B*2701 à B*2708).

Au total, 38 ADN HLA-B27+ ont été testés et tous ont été amplifiés par cette technique de PCR-SSP. Sur les 92 ADN HLA-B27- testés, aucun faux positif n'a été observé.

1.2- Résultats du typage HLA-B27 dans la population de patients (Tableau 7)

Tableau 7
Typage HLA-B27

	Effectif total	Nombre de B27+	Nombre de B27-	% de B27+
Patients tous services	296	38	258	12,8
Patients de Rhumatologie	88	15	73	17

2- LA CYTOMETRIE EN FLUX (CMF).

La recherche de l'antigène HLA-B27 a été réalisée sur un échantillon de 304 patients. Pour chacun de ces patients, les résultats du typage HLA-B27 par PCR-SSP ont servi de référence pour l'analyse des résultats de la CMF.

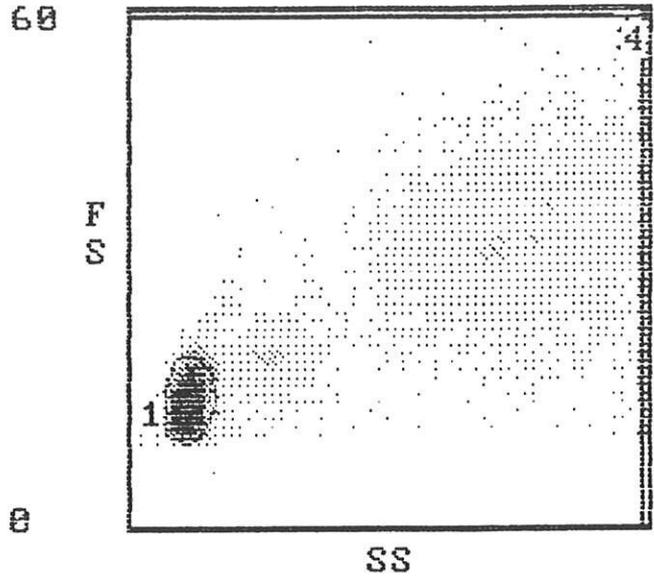
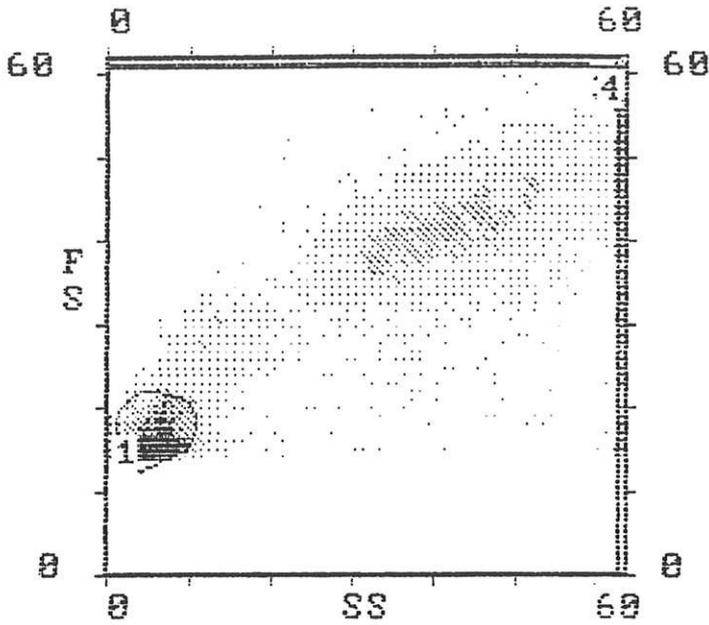
2.1- Répartition des moyennes de fluorescence.

Trois anticorps monoclonaux anti-HLA-B27 ont été testés. L'analyse du signal de fluorescence était réalisée sur la population lymphocytaire, sélectionnée sur le cytogramme de répartition des cellules en fonction de leur taille (FSC) et de leur structure (SSC). Le cytogramme est interprétable seulement lorsque les érythrocytes sont lysés (Figure 16).

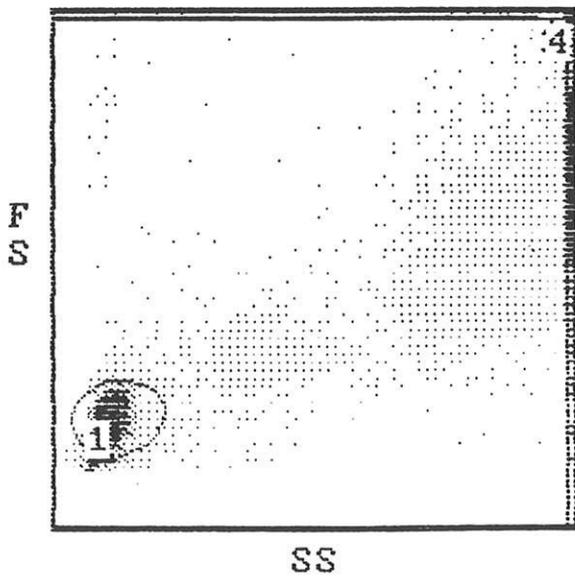
Figure 16
Cytogrammes

a: Lyse « Q PREP »

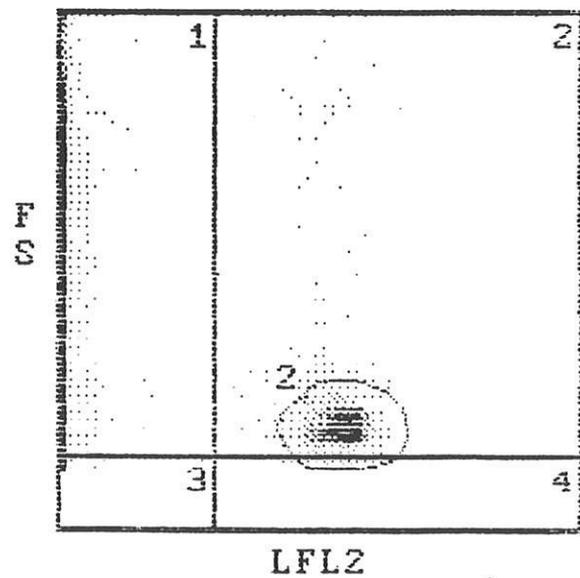
b: Lyse NH₄Cl



c: Lyse BECTON-DICKINSON®



Population lymphocytaire totale



Population lymphocytaire CD3

2.1.1- Anticorps monoclonal ONE LAMBDA®(Clone FD705-9E1E10).

L'anticorps ONE LAMBDA a été utilisé à la concentration de 1µl pour 100 µl de sang total. Celle-ci avait été conseillée par le fournisseur et des essais avec 1 µl et 2 µl lors de la mise au point n'avait pas retrouvé de différence significative entre les moyennes de fluorescence

Après marquage des cellules du sang périphérique, les globules rouges étaient lysés par technique « Q Prep » (COULTER®). Sur les 304 échantillons marqués, 288 ont pu être analysés en CMF, 16 ont été éliminés en raison d'un cytogramme ininterprétable. Parmi ces 288 patients, 35 étaient HLA-B27 + et 253 HLA-B27- en PCR-SSP. Les résultats obtenus en CMF sont reportés sur la figure 17. Les moyennes de fluorescence de la population lymphocytaire ont été analysé et les valeurs sont reportées dans le tableau 8.

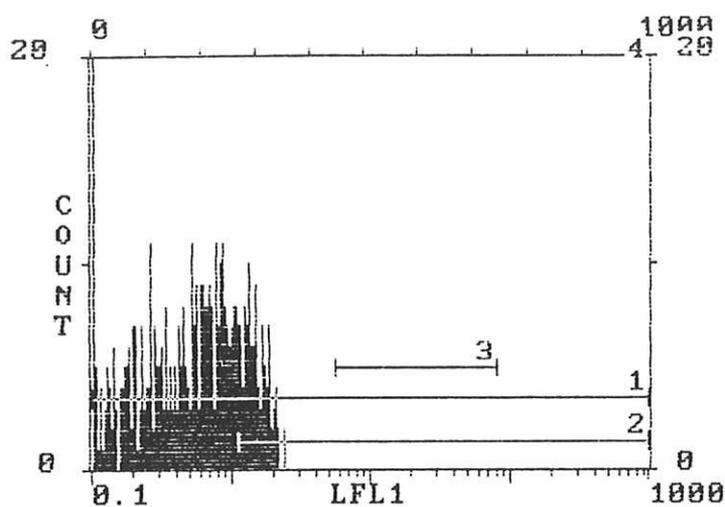
Tableau 8

Moyennes de fluorescence de l'anticorps ONE LAMBDA®.

ONE LAMBDA®.	Nombre	Moyenne LFL1	Minimum	Maximum
Total	288	0,728	0,22	10,22
B27+	35	3,214 [+/-2,414]	0,415	10,22
B27-	253	0,383 [+/-0,065]	0,22	0,669

Figure 17
 Résultats de la CMF. Ac ONE LAMBDA®

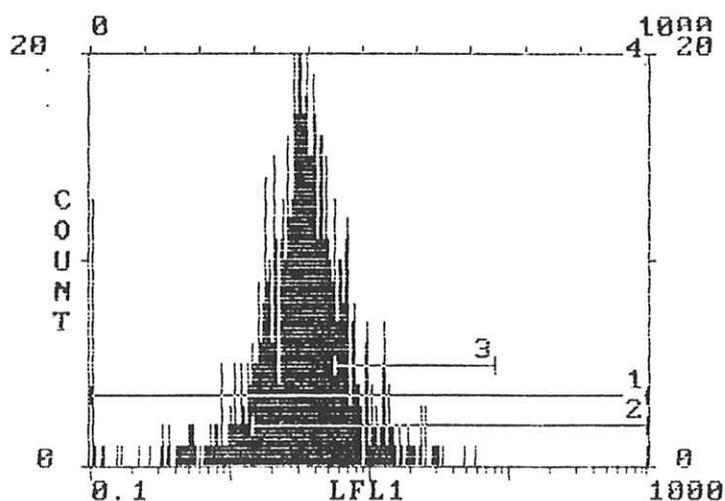
a: Echantillon HLA-B27 négatif



Histogram 4

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	PK CNT	PK POS	MEDIAN	MEAN	SD	%PCV	%PPCV
1	0.102	1023.	3000	100.0	798	0.107	0.237	0.298	0.320	0.53	107.3
2	1.141	1023.	423	14.1	14	1.161	1.464	1.529	0.324	1.15	21.2
3	5.863	85.46	0	0.0							
4	987.8	1023.	0	0.0							

b: Echantillon HLA-B27 positif



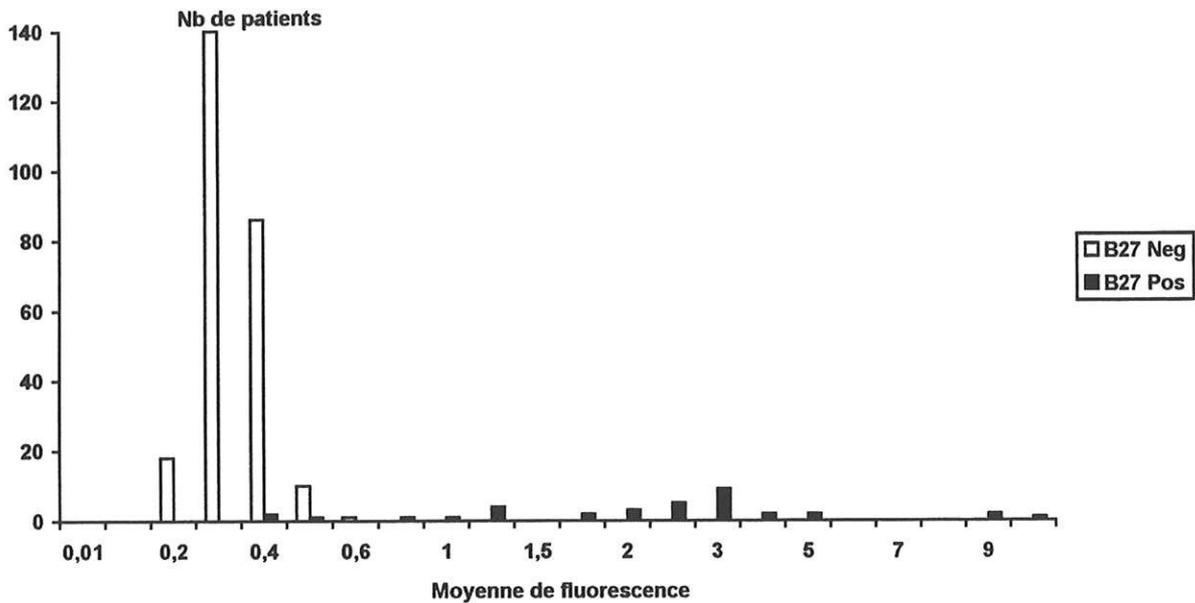
Histogram 4

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	PK CNT	PK POS	MEDIAN	MEAN	SD	%PCV	%PPCV
1	0.102	1023.	3000	100.0	39	0.107	3.400	3.213	3.314	0.57	103.1
2	1.494	1023.	2588	86.3	30	3.387	3.905	4.256	2.814	1.36	66.1
3	5.863	85.46	646	21.5	16	7.610	8.166	9.925	5.039	0.64	50.8
4	987.8	1023.	1	0.0	1	1015.					

Une représentation graphique des moyennes de fluorescence obtenues dans la population HLA-B27+ et HLA-B27- (figure 18), montre qu'il existe une zone de chevauchement entre les cellules HLA-B27+ et HLA-B27-.

Figure 18

Répartition des moyennes de fluorescence (Ac ONE LAMBDA).



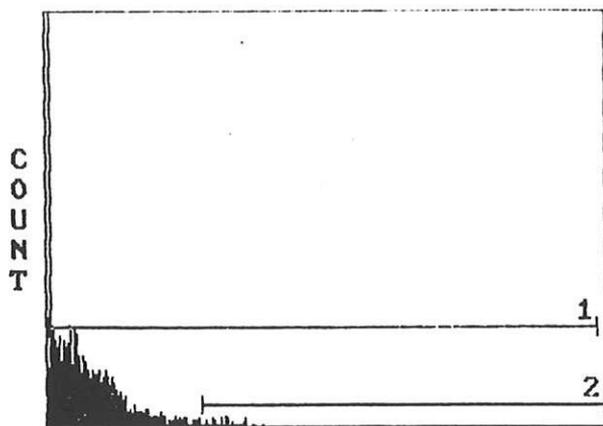
2-1-2 Anticorps monoclonal Becton Dickinson® (Clone GS 145.2).

L'utilisation de cet anticorps monoclonal a permis un double marquage des cellules (Ag HLA-B27 et Ag CD3). Les globules rouges étaient lysés par la solution de Lyse Becton Dickinson®. Sur 304 échantillons marqués, 292 ont pu être analysés en CMF, 12 ont été éliminés en raison d'un cytogramme ininterprétable. Parmi ces 292 patients, 36 étaient HLA-B27+ et 256 HLA-B27- en PCR-SSP. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 19.

Figure 19

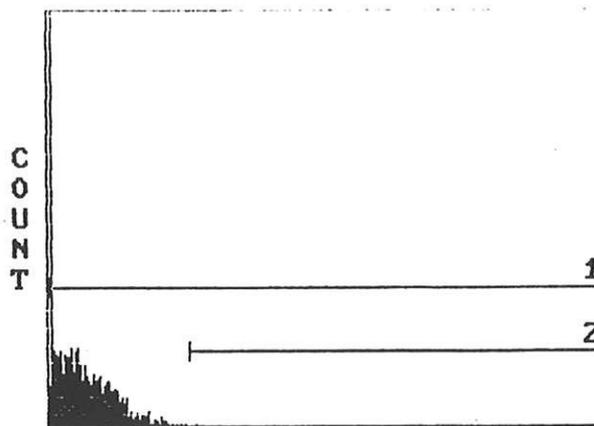
Résultats de la CMF. Ac BECTON-DICKINSON®

a: Echantillon HLA-B27 négatif



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%PCV
1	0.102	918.4	3000	100.0	0.180	0.131	1.62
2	1.271	1023.	103	3.4	2.033	0.633	3.67

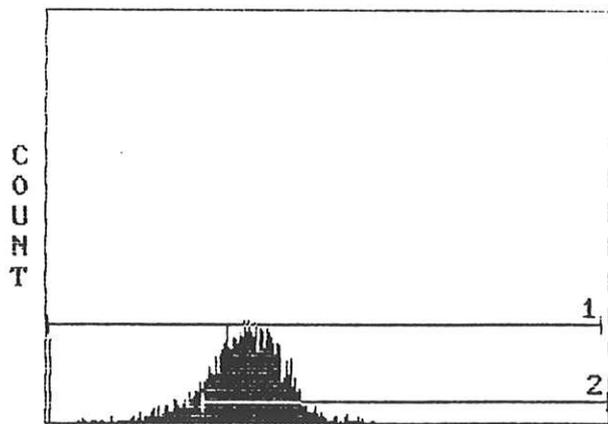
Analyse sur la population lymphocytaire totale



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%PCV
1	0.102	1023.	2007	100.0	0.165	0.080	1.65
2	1.024	1023.	5	0.2	1.217	0.226	2.29

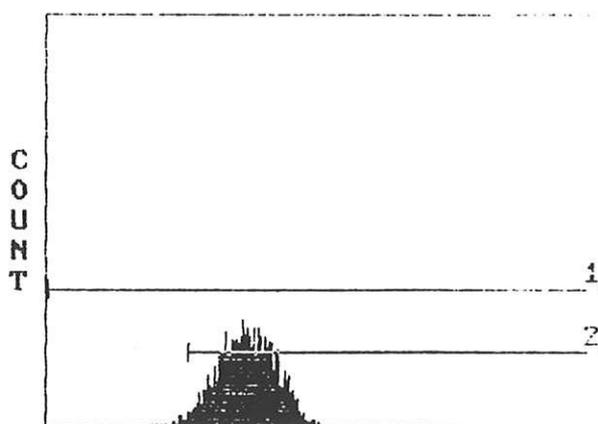
Analyse sur la population lymphocytaire CD3

b: Echantillon HLA-B27 positif



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%PCV
1	0.102	918.4	2999	100.0	2.300	1.988	44.1
2	1.271	1023.	2509	83.7	3.024	1.563	44.1

Analyse sur la population lymphocytaire totale



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%PCV
1	0.102	1023.	2452	100.0	2.671	1.302	43.6
2	1.024	1023.	2397	97.8	2.746	1.247	43.6

Analyse sur la population lymphocytaire CD3

Une première analyse des moyennes de fluorescence a été réalisé sur la population lymphocytaire totale (Tableau 9), puis une seconde sur la population lymphocytaire T CD3 (Tableau 10).

Tableau 9

Moyennes de fluorescence de l'Ac Becton Dickinson® sur les lymphocytes totaux.

Becton Dickinson Lymphocytes totaux®	Nombre	Moyenne LFL1	Minimum	Maximum
Total	292	0,482	0,107	6,732
B27+	36	2,178 [±-1,089]	1,345	6,732
B27-	256	0,244 [±-0,194°	0,107	1,411

Tableau 10

Moyennes de fuorescences de l'anticorps Becton Dickinson® sur les lymphocytes CD3

Becton Dickinson Lymphocytes CD3	Nombre	Moyenne LFL1	Minimum	Maximum
Total	292	0,631	0,11	8,278
B27+	36	2,976 [±-1,197]	1,717	8,278
B27-	256	0,302 [±-0,284]	0,11	1,849

Une représentation graphique des moyennes de fluorescence obtenues dans la population HLA-B27+ et HLA-B27- (figures 20 et 21) montre qu'il existe une zone de chevauchement entre les cellules HLA-B27+ et HLA-B27- lorsque

l'analyse est effectuée sur les lymphocytes totaux. En revanche, les limites sont plus nettes lorsque l'analyse est effectuée sur les lymphocytes CD3.

Figure 20

Répartition des moyennes de fluorescence (Ac BD total).

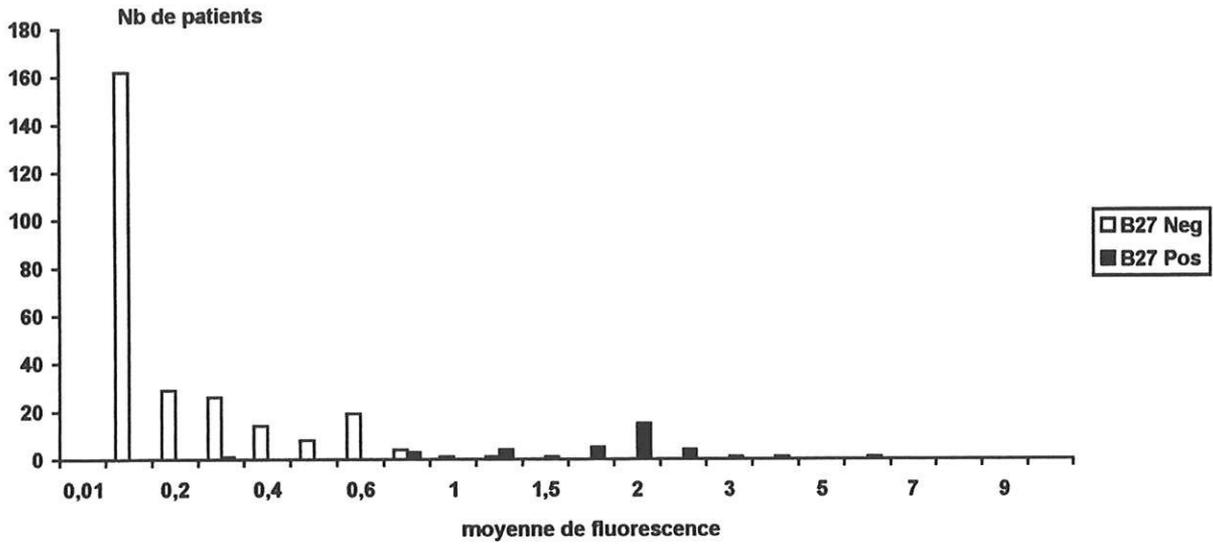
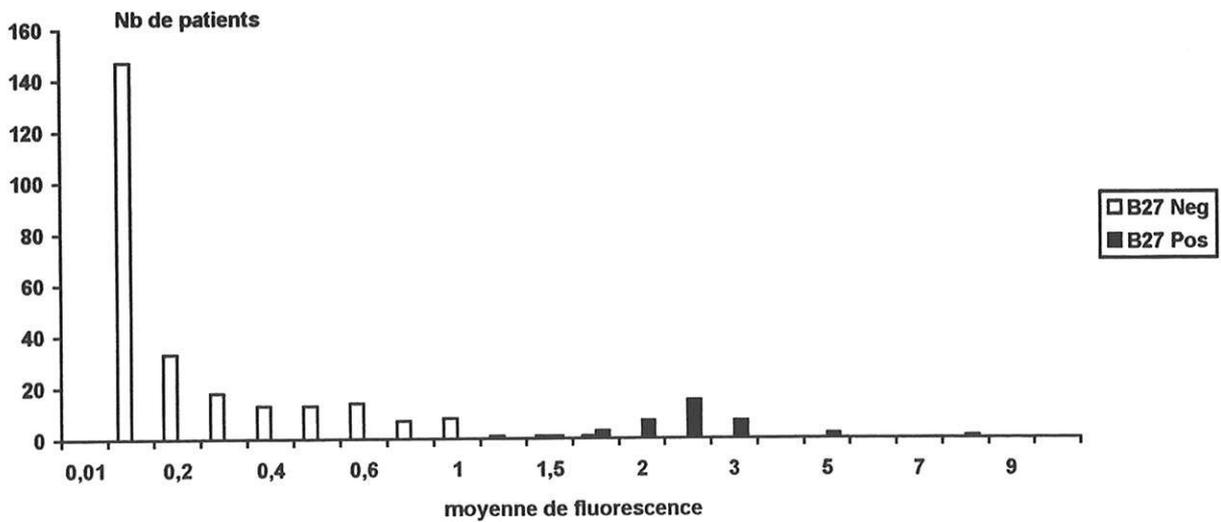


Figure 21

Répartition des moyennes de fluorescence (Ac BD CD3).



2.1.3- Anticorps monoclonal IMMUNOTECH® (Clone HLA-ABC-m3).

Cet anticorps anti-HLA-B27 couplé à la FITC est associé à un anticorps anti-HLA-B7 couplé à la PE. Les érythrocytes ont été lysés par le chlorure d'ammonium. Sur 304 échantillons marqués 290 ont pu être analysés en CMF, 14 ont été éliminés en raison d'un cytogramme ininterprétable. Parmi ces 290 patients, 36 étaient HLA-B27+ et 254 HLA-B27- en PCR-SSP. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 22. Les moyennes de fluorescence de la population lymphocytaire ont été analysées et les valeurs sont reportées dans le tableau 11.

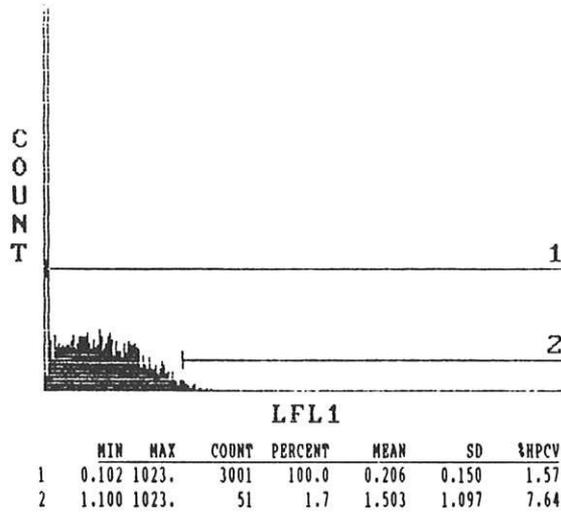
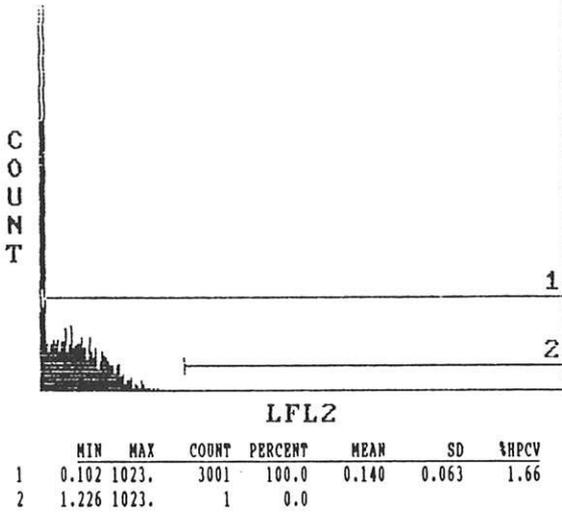
Tableau 11

Moyennes de fluorescences de l'anticorps IMMUNOTECH®.

IMMUNOTECH®	Nombre	Moyenne LFL1	Minimum	Maximum
Total	290	1,334	0,127	27,46
B27+	36	7,301 [±5,005]	2,179	27,46
B27-	254	0,485 [±0,805]	0,127	9,36

Figure 22
 Résultats de la CMF. Ac IMMUNOTECH®

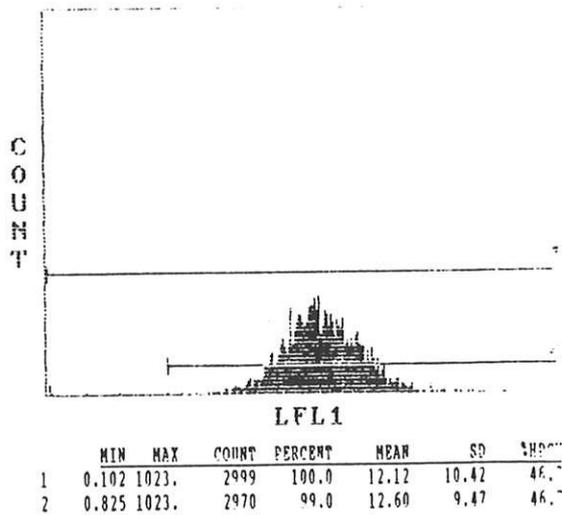
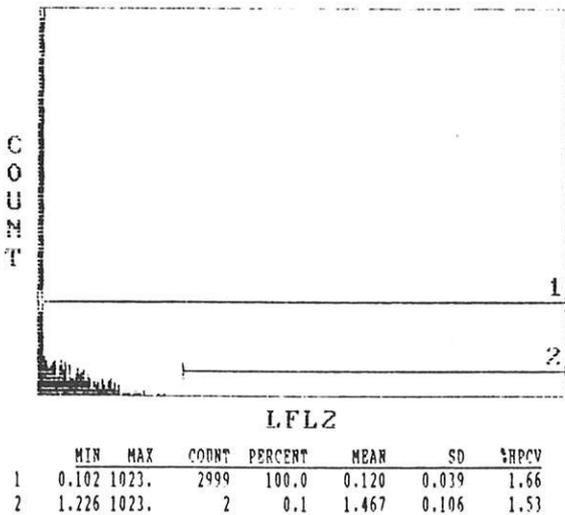
a: Echantillon HLA-B27 négatif



Analyse des lymphocytes
 marqués par l'Ac anti HLA-B7

Analyse des lymphocytes
 marqués par l'Ac anti HLA-B27

b: Echantillon HLA-B27 positif



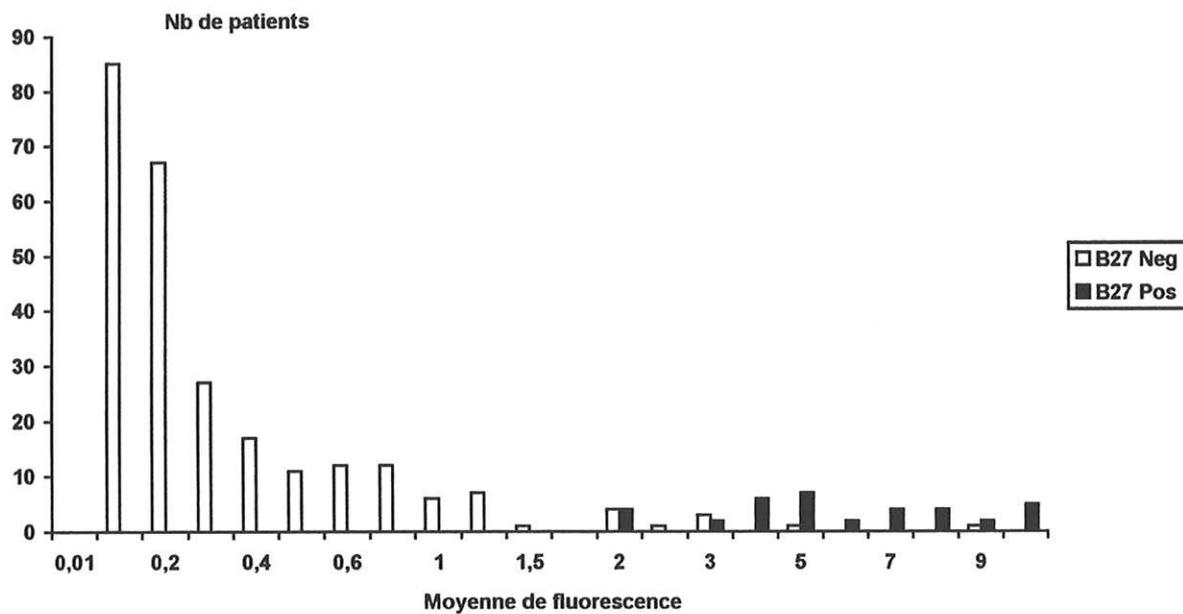
Analyse des lymphocytes
 marqués par l'Ac anti HLA-B7

Analyse des lymphocytes
 marqués par l'Ac anti HLA-B27

Une représentation graphique des moyennes de fluorescence obtenues dans la population HLA-B27+ et HLA-B27- (figure 23), montre qu'il existe une zone de chevauchement entre les cellules HLA-B27+ et HLA-B27-.

Figure 23

Répartition des moyennes de fluorescence (Ac IMMUNOTECH®).



2.2- Détermination du seuil de négativité.

Le phénotypage HLA-B27 en CMF est réalisé en première intention en raison de son coût modéré et de sa rapidité par rapport aux autres techniques. C'est un examen de dépistage qui ne doit comporter aucun faux négatif. Il n'est donc pas envisageable de déterminer ce seuil de négativité en fonction de la moyenne des moyennes de fluorescence des cellules analysées. Si tel était le cas, on placerait ce seuil par rapport à un intervalle statistique calculé qui serait un intervalle de confiance de 95%.

Dans le cas présent, il est nécessaire de déterminer ce seuil de négativité en tenant compte de la valeur minimale de fluorescence obtenue dans l'échantillon de sujets HLA-B27 positifs. Les seuils ainsi définis sont reportés dans le tableau 12. Pour ces valeurs, la sensibilité du test est de 100% si on considère que la population étudiée est représentative de la population de patients en général.

Tableau 12
Seuils de négativité et valeur prédictive négative (VPN).

ANTICORPS	SEUIL DE NEGATIVITE	VPN
ONE LAMBDA [®]	0,4	0,613
BECTON DICKINSON [®]	0,3	0,746
Lymphocytes totaux		
BECTON DICKINSON [®]	1,7	0,992
Lymphocytes CD3		
IMMUNOTECH [®]	2,1	0,96

- L'anticorps ONE LAMBDA[®] permet d'identifier 155 sujets HLA-B27- sur 253, soit 61,3%.

- L'anticorps Becton Dickinson[®] avec analyse de la population lymphocytaire totale permet d'identifier 191 sujets HLA-B27- sur 256, soit 74,6%. Lors de l'analyse des cellules CD3, il permet l'identification de 254 sujets HLA-B27- sur 256, soit 99,2%.

- L'anticorps IMMUNOTECH[®] permet d'identifier 244 sujets HLA-B27- sur 254, soit 96%.

2.3- Détermination du seuil de positivité.

Les patients présentant une moyenne de fluorescence de leurs cellules supérieure au seuil de négativité ne sont pas tous HLA-B27+. Le seuil de positivité est défini pour chaque anticorps de façon à n'avoir aucun faux positif. Ce seuil correspond alors à la valeur maximale de fluorescence obtenue dans l'échantillon de sujets HLA-B27-. Les seuils ainsi définis sont reportés dans le tableau 13. Pour ces valeurs, la spécificité du test est de 100% si on considère que la population étudiée est représentative de la population de patients en général.

Tableau 13
Seuil de positivité et valeur prédictive positive (VPP).

ANTICORPS	SEUIL DE POSITIVITE.	VPP
ONE LAMBDA®	0,7	0,91
BECTON DICKINSON® Lymphocytes totaux	1,5	0,778
BECTON DICKINSON® Lymphocytes CD3	1,9	0,97
IMMUNOTECH®	9,4	0,194

•L'anticorps ONE LAMBDA® permet d'identifier 32 sujets HLA-B27+ sur 35, soit 91%.

•L'anticorps Becton Dickinson® avec analyse de la population lymphocytaire totale permet d'identifier 28 sujets HLA-B27+ sur 36, soit 77,8% Lors de l'analyse des cellules CD3, il permet l'identification de 35 sujets HLA-B27+ sur 36, soit 97%.

•L'anticorps IMMUNOTECH® permet d'identifier 7 sujets HLA-B27+ sur 35, soit 19,4%.

2.4- Etude de la population indéterminée

Pour chaque anticorps, il existe une population de patients présentant des moyennes de fluorescence situées entre les seuils de négativité et de positivité, et dont le phénotypage HLA-B27 par CMF est indéterminé. Il est donc nécessaire de les contrôler par une autre technique. Les résultats douteux obtenus pour chaque anticorps sont répertoriés dans le tableau 14.

Tableau 14
Population indéterminée.

	Effectif total	Nombre de douteux en CMF	% à contrôler
Ac ONE LAMBDA®	288	101	35
B27+ en PCR-SSP	35	3	1
B27- en PCR-SSP	253	98	34
Ac Becton Dickinson Lymphocytes totaux	292	73	25
B27+ en PCR-SSP	36	8	2,7
B27- en PCR-SSP	256	65	22,3
Ac Becton Dickinson Lymphocytes CD3	292	3	1
B27+ en PCR-SSP	36	1	0,3
B27- en PCR-SSP	256	2	0,7
Ac IMMUNOTECH®	290	39	13,4
B27+ en PCR-SSP	36	29	10
B27- en PCR-SSP	254	10	3,4

2.5- Résultats du phénotypage HLA-B7

L'utilisation du réactif IMMUNOTECH® a permis un phénotypage HLA-B7 en cytométrie. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 24. Ils ont été analysés pour 89 patients dont le phénotypage HLA-B était déterminé par microlymphocytotoxicité. Parmi ces 89 échantillons, 20 étaient HLA-B7+ et 69 étaient HLA-B7-.

Les moyennes de fluorescence des cellules marquées par l'anticorps anti HLA-B7 ont été analysées et les valeurs sont reportées dans le tableau 15.

Tableau15
Moyennes de fluorescence.

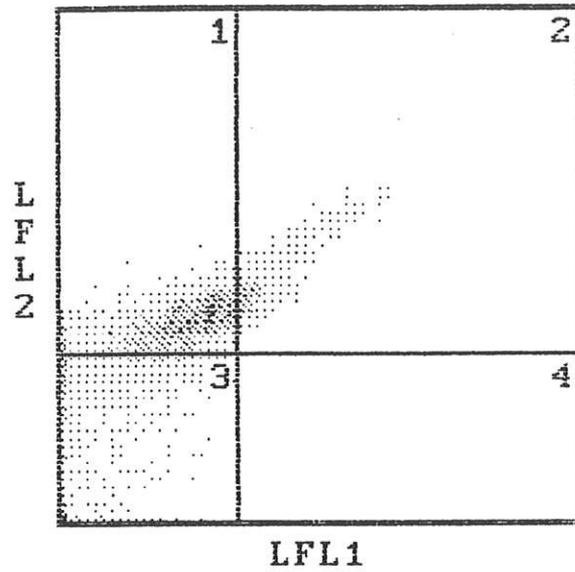
Ac antiHLA-B7 IMMUNOTECH®	Effectif	Moyenne LFL2	Minimum	Maximum
Total	89	0,75	0,114	5,749
HLA-B7+	20	2,447 [±1,726]	1,128	5,749
HLA-B7-	69	0,15 [±0,046]	0,114	0,293

Les populations HLA-B7+ et HLA-B7- sont bien définies par cet anticorps. Le seuil de positivité a été placé de façon à n'avoir aucun faux positif. Il correspond à la valeur minimale de fluorescence obtenue dans l'échantillon HLA-B7+, soit 1,2. Sur ces 20 patients HLA-B7, un seul était dans la zone douteuse lors de l'analyse des moyennes de fluorescence des cellules marquées par l'anticorps anti HLA-B27 IMMUNOTECH®. Ce patient douteux pour l'Ag HLA-B27 (moyenne de fluorescence des cellules LFL1= 3,337) était positif pour l'antigène HLA-B7 (moyenne de fluorescence des cellules LFL2= 2,213). Malgré l'identification de l'Ag HLA-B7, on ne peut exclure l'Ag HLA-B27 par le seul test de CMF.

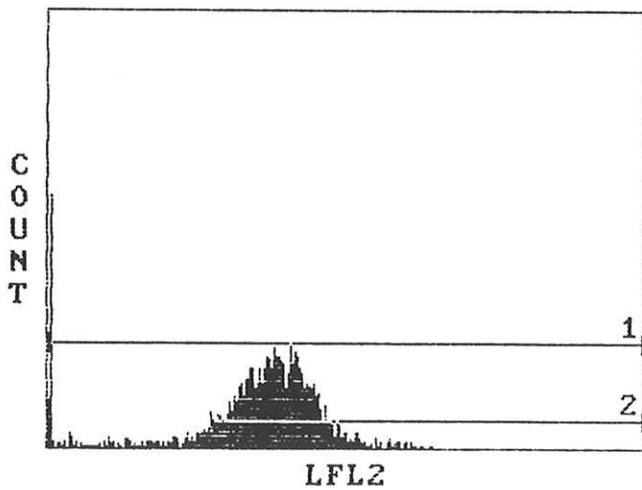
Figure 24

Résultats de la CMF. Ac IMMUNOTECH®

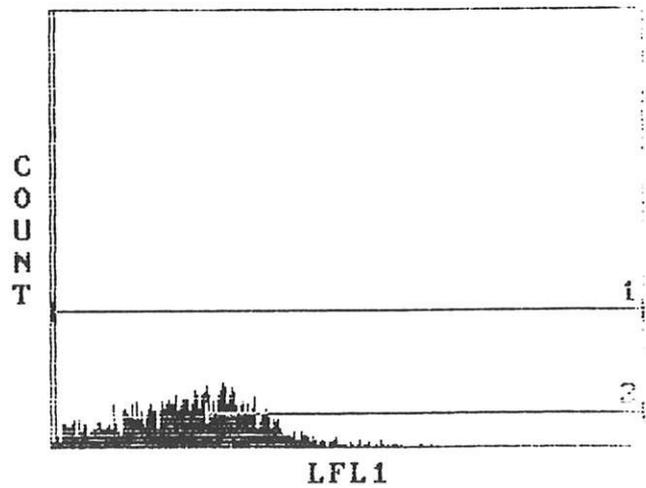
Répartition des cellules en fonction de la fluorescence LFL1 (Ac anti HLA-B27/ FITC) et de la fluorescence LFL2 (Ac anti HLA-B7/ PE)



Répartition des cellules en fonction de l'intensité de fluorescence



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%PCV
1	0.102	1023.	3000	100.0	2.303	2.998	1.73
2	1.226	1023.	2457	81.9	3.717	2.307	47.6



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	%PCV
1	0.102	1023.	3000	100.0	0.680	0.901	1.55
2	1.100	1023.	1156	38.5	2.369	1.604	19.8

2.6- Résultats du phénotypage des lignées

lymphoblastoïdes

Cinq lignées cultivées au laboratoire ont été testé en CMF. Chaque lignée a été marqué à 2 ou 3 reprises (Tableaux 16/17/18)

Tableau 16

Moyennes de fluorescence des lignées lymphoblastoïdes.

Anticorps ONE LAMBDA[®]

Lignées	Phénotype	Moyenne n°1	Moyenne n°2	Moyenne n°3
TS1	B*2705-B8	17,970	7,270	
PAR	B*2706-B48	2,920	2,143	4,287
WEWAKI	B*2704-B62	3,914	4,182	5,079
TO	B13-B51	0,203	0,210	0,472
SNA-BLL	B7-B78	0,110	0,121	0,200

Tableau 17
Moyennes de fluorescence des lignées lymphoblastoïdes.
Anticorps BECTON-DICKINSON®

Lignées	Phénotype	Moyenne n°1	Moyenne n°2	Moyenne n°3
TS1	B*2705-B8	8,840	12,070	
PAR	B*2706-B48	4,311	7,671	
WEWAKI	B*2704-B62	7,021	6,414	8,060
TO	B13-B51	0,418	0,199	0,299
SNA-BLL	B7-B78	1,037	0,909	2,329

Tableau 18
Moyennes de fluorescence des lignées lymphoblastoïdes.
Anticorps IMMUNOTECH®

Lignées	Phénotype	Moyenne n°1	Moyenne n°2	Moyenne n°3
TS1	B*2705-B8	5,546	6,040	
PAR	B*2706-B48	0,921	1,635	
WEWAKI	B*2704-B62	6,085	7,911	5,100
TO	B13-B51	0,179	0,168	0,212
SNA-BLL	B7-B78	1,258	0,274	0,671

Les lignées lymphoblastoïdes de référence ont permis une évaluation des anticorps en fonction des sous-types HLA-B27. Tous réagissent avec les sous-types B*2705 et B*2704. En revanche, nous avons observé une faible réactivité de l'anticorps IMMUNOTECH[®] contre le sous-type B*2706.

Aucun de ces anticorps ne semble avoir de réactions croisées avec l'antigène HLA-B13. Lors du marquage par les anticorps BECTON DICKINSON[®] et IMMUNOTECH[®] nous avons observé une réactivité croisée avec l'antigène B7.

Il existe une variation des intensités de fluorescence dans le temps, probablement liée au renouvellement des molécules HLA à la surface des cellules.

2.7- Réactions croisées avec les Ag du CREG-B7

Pour chaque anticorps testé, la recherche de réactions croisées a été faite pour l'ensemble des antigènes du CREG-B7. Nous avons comparé la fréquence de l'antigène dans la population indéterminée et dans la population négative en CMF avec un test du χ_2 (Tableau 19).

Nous n'avons observé aucune réaction croisée de l'anticorps ONE LAMBDA avec les antigènes du CREG-B7.

L'anticorps BECTON-DICKINSON avec analyse sur les lymphocytes totaux présente une réaction croisée avec l'antigène B7. Les résultats obtenus lors de l'analyse de la population CD3 ne permettent pas une recherche de réactions croisées puisque seulement 3 échantillons sont indéterminés et aucun des 3 n'est phénotypé.

L'analyse des phénotypes indéterminés lors du marquage par l'anticorps IMMUNOTECH[®] ne retrouve pas de réactions croisées avec les antigènes du CREG-B7, mais sur 7 échantillons indéterminés, phénotypés, 5 étaient HLA-B27[⊕].

Tableau 19
Réactions croisées avec les antigènes du CREG-B7.

	B7	B40	B13	B22	B27
ONE LAMBDA	p=0,75	p=0,51	p=0,12	p=0,12	
pop. indéterminée phénotypée=43	11	1	3	3	3
pop négative phénotypée=44	10	2	1	0	0
BECTON DICKINSON λ. TOTAUX	p<0,001			p=0,26	
pop indéterminée phénotypée=30	19	0	0	2	8
pop négative phénotypée=59	2	4	4	1	0
IMMUNOTECH	p=0,49				
pop indéterminée phénotypée=7	1	0	0	0	5
pop négative phénotypée=80	19	4	3	3	0

L'existence d'une réaction croisée avec l'antigène HLA-B7 a été analysée en fonction des moyennes de fluorescence (Tableau 20). Pour cela nous avons comparé avec le test t de Student sur échantillons indépendants, les moyennes de fluorescence observées dans les populations B7-/B27- et B7+/B27-.

Pour l'anticorps ONE LAMBDA[®], il n'y a pas de différence significative entre la moyenne de fluorescence des cellules HLA-B27-/B7+ et les cellules HLA-B27-/B7- ($p=0,88$).

Pour l'anticorps BECTON DICKINSON[®] avec analyse des lymphocytes totaux et des cellules CD3, les cellules B27-/B7+ et les cellules B27-/B7- présentent une différence significative de leur moyenne de fluorescence ($p<0,001$).

Pour l'anticorps IMMUNOTECH[®], il existe une différence significative entre les moyennes de fluorescence des cellules B27-/B7+ et les cellules B27-/B7- ($p<0,001$).

Ces différences significatives de fluorescence sont dues à une réaction croisée des Ac anti HLA-B27 avec l'antigène HLA-B7.

Tableau 20
Moyenne de fluorescence pour chaque anticorps anti HLA-B27 en
fonction de la molécule HLA-B7.

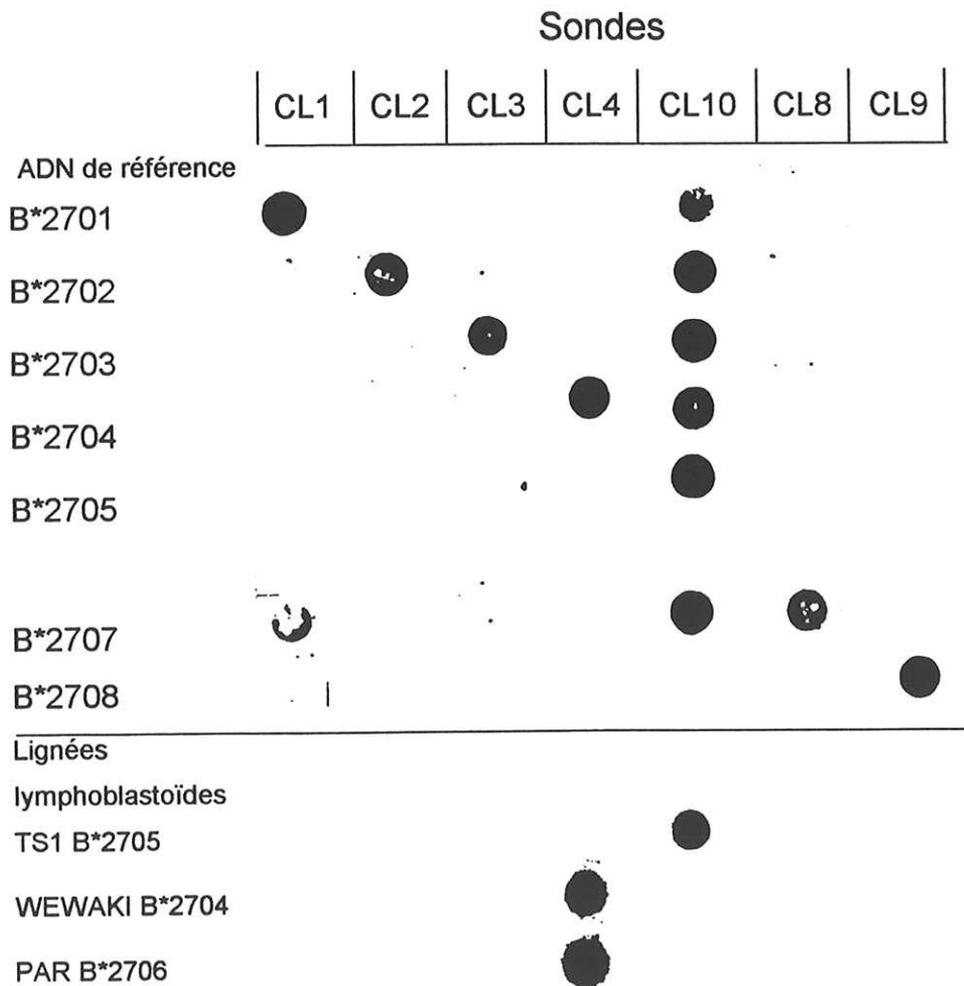
	Moyenne	Minimum	Maximum	Nbr Phénotype B7
ONE LAMBDA	0,708	0,220	9,811	89
B27-/B7-	0,387 [±0,062]	0,220	0,562	63
B27-/B7+	0,399 [±0,088]	0,307	0,559	20
B27+/B7-	3,650 [±2,260]	0,425	9,811	6
BECSON DICKINSON λ totaux	0,463	0,111	2,300	89
B27-/B7-	0,201 [±0,132]	0,111	0,639	63
B27-/B7+	0,493 [±0,174]	0,263	0,879	20
B27+/B7-	1,707 [±0,679]	0,930	2,300	6
BECSON DICKINSON CD3	0,640	0,114	2,989	89
B27-/B7-	0,235 [±0,182]	0,114	0,826	63
B27-/B7+	0,617 [±0,293]	0,303	1,487	20
B27+/B7-	2,700 [±0,464]	1,959	2,989	6
IMMUNOTECH	1,221	0,127	12,12	89
B27-/B7-	0,333 [±0,602]	0,127	5,466	63
B27-/B7+	1,164 [±0,768]	0,410	9,360	20
B27+/B7-	5,733 [±3,274]	2,236	12,12	6

3- RESULTATS DU SOUS-TYPAGE HLA-B27

Le sous-type HLA-B27 a été réalisé selon une technique de PCR-SSO dérivée d'un protocole de Lopez-Larrea (1995). Cette technique a été validée sur 8 ADN de référence fournis par le Docteur Lopez-Larrea et 3 lignées lymphoblastoïdes HLA-B27, dont le sous-type était connu.

Figure 25

Résultats du sous-typage HLA-B27 par PCR-SSO



Dans les conditions d'utilisation au cours de ce travail, les sondes CL1, CL2, CL3, CL4, CL8 et CL9 permettent une identification des sous-types B*2701, B*2702, B*2703, B*2704, B*2706, B*2707 et B*2708. En revanche, la sonde CL10 croise avec les sous-types B*2702 et B*2704. Néanmoins, nous avons pu identifier le sous-type B*2705 en procédant par élimination avec les résultats de l'hybridation CL2, CL3, CL4 et CL8.

Les patients HLA-B27 \oplus (N=39) et les témoins HLA-B27 \oplus (N=20) ont été sous-typés (Tableau.21).

Tableau 21

Sous-types HLA-B27 dans les populations patients et témoins.

	Patients	Témoins
Effectif total	39	20
B*2705	33	15
B*2702	2	1
B*2707	1	1
Indéterminés	3	3

Sur 59 individus testés, 6 n'ont pu être sous-typés:

- 3 cas par manque d'ADN
- 3 cas pouvant être liés à l'existence de réactions croisées avec les allèles HLA-B40, B41, B45, B47 et B50, ou avec de nouveaux allèles à déterminer. Mais, on ne peut exclure l'existence d'une contamination lors du dépôt des ADN sur les feuilles de Nylon.

La répartition des spécificités HLA-B27 des 53 individus sous-typés est comparable à la fréquence observée dans la population espagnole (LOPEZ DE CASTRO, 1989).

La répartition des différents allèles dans les groupes ethniques étudiés est reportée sur la figure 26.

Les moyennes de fluorescence obtenues dans la population de patients ont été analysé en fonction du sous-type HLA-B27 (Tableau 22).

Tableau 22
Moyennes de fluorescence en fonction des sous-types HLA-B27.

	Ac ONE LAMBDA	Ac BECTON DICKINSON λ totaux	Ac BECTON DICKINSON CD3	Ac IMMUNOTECH
B*2705	0,425 à 10,22	1,345 à 6,736	1,717 à 8,278	2,179 à 27,46
B*2702	0,415 et 0,771	1,882 et 2,116	2,632 et 5,619	8,925 et 4,846
B*2705+B*2707	5,385	6,736	8,278	20,86

Seulement 3 allèles sur 8 ont été trouvés dans la population de patients.

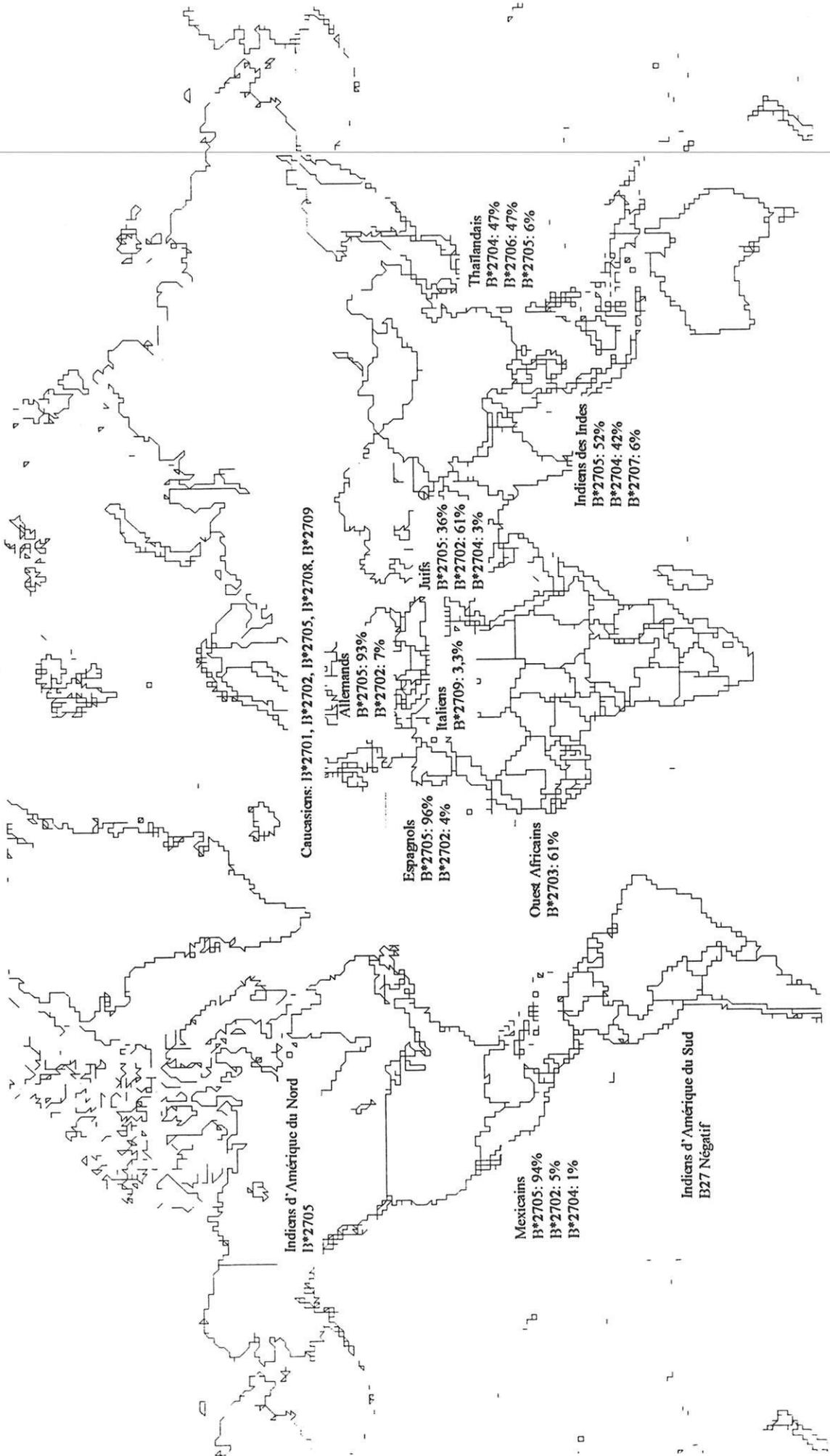
L'allèle HLA-B*2707 a été identifié chez un patient HLA-B27 hétérozygote B*2707 et B*2705.

L'allèle HLA-B*2702 a été identifié chez deux patients. Cet effectif est trop faible pour permettre une comparaison des moyennes de fluorescence.

L'allèle HLA-B*2705 a été identifié chez 33 patients. Les intervalles de moyennes de fluorescence pour cet allèle en fonction de l'anticorps testé sont les mêmes que les intervalles observés pour l'ensemble des allèles HLA-B27.

Ces résultats ne permettent pas la mise en évidence d'une influence de certains sous-types HLA-B27 sur l'expression de l'antigène HLA-B27 ou sur la reconnaissance d'épitopes différents par les anticorps monoclonaux.

Figure 26
Distribution géographique des allèles HLA-B27



4- DONNEES CLINIQUES

Sur les 304 patients ayant été inclus dans cette étude, 15 avaient des renseignements cliniques:

- Onze présentaient une SPA en poussée (5 HLA-B27 positifs et 6 HLA-B27 négatifs).
- Un présentait une SPA en rémission (HLA-B27 positif).
- Deux présentaient une poussée de rhumatisme psoriasique (1 HLA-B27 positif et un HLA-B27 négatif).
- Un présentait une arthrite de cheville (HLA-B27 négatif).

Trois patients ont eu un phénotypage HLA-B27 à 2 reprises. Tous étaient HLA-B27 négatifs et les 2 moyennes de fluorescence pour chaque anticorps étaient semblables.

VIII

DISCUSSION

1- INTERET DE LA PCR-SSP POUR LE PHENOTYPAGE

HLA-B27.

Cette technique a permis un phénotypage HLA-B27 de l'ensemble de nos populations. Les résultats obtenus (sensibilité=100% et spécificité=100%) nous ont permis de l'adopter comme technique de référence étant donné sa rapidité, son faible coût et l'absence de réactions douteuses par rapport à la lymphocytotoxicité.

2- INTERET DE LA CYTOMETRIE EN FLUX

Cette technique de CMF semble intéressante pour le dépistage du phénotypage HLA-B27 étant donné la rapidité d'analyse et son coût modéré pour les laboratoires disposant d'un cytomètre de flux. Cependant son interprétation est délicate et demande à être corrélée à une technique de référence pour chaque anticorps testé. Nous discuterons ci dessous les différents paramètres susceptibles d'influencer les résultats de la CMF.

2.1- Lyse des érythrocytes

Les différentes techniques de lyse utilisées étaient celles recommandées par les fournisseurs de chaque anticorps. Les résultats obtenus sont tous très satisfaisant pour la sélection des populations cellulaires à analyser sur le cytogramme.

Néanmoins, la lyse « Q Prep » (COULTER®) utilisée pour l'anticorps ONE LAMBDA® est une lyse automatisée, limitant les risques de contamination au cours des manipulations des cellules, et plus rapide que les lyses manuelles utilisées pour les anticorps IMMUNOTECH® et BECTON DICKINSON®.

2.2- Nombre de leucocytes et de lymphocytes dans le sang périphérique

Pour chaque échantillon de sang analysé en CMF, le nombre de globules blancs était compris entre 2600 et 40100 et le nombre de lymphocytes totaux était compris entre 230 et 30075. Malgré ces importantes variations du nombre de cellules marquées, il n'existe pas de corrélation entre l'intensité de fluorescence et le nombre de cellules marquées.

2-3- Concentration de l'anticorps

Chaque anticorps a été utilisé aux concentrations recommandées par le fabricant. Les moyennes des intensités de fluorescence observées pour chaque anticorps sont très variables.

L'anticorps ONE LAMBDA[®] n'est pas responsable de réactions croisées mais les moyennes de fluorescence observées sont situées dans des canaux faibles et les échantillons douteux sont nombreux (35%). Une étude réalisée par Ward et Coll. (1995), trouve des résultats meilleurs avec un pourcentage de sujets douteux de 0,4%. Les échantillons de sang étaient marqués avec une concentration en anticorps 2 fois plus importante que la notre et les globules rouges étaient lysés selon la technique « Q-PREP ». Pei et coll avaient déterminé sur un effectif global de 3 patients (1 HLA-B27 positif et 2 HLA-B27 négatif) une concentration optimale de 10 µg/ ml, soit 2 µl/ 100 µl de sang. Les concentrations testées étaient de 10, 20 et 50 µg/ ml.

Lors des mises au point préalables à cette étude, l'anticorps ONE LAMBDA[®] avait été testé aux concentrations de 10 µg/ ml et 5 µg/ ml sur une dizaine d'échantillons, mais aucune différence des intensités de fluorescence n'avait été observé. Une communication orale de Madame Gaspal aux journées de cytométrie de Limoges (AVRIL 1996) rapportait des résultats identiques à ceux observés au cours de ce travail. Cependant, elle obtenait de meilleurs résultats avec une lyse manuelle.

Ainsi, à la concentration utilisée pour cette étude et avec une lyse « Q-PREP », l'anticorps ONE LAMBDA[®] ne nous a pas donné de résultats satisfaisant pour le dépistage du phénotype HLA-B27.

2-4- Population de cellules analysées

L'expression des molécules HLA de classe I est variable en fonction du sous-type lymphocytaire. Ainsi les lymphocytes T expriment environ 100000 molécules HLA à leur surface, alors que les lymphocytes B en expriment environ 250000.

Les populations cellulaires analysées après marquage par les anticorps IMMUNOTECH[®] et ONE LAMBDA[®] sont la population lymphocytaire totale.

L'anticorps BECTON DICKINSON[®] permet la sélection d'une population de lymphocytes T. Il existe une bonne corrélation entre les variations de fluorescence obtenues sur les lymphocytes totaux et sur les lymphocytes T, mais l'intensité moyenne de fluorescence est significativement supérieure dans la population de cellules CD3 ($p < 0,001$ - test t de Student sur échantillons appariés). De plus le pourcentage d'échantillons indéterminés passe de 25% à 1%.

Ceci peut-être expliqué par la sélection d'une population homogène où les cellules analysées expriment toutes les molécules de classe I à un même niveau. La population lymphocytaire totale sélectionnée sur le cytogramme pourrait être contaminée par des monocytes et des débris cellulaires

Les meilleurs résultats en terme de valeur prédictive positive et négative sont ceux obtenus avec l'anticorps BECTON DICKINSON[®] lors de l'analyse des cellules CD3.

2-5- Reconnaissance d'épitopes différents

Les anticorps utilisés sont des anticorps monoclonaux donc ne reconnaissant qu'un seul épitope de la molécule HLA-B27.

L'anticorps ONE LAMBDA[®] semble reconnaître un épitope différent de ceux reconnus par les anticorps BECTON DICKINSON[®] et IMMUNOTECH[®]. Cet épitope présente l'avantage de ne pas avoir d'homologie avec les allèles du CREG-B7. En effet, aucune réaction croisée n'a été observée. Des résultats identiques ont été rapportés par Ward et Coll. (1995) et Orr et Coll. (1994).

L'anticorps BECTON DICKINSON[®] croise avec l'antigène B7. Hulstaert et Coll. (1994) ont observés cette même réaction croisée.

L'anticorps IMMUNOTECH[®] croise lui aussi avec l'antigène HLA-B7. Le travail réalisé par Reynolds et coll en 1994 trouvait également cette réaction croisée. Néanmoins les moyennes de fluorescence obtenues dans les populations HLA-B27- et HLA-B27+ se situent dans des canaux très différents. Ainsi, la valeur prédictive négative de cet anticorps est de 0,96. L'identification de l'antigène HLA-B7 Ne permet pas d'améliorer la valeur prédictive positive de cet anticorps. Au terme de cette étude la population de sujets indéterminés est de 13,5%.

Ces résultats sont très satisfaisants pour le dépistage du phénotype HLA-B27.

2-6- Les sous-types HLA-B27.

La fréquence des sous-types trouvés au cours de cette étude ne diffère pas de celle observée par Lopez de Castro (1989) dans la population espagnole. L'allèle HLA-B*2705 a été trouvé chez 91,6% des patients (33/36) et 88,2% des témoins (15/17).

L'allèle HLA-B*2702 a été trouvé chez 5,5% des patients (2/36) et 5,8% des témoins (1/17)

L'allèle HLA-B*2707 a été trouvé chez un patient et un témoin.

Sur les 7 patients HLA-B27+ présentant une SPA, 5 étaient HLA-B*2705 et 2 étaient HLA-B*2702.

Les résultats observés lors du phénotypage en CMF des patients, et ceux obtenus lors de l'analyse des lignées lymphoblastoïdes, nous laissent supposer une réactivité des 3 anticorps testés contre les sous-types B*2702, B*2704 et B*2705. En revanche, l'anticorps IMMUNOTECH[®] semble réagir faiblement avec

faiblement avec le sous-type HLA-B*2706 contrairement aux anticorps ONE LAMBDA[®] et BECTON DICKINSON[®].

Ces résultats, à l'exception de ceux observés pour le sous-type B*2705, nécessitent une confirmation sur un échantillon de patients représentant l'ensemble de ces sous-types.

Les sous-types HLA-B27 ne permettent pas d'expliquer les variations de fluorescence observées au cours de ce travail.

IX

CONCLUSION

Ce travail nous a permis de confirmer l'intérêt de la CMF pour l'identification du phénotype HLA-B27 en première intention en raison de sa rapidité et de son coût modéré pour les laboratoires disposant d'un cytomètre de flux. Toutefois, il persiste une zone douteuse et il est donc nécessaire d'avoir recours à une technique de référence pour les échantillons indéterminés.

Cette étude confirme l'avantage de la biologie moléculaire comme technique de référence car celle-ci est plus simple, plus rapide et plus spécifique que la sérologie.

Des améliorations pourraient être développées:

◇ La lyse des globules rouges selon la technique « Q Prep » est préférée par notre laboratoire mais elle n'est pas réalisable avec tous les anticorps commercialisés.

◇ Le marquage des cellules CD3 nous semble intéressant pour sélectionner une population homogène et analyser la fluorescence HLA-B27 sur cette population.

◇ Les seuils de négativité et de positivité définis au cours de ce travail ne sont valables que pour notre laboratoire et pour l'appareil utilisé. Ce problème de standardisation inter-laboratoire ou intra-laboratoire lors du changement de l'appareil ou du laser, pourrait être résolu par l'introduction de billes de calibration à chaque échantillon testé.

◇ La technique de référence validée par ce travail, nous pose le problème de savoir si l'identification de l'allèle HLA-B27 est suffisante ou s'il est nécessaire d'y associer un phénotypage des allèles du CREG B7 par biologie moléculaire pour conforter les résultats.

◇ La technique de PCR-SSO ayant permis le sous-typage HLA-B27 au cours de ce travail, pourrait être améliorée par l'utilisation de sondes plus spécifiques, et l'identification de l'allèle B*2709.

A l'issue de ce travail, la stratégie du laboratoire pour le phénotypage HLA-B27 a été modifiée en tenant compte des résultats obtenus et des contingences propres au laboratoire.

Le dépistage par CMF est effectué avec l'anticorps IMMUNOTECH® dérivé du clone HLA-ABC-m3, en respectant un seuil de négativité de 2,1, et un seuil de positivité de 9,4. Les échantillons en zone douteuse sont contrôlés par la technique de PCR-SSP HLA-B27 dans les conditions définies par cette étude.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- AHO K., AHVONEN P., LASSUS A., SIEVERS K., TIILIKAINEN A.
HLA antigen 27 and reactive arthritis.
Lancet. 1973, 2: 157.
- ALBRECHT J., MULLER HAG.
HLA-B27 typing by use of flow cytofluorometry.
Clin. Chem. 1987, 33: 1619-23.
- AMIEL J.L.,
Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease.
Histocompatibility testing. 1967, 1: 79-81. eds Munksgaard.
- AMOR B., LAOUSSADI S.
Arthrites réactionnelles, un renouveau des arthrites infectieuses ou les
frontières de la spondylarthrite ankylosante.
Presse Méd. 1984, 13: 1719-1722.
- ARNOLD B., HAMMERLING G.J.
MHC class-I transgenic mice.
Annu.Rev.Immunol. 1991, 9: 297-322.
- BENJAMIN R. AND PARHAM P.
Guilt by association: HLA B27 and ankylosing spondylitis.
Immunology Today. 1990, Vol. 11:No. 4, 137-140.
- BERANECK L., KAPLAN G., BENOIST M., BOUCHON J.P., PROST A.,
VASSAL J.P., KAHN M.F.
Hyperostose multiple avec sacro-iliite unilatérale. Une nouvelle
spondyloarthropathie.
Presse Méd. 1984, 13: 2001-2004.
- BLASCZYK R., WEBER M., VAN LESSEN A., HUHN D., SALMA A.
Discrimination of HLA-B27 alleles by group-specific amplification followed
by solid-phase sequencing.
Human Immun. 1996, 45: 117-123.
- BREUR-VRIESENDORP B.S., DEKKER-SAEYS A.J., IVANYI P.
Distribution of HLA-B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis:
the disease is associated with a common determinant of the various B27
molecules.
Annals of the Rheumatic Diseases. 1987, 46: 353-356.

BREWERTON D.A., CAFFREY M., NICHOLLS A., WALTERS D., JAMES D.C.O.

Acute anterior uveitis and HLA-27.

Lancet. 1973, 2: 994-996.

BREWERTON D.A., CAFFREY M., NICHOLLS A., WALTERS D., OATES J.K., JAMES D.C.O.

Reiter's disease and HLA-27.

Lancet. 1973, 2: 996-998.

BREWERTON D.A., CAFFREY M., NICHOLLS A., WALTERS D., OATES J.K., JAMES D.C.O.

HLA-B27 and arthropathies associated with ulcerative colitis and psoriasis.

Lancet. 1974, 1: 956-958.

BREWERTON D.A., CAFFREY M., AHRT F.D., JAMES D.C.O., NICHOLLS A., STURROCH R.D.

Ankylosing spondylitis and HLA-B27.

Lancet. 1973, 1: 904-907.

CALVO V., ROJO S. et coll.

Avidity dictates the lytic capacity of human cytolytic T lymphocyte clones with similar fine specificity against murine cells expressing HLA B27 antigen.

The Journal of Immunology. 1988, 141: 3798-3803.

CHOO SY., FAN L A., HANSEN J.A.

A novel HLA-B27 allele maps B27 allospecificity to the region around position 70 in the α_1 domain.

J Immunol. 1991, 147: 174-180.

COLOMBANI J.,

HLA.

Fonction immunitaires et applications médicales. Ed. John Libbey Eurotext.

D'AMATO M., FIORILLO M.T., GALEAZZI M., MARTINETTI M., AMOROSO A., and SORRENTINO R.

Frequency of the new HLA-B*2709 allele in Ankylosing Spondylitis healthy individuals.

Patients and Disease Markers. 1994, 12: 215-217.

DAUSSET J., PLA M.,

HLA. Complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme.

Eds Médecine-Science. Flammarion

- DE CEULAER K., VAN DER LINDEN J.M.J.P., CATS A.
Sausage-like toes and HLA-B27.
HLA et maladies. 1976,58: 298. Inserm Edit.
- DEL PORTO P., D'AMATO M., FIORILLO M.T., TUOSTO L.,
PICCOLELLA E., SORRENTINO R.
Identification of a novel subtype of HLA-B27 by restriction analysis of a
cytotoxic γ/δ T cell clone.
J.Immunol.1994,153:3093-3100.
- DOMINGUEZ O., COTO E., MARTINEZ-NAVES E., CHOOS.Y.,
LOPEZ.LARREA C.
Molecular typing of HLA-B27 alleles.
Immunogenetics.1992, 36: 277-282.
- EBRINGER A., COWLING P., NGWA SUH.N., JAMES D.C.O.,
EBRINGER R.W.
Crossreactivity between Klebsiella aerogenes species and B27 lymphocyte
antigens as an oetioloing spondylitis.
HLA et Maladies. 1976, 58, 27 Inserm Edit.
- ELLIOT T., SMITH M., DRI SCOLL P., Mc MICHAEL A.
Peptide selection by class I molecules of the major histocompatibility
complex.
Curr. Biol. 1993, 3: 854-866.
- FELTKAMP T.E.W., MUHAMMAD A.K., and LOPEZ DE CASTRO J.A.
The pathogenetic role of HLA-B27.
Immunol. Today. 1996, 17 n°1: 5-7.
- FIORILLO M.T., GRECO G., SORRENTINO R.
The Asp 116-His 116 substitution in a novel HLA-B27 subtype influences
the acceptance of the peptide C-terminal anchor.
Immunogenetics. 1995, 41: 38-39.
- FIZET D.,HITTE C.,FERRER A.M.,VEZON G.
Identification de l'antigène HLA B27 par cytométrie de flux.
Ann.Biol.Clin. 1989, 47: 408-411.
- GARRET T.P.J., SAPER M.A., BJORKMAN P.J., STROMINGER J.L.,
WILEY D.C.
Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68.
Nature. 1989,342: 692-695.

GECZY A.F., ALEXANDER K., BASHIR H.V.

A factor in Klebsiella culture filtrates specifically modifies an HLA-B27 cell surface component.

Nature.1980, 284: 782-784.

GECZY A.F., VAN LEEUWEN A., VAN ROOD J.J., IVANYI P., BREUR B.S., CATS A.

Blind confirmation in Leiden of Geczy factor on the cells of Ditch patients with ankylosing spondylitis.

Hum;Immunol. 1986, 17: 239-245.

GILLILAND B.C.

Harrison's Principles of Internal Medicine (11th Edt). 1987,pp 1434-1436.
Mc Graw Hill.

GONZALES-ROCES S., BRAUTBAR C., PENA M.et COLL.

Molecular analysis of HLA-B27 haplotypes in caucasoids.

Hum Immunol. 1994, 41: 127-134.

GORER PA.

The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera.

Br.J.Exp.Patholol. 1936; 17: 42-50

GUSTINCICH S., MANFIOLETT G., ET COLL.

A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood.

Bio Techniques.1991, 11:298-302.

HAMMER R.E., MAIKA S.D., RICHARDSON J.A., TANG J.P., TAUROG J.D.

Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β_2 -m. An animal model of HLA-B27-associated human disorders.

Cell. 1990, 63: 1099-1106.

HILDEBRAND W.H., DOMENA J.D., SHEN S.Y., MARSH S.G., BUNCE M., GUTTRIDGE M.G., DARKE C., PARHAM P.

The HLA-B7Qui antigen is encoded by a new subtype of HLA-B27 (B*2708)

Tissus Antigens. 1994, 44: 47-51.

HILL A., ALLSOPP C., et coll.

HLA class I typing by PCR:HLA B27 and an African B27 subtype.

Lancet. 1991, 337: March 16, 640-642.

- HILL H.F.H., HILL A.G.S., BODMER J.G.
Clinical diagnostic of ankylosing spondylitis in women and relation to presence of HLA-B27.
Ann. Rheum. Dis. 1976, 35: 267-270.
- HULSTAERT F., ALBRECHT J., HANNET I., LANCASTER P. et COLL
An optimized method for routine HLA-B27 screening using flow cytometry
Cytometry. 1994, 18: 21-29.
- HULSTAERT F., ALBRECHT J., HANNET I. et coll.
An optimized method for routine HLA B27 screening using flow cytometry.
Cytometry. 1994, 18: 21-29.
- JARDETSKY T.S., LAME W.S., ROBINSON R.A., MADDEN D.R., WILEY D.C.
Identification of self peptides bound to purified HLA-B27.
Nature. 1991, 353: 326.
- JARVINEN P.
Arthritis Rheum. 1995, 38: 381-383.
- JEANNET M., SAUDAN Y., BITTER T.
HLA-27 in female patients with ankylosing spondylitis.
Tissus Antigens. 1975, 6: 262-264.
- KARVONEN J., TIILIKAINEN A., LASSUS A.
HLA antigens in patients with persistent palmoplantar pustulosis and pustular psoriasis.
Ann. Clin. Res. 1975, 7: 112-115.
- KOURILSKY F.M., DAUSSET S., FEINGOLD N., DUPUY J.M., BERNARD J.
Etude de la répartition des antigènes leucocytaires chez les malades atteints de leucémie aiguë en rémission.
Adv. Transpl. 1986, 1: 515-522. eds Munksgaard.
- KOUSA M., TIILIKAINEN A., KARVONEN J., LASSUS A.
Psoriatic arthritis and Reiter's disease. HLA antigens in mixed cases.
Ann. Clin. Res. 1976, 8: 312-316.
- KRAVTZOFF R., CANEPA S., et coll.
Phenotypage HLA B27 par cytométrie de flux.
Rev. Fr. Transfus. Hemobiol. 1991, 34: 131-137.

LECHLER R.

HLA & disease

Academic Press. Harcourt Brace & Compagny, publishers.

LOPEZ D., LOPEZ DE CASTRO JOSE A.

T-cell recognition of HLA B27 subtypes and the linkage of HLA B27 to ankylosing spondylitis.

LOPEZ DE CASTRO JOSE A.

HLA B27 and HLA A2 subtypes: structure, evolution and function.

Immunology Today. 1989, Vol 10, No 7,.

LOPEZ-LARREA C., GONZALES-ROCES S., PENA M., DOMINGUEZ O., COTO E., ALVAREZ V., MORENO M., HERNADEZ O., BURGOS-VARGAS R., GORODEZKY C.

Characterization of B27 haplotypes by oligotyping and genomic sequencing in the mexican Mestizo population with Ankylosing Spondylitis: Juvenile and Adult onset.

Hum Immunol. 1995, 43: 174-180.

LOPEZ-LARREA C., SUJIRACHATO K., et coll.

HLA B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis.

Tissue Antigens. 1995, 45: 169-176.

MACLEAN L.

HLA-B27 subtypes: implications for the spondylarthropathies.

Annals of the Rheumatic Diseases. 1992, 51: 929-931.

METEZEAU P., MIGLIERINA R., RATINAUD M.H.

La Cytométrie en Flux.

PULIM (Presses de l'Université de Limoges).

MILLER S.A, DYKES D.D, POLISKY H.F.

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.

Nucleic Acids Res. 1988, 16: 1215-1218.

MOLLER P., VINJE O., DALE K. et coll.

Family studies in Bechterew's syndrome (ankylosing spondylitis). I. prevalence of symptoms and signs in relatives of HLA-B27 positive probands.

Scand. J. Rheumatol. 1984, 13: 1-10.

- MORRIS R.I., METZGER A.L., BLUESTONE R., TERASAKI P.I.
HLA-W27, a useful discriminator in arthropathies of inflammatory bowel disease.
New Engl. J. Med. 1974, 290: 1117-1119.
- MOSES J.H., MARSH S.G.E., ARNETT K.L., ADAMS E.J., BODMER J.G., PARHAM P.
On the nucleotide sequences of B*2702 and B*2705.
Tissue Antigens. 1995, 46: 50-53.
- NICKERSON C.L., LUTHRA H.S., SAVARIRAYAN S., DAVID C.
Suceptibility of HLA-B27 transgenic mice to *Yersinia enterocolitica* infection.
Hum Immunol. 1990, 28: 382-396.
- OLDSTONE M.B.A.
Cell. 1987, 50: 819-820.
- OLERUP O.
HLA B27 typing by a group-specific PCR amplification.
Tissue Antigens. 1994, 43: 253-256.
- ORR K., THOMSON G T D., ALFA M.
Utilization of commercial antisera and flow cytometry in HLA-B27 typing.
Cytometry. 1994, 18: 17-20.
- ORR K.,G.T.D. THOMSON,AND M. ALFA.
Utilization of commercial antisera and flow cytometry in HLA B27 typing.
Cytometry. 1994, 18: 17-20.
- PAZMANI L., ROWLAND-JONES S., HUET S.et coll
Genetic modulation of antigen presentation. by HLA B27 molecules.
J. Exp. Med. 1992, 175: 361-369.
- PEI R., ARJOMAND-SHAMSAI M., DENG C.T., CESBRON A., BIGNON J.D., LEE J.H.
A monospecific HLA-B27 fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibody for rapid, simple and accurate HLA-B27
Tisus Antigens. 1994, 41: 200-203.
- PEI R., ARJOMAND-SHAMSAI M.,et coll.
A monospecific HLA B27 fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibody for rapid, simple and accurate HLA B27 typing.
Tissue Antigens. 1993, 41: 200-203.

- POULETTY P., CHANG C., KALIL J., ATWOOD E. et coll.
Typing of serum-soluble HLA-B27 antigen by ELISA.
Tissue Antigens. 1993, 42: 14-19.
-
- REYNOLDS W M., EVANS P R., LANE A C., HOWELL W M., WILSON P J., WONG R., SMITH J L.
Automated HLA-B27 testing using the FACSPrep/ FACScan system
Cytometrie. 1994, 18: 109-115.
- REYNOLDS W., EVANS P., et coll.
Automated HLA B27 testing using the FACSPrep/ FACScan System. Cytometry. 1994, 18: 109-115.
- ROJO S., LOPEZ D., CALVO V., LOPEZ DE CASTRO JOSE A.
Conservation and alteration of HLA B27 specific T cell epitopes on mouse cells.
The Journal of Immunology. 1991, 146: 634-642.
- SANY J.
Le concept d'arthrite réactionnelle.
Troisième cours d'Immuno-Rhumatologie. Montpellier 1982, vol 1:157-172.
Clot et Sany Edit.
- SCHOLSTEIN L., TERASAKI P.I., BLUESTONE R., PEARSON C.M.
High association of an HLA antigen W27 with ankylosing spondylitis.
N. Eng. J. Med. 1973, 288: 704-706.
- SCHWIMMBECK P.L, YU D.T. and OLDSTONE M.B.A
J. Exp. Med. 1987, 166: 173-181.
- SEIGNALET J.
Le groupage HLA en Rhumatologie.
Ed MASSON. 1986.
- SHIMIZU B., SRA K., FERRONE S., POULETTY P.
sHLA-STAT™ CLASS I an ELISA for quantification of HLA antigens in serum.
Human Immun. 1991, 32 (supp 1): 289.
- SULLIVAN J.S., PRENDERGAST J.K., GECZY A.F. et coll.
Am. J. Med. 1988, 85 (suppl.6A): 54-55.

- TAUROG J.D., MAIKA S.D., SIMMONS W. et COLL.
Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression.
The Journal of Immunology. 1993, 150: 4168-4178.
- TAUROG J.D., MAIKA S.D., SIMMONS W.A., BREBAN M., HAMMER R.E.
J Immunol. 1993, 150: 4168-4178.
- TAUROG J.D. and EL.ZAATARI F.A.K.,
In vitro mutagenesis of HLA-B27. Substitution of an impaired cystéine residue in the α_1 domain causes loss of antibody-defined epitopes.
J.Clin.Invest. 1988,82: 987-992.
- TAUROG J.P., LOWEN L., FORMAN J., HAMMER R.E.
HLA-B27 in inbred and non-inbred transgenic mice. Cell surface expression and recognition as an alloantigen in the absence of human β_2 -microglobulin.
J.Immunol. 1988, 141: 4020-4029.
- TAUROG JOEL D., LOWEN L., FORMAN J., HAMMER E.
HLA B27 in inbred and non-inbred transgenic mice.
The Journal of Immunology. 1988, 141: No 11,4020-4023.
- TERASAKI P., Mc CLELLAND J.
Microdroplet assay of human serum cytotoxins.
Nature. 1989, 204: 998.
- WAGNER L.P., FESSEL W.J.
HLA-27 (W27) absent in gonococcal arthritis.
Lancet. 1975, 1: 1094-1095.
- WARD A M and NIKAEIN A.
Comparaison of monoclonal antibodies for flow cytometric analysis of HLA-B27 antigen
Cytometry. 1995, 22: 65-69.
- WEINREICH S., EULDERINK F., CAPKOVA J., et coll.
HLA B27 as a relative risk factor in ankylosing enthesopathy in transgenic mice.
Human Immunology. 1995, 42: 103-115.
- YU D.T.Y.
Molecular Mimicry in HLA-B27-Related Arthritis.
Annals of Internal Medicine. 1989, 111: 581-591.

YU D.T.Y., HAMACHI T., HAMACHI M., TRIBBICK G.

Analysis of the molecular mimicry between HLA B27 and a bacterial *OmpA* protein using synthetic peptides.

TABLE DES MATIERES

I - INTRODUCTION	14
II - GENERALITES SUR LE COMPLEXE HLA.....	16
1- <u>DEFINITION</u>	17
2- <u>STRUCTURE DES MOLECULES HLA DE CLASSE I</u>	19
2.1- <u>La chaîne lourde α</u>	20
2.2- <u>La B2 microglobuline</u>	21
2.3- <u>Le site de liaison du peptide</u>	21
2.4- <u>Les gènes de classe I</u>	22
3- <u>POLYMORPHISME DU SYSTEME HLA DE CLASSE</u>	23
3.1- <u>Le polymorphisme allélique</u>	23
3.2- <u>Les variants B27</u>	25
4- <u>FONCTIONS DES MOLECULES HLA DE CLASSE I</u>	28
4.1- <u>Selection thymique de répertoire T</u>	28
4.2- <u>Présentation des peptides endogènes aux cellules T CD8+</u>	29
4.2.1- <u>Le récepteur des cellules T :TCR</u>	29
4.2.2- <u>Le peptide</u>	30
4.2.3- <u>La molécule CD8</u>	31

4.3-<u>La réponse allogénique au CMPH</u>	31
--	----

5-REGULATION DE L'EXPRESSION DES MOLECULES DE

<u>CLASSE I</u>	31
------------------------------	----

5.1-<u>Les cytokines</u>	32
---------------------------------------	----

5.2-<u>Les virus</u>	32
-----------------------------------	----

5.3-<u>Les oncogènes</u>	32
---------------------------------------	----

III - ASSOCIATION HLA-B27 ET MALADIES.....

1-<u>GENERALITES</u>	34
-----------------------------------	----

2-<u>LES MALADIES ASSOCIEES A HLA-B27</u>	38
--	----

2.1-<u>LA SPONDYLARTHRITE ANKYLOSANTE</u>	38
--	----

2.2-<u>AUTRES MALADIES ASSOCIEES A HLA-B27</u>	39
---	----

2.2.1-<u>Uveite antérieure aiguë</u>	39
---	----

2.2.2-<u>Les arthrites réactionnelles</u>	40
--	----

a-<u>Le syndrome de Feissinger Leroy Reiter (FLR)</u>	40
--	----

b-<u>Les autres arthrites réactionnelles (AR)</u>	40
--	----

2.2.3-<u>Les pelvispondylites secondaires aux inflammations intestinales chroniques</u>	41
--	----

2.2.4- <i>Les autres rhumatismes apparentés à la SPA</i>	41
2.3-<u>PHYSIOPATHOLOGIE</u>	41
2.3.1- <i>Les modèles animaux</i>	42
2.3.2- <i>Rôle structural de la molécule HLA-B27</i>	42
2.3.3- <i>Injections bactériennes et hypothèse du mimétisme moléculaire</i>	44
2.3.4- <i>Hypothèse du facteur modifiant HLA-B27</i>	45
2.3.5- <i>Théorie du peptide arthritogénique</i>	46
2.3.6- <i>Autres facteurs génétiques</i>	48
2.3.7- <i>Conclusions</i>	48

IV - TECHNIQUES DE TYPAGE DU SYSTÈME HLA

DE CLASSE I.....49

1-L'IDENTIFICATION DES MOLECULES HLA.....50

1.1-LES TECHNIQUES SEROLOGIQUE.....50

1.1.1-Lymphotoxicité.....50

1.1.2-La cytométrie en flux.....52

a-Principe.....52

b-L'appareil.....53

c-Le phénotypage HLA-B27.....54

1.1.3-Techniques immuno-enzymatique.....55

<u>1.2- TECHNIQUE CELLULAIRE</u>	56
<u>2- TECHNIQUE BIOCHIMIQUE: électrophorèse d'iso-electro-focalisation</u>	56
<u>3-IDENTIFICATION DES GENES HLA</u>	57
<u>3.1-Techniques de biologie moleculaire</u>	57
<i>3.1.1-Extraction de l'ADN genomique</i>	57
<i>3.1.2-Technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme) ou l'etude du polymorphisme de taille des fragments de restriction</i>	57
<i>3.1.3-Les techniques de PCR</i>	58
<i>a-Principe et description</i>	58
<i>b-PCR SSO</i>	60
<i>c-PCR-RFLP</i>	60
<i>d-PCR-ASA ou PCR-SSP</i>	60
<u>3.2-SEQUENCAGE DES GENES HLA</u>	61
<u>4-PARTICULARITES DU TYPAGE HLA-B27</u>	61
V- SUJET DE L'ETUDE	62
<u>1- STRATEGIE DU LABORATOIRE</u>	63

1.1- <u>Généralités</u>	63
1.2- <u>Cytométrie en flux (CMF)</u>	63
1.3- <u>Microlymphocytotoxicité</u>	64
2- <u>OBJECTIFS DU TRAVAIL</u>	65
2.1- <u>Etude de 3 anticorps monoclonaux en cytométrie</u>	65
2.2- <u>Typage HLA-B27 générique par biologie moléculaire</u>	65
2.3- <u>Sous-typages HLA-B27 par biologie moléculaire</u>	66
VI- <u>MATERIELS ET METHODES</u>	67
1- <u>MATERIELS</u>	62
1.1- <u>Population de malades</u>	68
1.2- <u>Population témoin</u>	68
1.3- <u>Lignées lymphoblastoïdes</u>	68
1.4- <u>ADN de référence</u>	69
2- <u>METHODES</u>	69
2.1- <u>Cytométrie en flux</u>	69
2.1.1- <u>Anticorps monoclonaux</u>	69
2.1.2- <u>Cytomètre</u>	70

2.1.3- Techniques de marquage direct des cellules.....	70
<i>a- Ac monoclonal anti HLA-B27 FITC/ Ac monoclonal anti HLA-B7</i>	
<i>PE (IMMUNOTECH®). Clone HLA-ABC-m³.....</i>	70
<i>b- Ac monoclonal anti HLA-B27 FITC/ Ac monoclonal anti CD3 PE</i>	
<i>(BECTON DICKINSON®). Clone GS 145.2.....</i>	72
<i>c- Ac monoclonal anti HLA-B27 FITC (ONE LAMBDA®). Clone</i>	
<i>FD705-9E1E10.....</i>	73
2.2- <u>Biologie moléculaire</u>.....	74
2.2.1- Extraction de l'ADN génomique.....	74
<i>a- Technique.....</i>	74
<i>b- Réactifs.....</i>	75
<i>c- Mesure de la concentration d'ADN.....</i>	76
2.2.2- Amplification de l'ADN par PCR-SSP.....	76
<i>a- Amorces.....</i>	76
<i>b- Mélange réactionnel.....</i>	79
<i>c- Programme d'amplification.....</i>	79
<i>d- Résultats.....</i>	79
2.2.3- Sous-typages HLA-B27 par PCR-SSO.....	80
<i>a- Amplification de l'ADN.....</i>	80
<i>b- Les sondes oligonucléotidiques.....</i>	83
<i>c- Dot-blot.....</i>	84
<i>d- Marquage des sondes avec la digoxigénine (dig-dd UTP)</i>	84

<i>e- Préhybridation</i>	85
<i>f- Hybridation</i>	85
<i>g- Lavages</i>	87
<i>h- Révélation par chémoluminescence</i>	87
<i>i- Résultats</i>	87

VII - RESULTATS.....89

1- TYPAGE HLA-B27 PAR TECHNIQUE DE PCR-SSP.....90

1.1- Validation de la technique.....90

1.2- Résultats du typage HLA-B27 dans la population de patients.....91

2- CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)91

2.1- Répartition des moyennes de fluorescence.....91

2.1.1- Anticorps monoclonal ONE LAMBDA.....93

2.1.2- Anticorps monoclonal BECTON DICKINSON.....95

2.1.3- Anticorps monoclonal IMMUNOTECH.....99

2.2- Détermination des seuils de négativité.....101

2.3- Détermination des seuils de positivité.....103

2.4- Etude de la population indéterminée.....104

2.5- Résultats du phénotypage HLA-B7.....105

2.6- Résultats du phénotypage des lignées lymphoblastoïdes.....107

2.7- <u>Réactions croisées avec les Ag du CREG-B7</u>	109
3- <u>RESULTATS DU SOUS-TYPAGE HLA-B27</u>	113
4- <u>DONNEES CLINIQUES</u>	117
VIII- DISCUSSION	118
1- <u>INTERET DE LA PCR-SSP POUR LE PHENOTYPAGE HLA-B27</u>	119
2- <u>INTERET DE LA CYTOMETRIE DE FLUX</u>	119
2.1- <u>Lyse des érythrocytes</u>	119
2.2- <u>Nombre de leucocytes et de lymphocytes dans le sang</u>	120
2.3- <u>Concentration de l'anticorps</u>	120
2.4- <u>Population de cellules analysées</u>	121
2.5- <u>Reconnaissance d'épitopes différents</u>	121
2.6- <u>Les sous-types HLA-B27</u>	122
IX- CONCLUSION	124
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser les crimes.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devaient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puissè-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 32

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

L'intense association du phénotype HLA-B27 à la spondylarthrite ankylosante est connue depuis 1973. Dans la population caucasienne, 96% des patients présentant une spondylarthrite ankylosante sont HLA-B27 positifs contre 6% dans la population témoin.

Cette association constitue un élément prédisposant que le clinicien s'attache à rechercher lorsqu'il existe des symptômes évoquant le diagnostic de spondylarthrite ankylosante.

Parmi les moyens de phénotypage, la lymphocytotoxicité est la technique de référence pour l'identification des antigènes HLA de classe I. Néanmoins, cette technique longue, délicate et onéreuse, reste dans certains cas insuffisante.

La cytométrie de flux est une technique sérologique rapide et d'un coût modéré, mais son interprétation délicate demande à être corrélée à une technique de référence.

Cette étude a permis de définir une conduite de typage HLA-B27 en routine. Pour cela, une technique de biologie moléculaire, plus simple, plus rapide et plus spécifique que la lymphocytotoxicité a été mise au point et validée.

D'autre part, une comparaison de 3 anticorps monoclonaux pour le dépistage en cytométrie de flux des patients (CMF) HLA-B27 a été effectuée. Parmi les différents paramètres influençant l'interprétation du phénotypage en CMF, la lyse automatisée des globules rouges par technique « Q-PREP » est préférée.

L'analyse d'une population de cellules CD3 positives augmente les valeurs prédictives positive et négative par rapport à l'analyse d'une population lymphocytaire totale. Un double marquage HLA-B7, HLA-B27 n'améliore pas la valeur prédictive positive.

Les différentes spécificités HLA-B27 recherchées au cours de ce travail par biologie moléculaire ne nous permettent pas d'expliquer les variations de fluorescence observées.

MOTS CLES

HLA-B27
Spondylarthrite ankylosante
Cytométrie en flux
Phénotypage
Biologie moléculaire