

**Enseignement d'Immunologie
Septembre 2009**

**ED05
Alloréactivité et transplantation**

DES de Biologie Médicale



**Universités des Sciences de la Santé
CAMBODGE – LAOS**

Avec la participation de l'Université Pierre et Marie Curie



Soutenu par :

Projet d'Appui à l'Enseignement Supérieur Médical en R.D.P. Lao
Projet d'Appui à l'Université des Sciences de la Santé au Cambodge
Fondation Mérieux au Cambodge et au Laos (Centre Christophe Mérieux)

IMMUNOLOGIE 2009

DES

Enseignement Interactif N° 5

Thème : Alloréactivité - Transplantation

QUESTIONS

Objectifs :

Raisonnement sur l'alloréactivité, ses bases moléculaires.

Comprendre les conséquences pour les stratégies de greffes ou transfusions.

Assimilation des connaissances :

- 1- Principes immunologiques de la transplantation et de la transfusion.
- 2- Explorations : typage HLA, groupes sanguins, tests de Coombs.

A travers les exemples :

- 1- Allo-immunisation : transfusion érythrocytaire incompatibilité foeto-maternelle.
- 2- Transplantation : greffe rénales et de moelle osseuse allogéniques.

Objectifs spécifiques :

Mécanismes de l'immunisation sanguine foeto-maternelle

Transfusion de sang et produits dérivés : mesures de sécurité, risques et accidents immunologiques.

Rôle des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (système HLA).

Immunologie des transplantations d'organes.

Mécanismes et expression clinique du rejet de greffe et de la maladie du greffon contre l'hôte.

Groupes sanguins (1)

Système ABO

Le système ABO est le **système majeur de comptabilité transfusionnelle**. Les Ag correspondants sont exprimés certes sur les **hématies**, mais aussi sur **toutes les cellules** de l'organisme : il s'agit donc autant d'un système de **groupes tissulaires** que de **groupes sanguins**. **Quatre phénotypes** (A, B, AB, O) sont définis par la présence sur les cellules d'un ou deux **antigènes A ou B** ou par leur **absence (groupe O)**. Ces antigènes correspondent à des **sucres** et ne sont pas les produits primaires des gènes, lesquels codent les enzymes qui placent les sucres sur un glycosphingolipide précurseur commun, "l'**antigène H**".

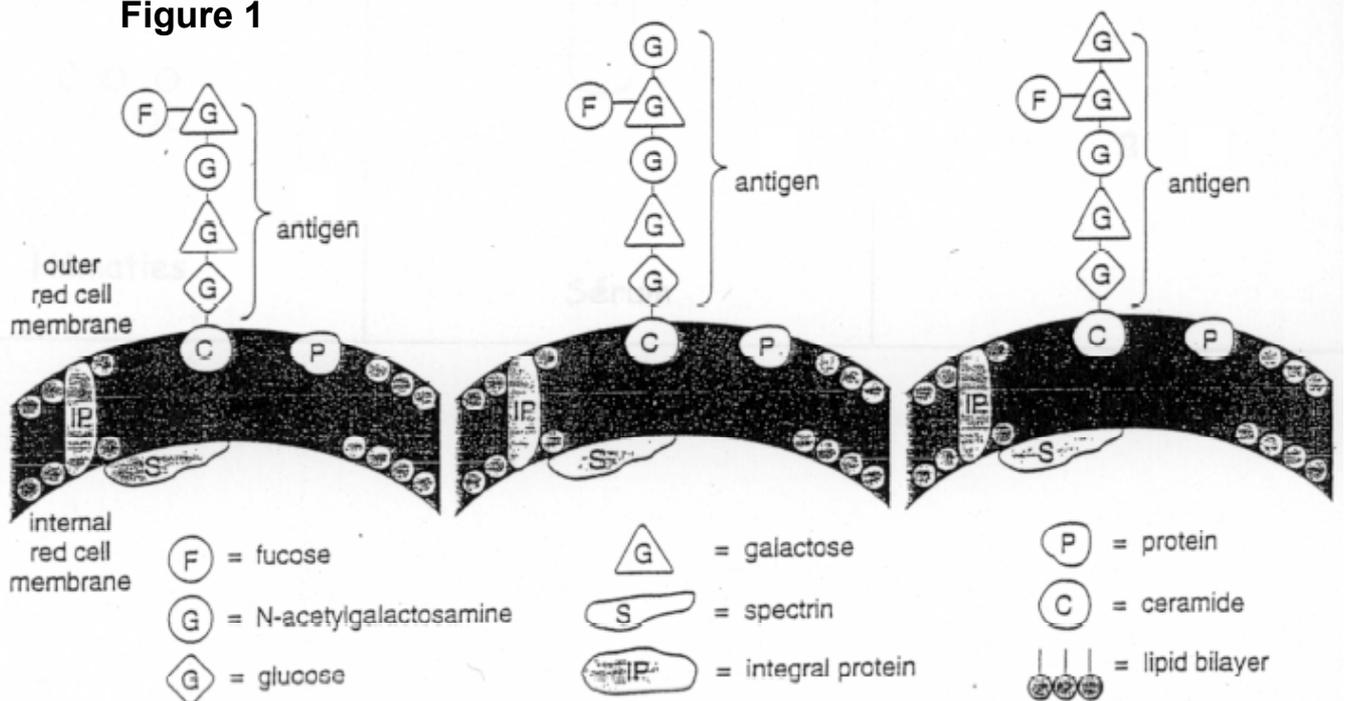
La chaîne glycanique du groupe O (qui correspond à l'antigène H) est formée de glucose, galactose, N-acétylgalactosamine et fucose. Les Ac spécifiques se lient sélectivement aux Ag A ou B, du fait de leur capacité de reconnaître les subtiles différences de structure de l'hexose en bout de chaîne.

Les sujets du **groupe A (45%)** ont dans leur sérum une **agglutinine « naturelle » anti-B** et les sujets du **groupe B (8%)** une **agglutinine anti-A**. Les sujets du **groupe O (44%)** ont les deux types d'agglutinines **anti-A et anti-B**, les sujets du **groupe AB (3%)** n'ont ni **anti-A ni anti-B**.

Questions :

- 1- Que reconnaissent les anticorps anti-A ? les anticorps anti-B ?
- 2- Quelle est la particularité des antigènes d'oligosaccharides ?
- 3- Quelle est la sous-classe d'Ig impliquée dans ces « anticorps naturels » ?
- 4- Dans quelles situations peut-on voir apparaître des « anticorps anti-A, B ou O immuns ? Quel est leur classe ?

Figure 1



Groupes sanguins (2)

Questions :

- 1- Principe et schéma du groupage sanguin par l'épreuve de **Beth et Vincent**
- 2- Principe et schéma du groupage sanguin par l'épreuve de **Simonin**
- 3- Dessinez les directions des compatibilités érythrocytaires et accidents transfusionnels et en déduire les règles transfusionnelles.

La sécurité immunologique de la transfusion érythrocytaire consiste en premier lieu à **ne pas injecter de globules rouges portant des antigènes contre lesquels le sujet possède des anticorps**.

La transfusion de globules rouges devra donc **toujours être compatible dans le système ABO** où existent des **anticorps naturels**, et dans les **autres systèmes** s'il existe des **anticorps irréguliers ou immuns**. La recherche de ces anticorps (**agglutinines irrégulières**) sera **systématique** avant toute transfusion.

La fréquence des **accidents hémolytiques de type ABO** en France est estimée à 1 pour 70 000 actes transfusionnels. Ils sont presque toujours la conséquence d'une **erreur humaine** et pourraient être complètement évités si des mesures simples (et légales) étaient respectées :

- deux prélèvements, réalisés à des temps différents, pour établir une carte de groupe sanguin afin d'éviter les erreurs d'étiquetage ;
- vérification ultime de la compatibilité ABO : au lit du malade ; au moment de la transfusion ; en mélangeant le sang du receveur et le culot sanguin, pour chaque produit administré ;
- recherche systématique d'anticorps immuns (agglutinines irrégulières : "RAI") avant tout épisode transfusionnel ;
- dépistage systématique des donneurs de sang présentant des anticorps anti-A ou anti-B «immuns».

Ces mesures peuvent encore être améliorées par la réalisation systématique au laboratoire, avant la transfusion, d'une épreuve de compatibilité directe entre le sérum du receveur et les globules rouges à transfuser. Cette épreuve, légalement obligatoire si le receveur est RAI+, permet d'assurer la validité des examens précédents.

Figure 2 Principes du groupage sanguin

Beth-Vincent	sérum (Ac) connus		
hématies tests	anti-A	anti-B	anti-AB
A			
B			
AB			
0			

Simonin	hématies connues		
sérums tests	A	B	0
anti-A (sujet B)			
anti-B (sujet A)			
anti-AB (sujet 0)			

Figure 3

règles transfusionnelles

pour les hématies

pour le plasma

A

A

AB

O

AB

O

B

B

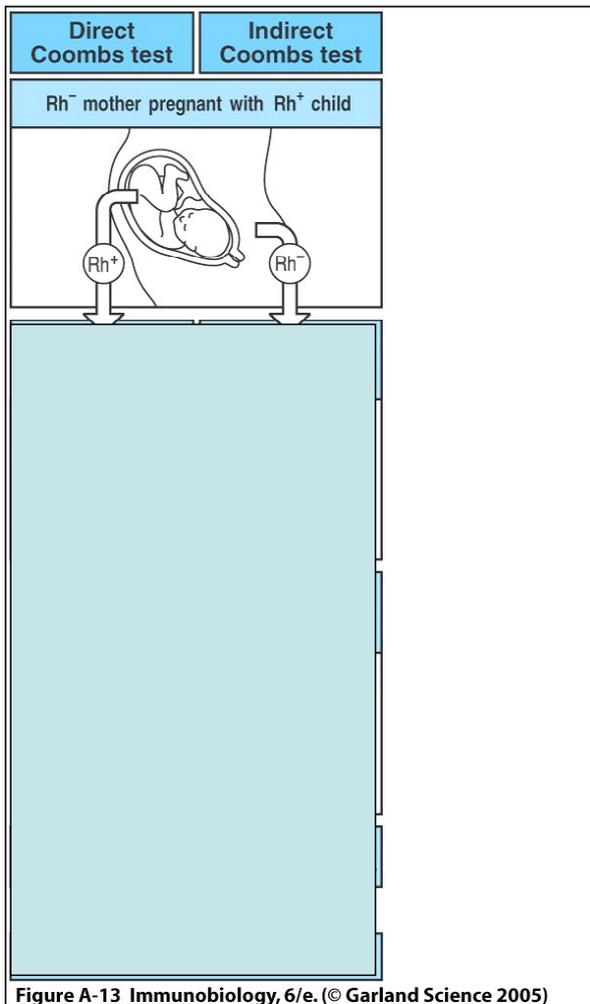
Groupes sanguins (3)

Système Rhésus

L'Ag Rhésus D (RH1 dans la nomenclature actuelle) est un **polypeptide exclusivement érythrocytaire**, retrouvé chez **85% des sujets caucasiens**. Les sujets qui portent cet Ag sont dits Rhésus-positifs et ceux qui ne l'expriment pas sont dits Rhésus-négatifs. Génétiquement, le système Rhésus D correspond à **deux allèles, D (qui est dominant) et d (récessif)**. On n'observe **jamais d'anticorps naturels anti-Rhésus D**, mais des anticorps induits par immunisation peuvent être observés chez les sujets Rhésus-négatifs.

Questions :

- 1- Y-a-t-il des Ac « naturels » anti-Rhésus D ? et pourquoi ?
- 2- Dans quelles circonstances apparaissent les Ac anti-D ?
- 3- Que détecte le test de Coombs direct en cas d'incompatibilité Rhésus ?
- 4- Dans quelles conditions trouve t'on un test de Coombs direct positif ?



Tests de Coombs et pour la détection d'anticorps anti-érythrocytaires.

Test de Coombs indirect =

Exemple d'une immunisation fœto-maternelle.

Figure 4

Complexe HLA (1)

Le complexe HLA est un **ensemble de gènes localisés sur de multiples loci sur le bras court du chromosome 6**. Ces loci sont regroupés en deux classes, la **classe I** qui inclut, entre autres, les gènes **HLA-A, B et C**, et la **classe II** ou région **HLA-D**.

Tous ces gènes sont caractérisés par leur **polymorphisme**, leurs **liaisons étroites** et leur **expression co-dominante**.

Chaque gène est **multi-allélique**, ce qui conduit à un grand nombre de combinaisons possibles sur chaque chromosome.

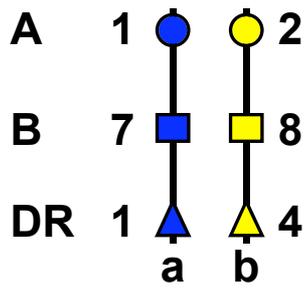
La liaison étroite signifie que tous les gènes du même chromosome sont transmis en bloc des parents aux enfants (**haplotypes**).

Questions :

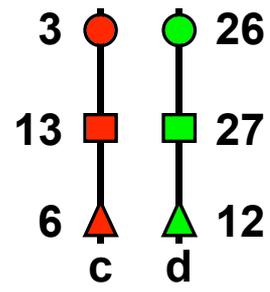
1. Que signifie la codominance de l'expression des gènes HLA ?
2. Que signifie un haplotype ?
3. Donnez les haplotypes de chaque enfant. (schéma)

Figure 5

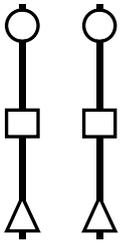
père ♂



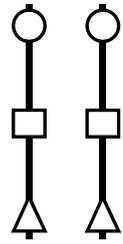
mère ♀



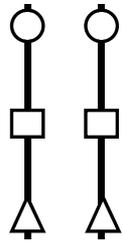
X



♂

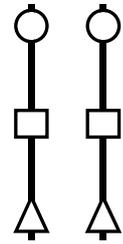


♂

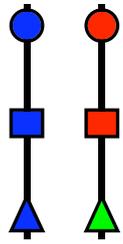


♀

enfants



♂



♂

Typage HLA (1)

Les méthodes modernes de typage HLA (PCR-SSO : "Sequence-Specific Oligonucleotides) reposent sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles et de séquences communes à tous les allèles. Les segments génétiques sont amplifiés par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et le polymorphisme est détecté par hybridation (ou par séquençage de l'ADN). Cette méthode est la seule acceptée pour un typage de classe II ou pour un typage de classe I ou II générique (nécessaire aux greffes de cellules souches hématopoïétiques). Elle est également nécessaire pour les groupes ethniques peu connus.

Les méthodes de typage HLA de classe I A et B sont cependant pour les transplantations d'organes encore basées sur les réactions sérologiques pour les Caucasiens. Les réactions de micro-lymphocytotoxicité mettent les lymphocytes, portant sur leurs membranes les Ag HLA, en présence d'Ac et de complément. Les sources d'Ac ne sont plus des allo-antisérums obtenus par immunisation inter-humaine (grossesse, transfusion sanguine ou allogreffe) mais essentiellement aujourd'hui des Ac monoclonaux. Néanmoins ces méthodes ne sont plus admises pour les greffes de cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse ou du sang du cordon ombilical.

La nomenclature des molécules de classe I A et B

- définie par des méthodes sérologiques est encore utilisable (A1, A2, B5, B51....).
- Si le typage de classe I est réalisé par PCR-SSO, la nomenclature est la suivante : A* 02 (=A2)

La nomenclature des molécules de classe II est la suivante :

- DRB1*07 (=DR7)

Questions :

1. Etablissez les phénotypes HLA d'Anne, Pierre, Paul à partir de la grille.
2. Comment déterminer leur organisation en haplotypes au niveau de chaque chromosome ?

Figure 6

allèles	Locus		
	A	B	DR
1	■	▲	■
2	●		▲■
3	■▲		●
4			●
5	▲	■	
6		●	▲
7		●	
8		■▲	

Phénotypes
A B DR

Haplotypes
A B DR / A B DR

Anne (■) =

Pierre (●) =

Paul (▲) =

Typage HLA (2)

Cross Match

On pratique, avant toute transplantation d'organes (rein surtout, mais aussi pancréas, cœur et poumons, mais non le foie), un cross-match lymphocytaire par **microlymphocytotoxicité** sur lymphocytes du donneur avec le **sérum du receveur** et du sérum de lapin comme source de complément. Un **cross-match positif** est une contre-indication à la transplantation d'organes.

Question :

1. Que détecte le cross-match ?
Pourquoi ?
2. Commentez le tableau ci-joint.
3. Conséquences pour les indications de greffes rénales ?

Figure 7

	1	2	contrôles		
lymphocytes T du donneur					
sérum humain	Ac +	Ac -	Ac + polyspe	Ac + polyspe	Ac -
sérum du lapin (C+Ac)	+	+	-	+	+
colorant (ex: éosine Y)					
Cross Match	+	-	(1)	(2)	(3)

*1, 2, 3 : sérum contrôles contenant des Ac anti-HLA
ou NON*

Typage HLA (3)

Anticorps anti-HLA

Ces anticorps doivent être recherchés pour tout receveur potentiel de greffe d'organes tous les 3 mois et après toute intervention immunologique (transfusion). Cette recherche se fait toujours par 2 méthodes :

- LCT (micro-lymphocytotoxicité) en inversant sérum et cellules par rapport au typage HLA.
- ELISA (ou Luminex) sur des supports recouverts d'antigènes HLA purifiés.

Question :

Un receveur potentiel a un anticorps anti-A2. Il est : HLA-A3, 32 ; B44, 51.

On lui propose deux greffons :

1 : A2, A3 ; B44, 51

2 : A3, A68 ; B44, 51

- Quel test faites-vous ?

- Quelles décisions prenez-vous :

Rejet de greffe et Lois de la Transplantation

Le terme "**greffe**" est utilisé pour des tissus lorsqu'il n'y a pas d'anastomose vasculaire (ex : moelle osseuse, cornée, peau),

"**transplantation**" lorsqu'il y a rétablissement de la continuité vasculaire.

On parle : d'**autogreffe** lorsque le donneur est le même individu que le receveur,
de **greffe syngénique** isogreffe lorsque donneur et receveur sont **génétiquement identiques** (jumeaux monozygotes),
d'**allogreffe** lorsqu'ils sont **génétiquement différents mais de la même espèce**,
de **xéngreffe** lorsqu'ils appartiennent à des **espèces animales différentes**.

Le devenir d'un transplant dépend essentiellement de la **réaction immunologique du receveur vis-à-vis des Ag de transplantation propres au donneur et portés par le greffon**.

La réaction immunologique du receveur dirigée contre les Ag du greffon met en jeu les **lymphocytes T et des Ac**, qui vont induire des lésions tissulaires caractéristiques et des perturbations des fonctions biologiques du transplant, décrites sous le nom de **réaction de rejet**. Selon leurs mécanismes immunopathologiques et leur intensité, les rejets sont classés en : suraigus, aigus ou chroniques, réversibles ou irréversibles.

Questions :

1. Définir l'existence d'un rejet ou non dans ces situations après greffe et discuter ces formes de compatibilité
 - * syngénique
 - * allogénique
 - géno-identique
 - phéno-identique
 - * xéno-génique
2. Définir les conditions d'un rejet après greffe d'organes chez la souris.
3. Quelles sont les molécules antigéniques impliquées ?

Les lois de la transplantation. Lois de Snell (1936)



Haplotype du Complexe Majeur d'Histocompatibilité		
donneur	receveur	rejet
A	A	
B	B	
A	F1(AxB)	
B	F1(AxB)	
A	B	
B	A	
F1(AxB)	A	
F1(AxB)	B	

Figure 8

Le rejet d'allogreffe résulte d'une réponse immune cellulaire médiée par des lymphocytes T

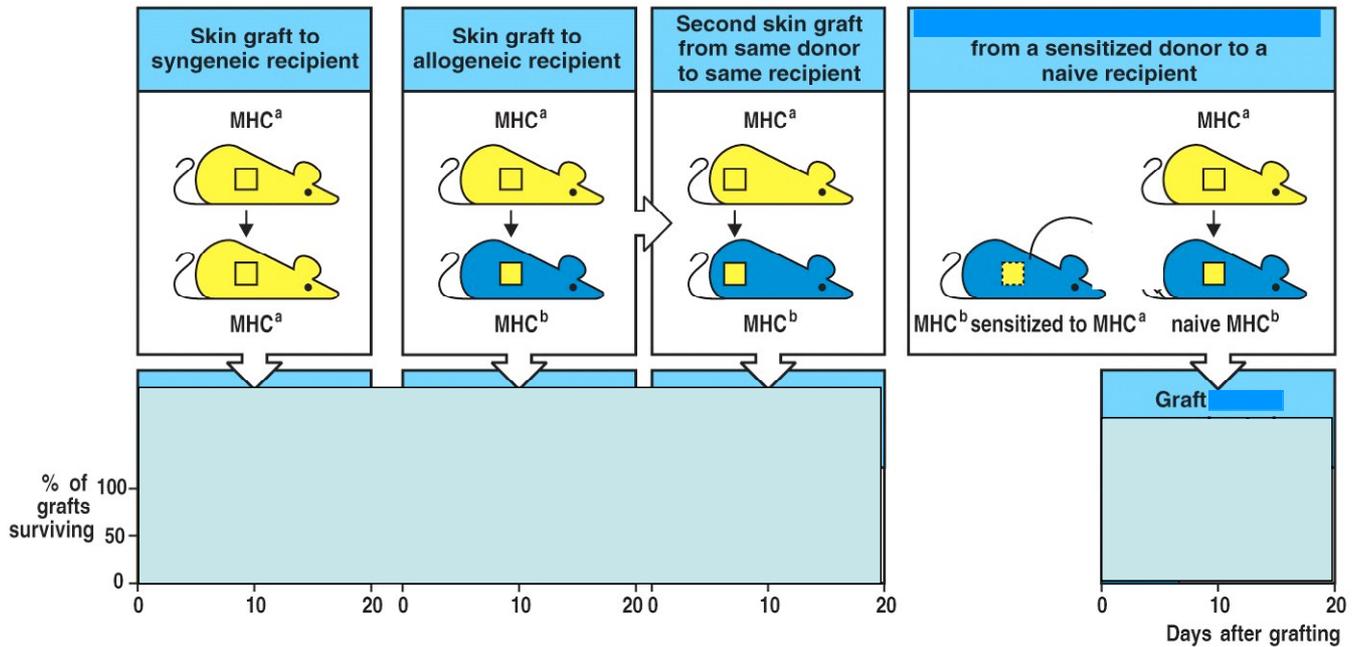


Figure 13-35 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figure 9

La compatibilité complète au CMH n'est pas gage de la survie définitive d'une greffe :

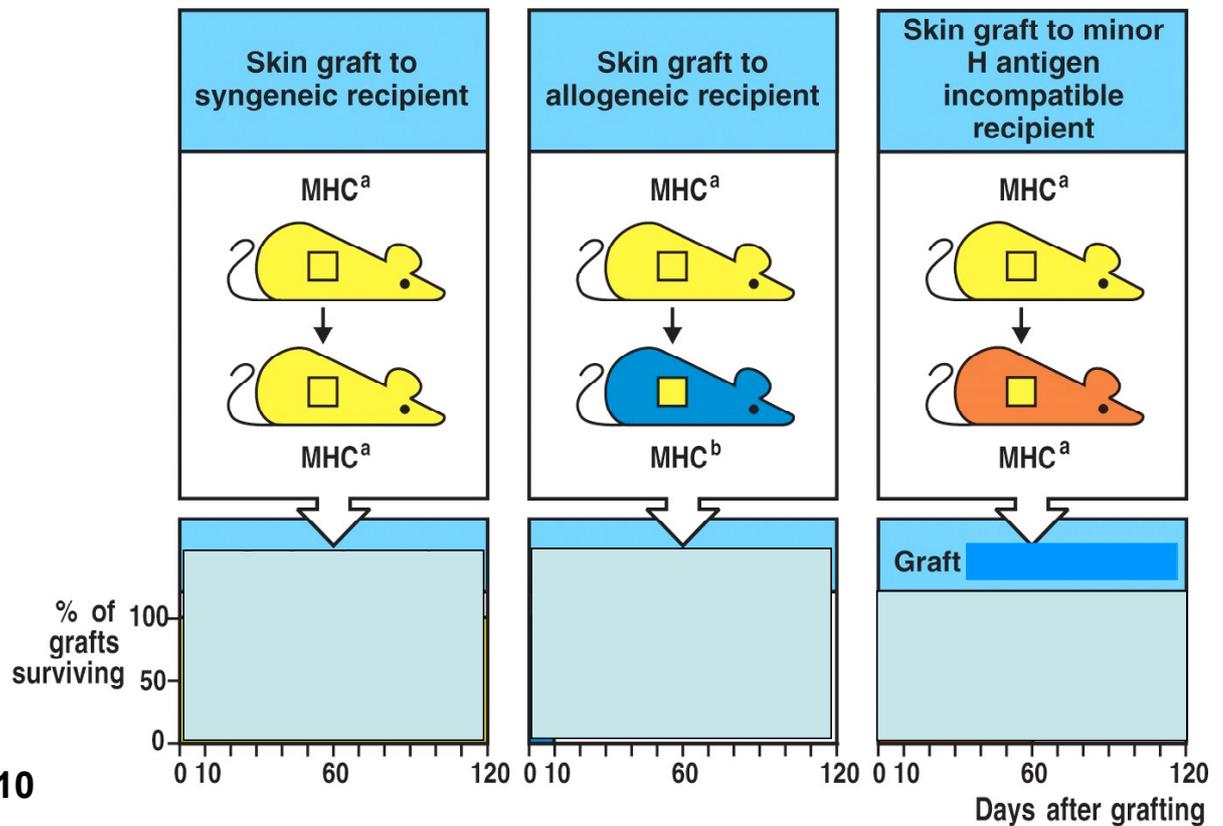


Figure 10

Figure 13-36 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

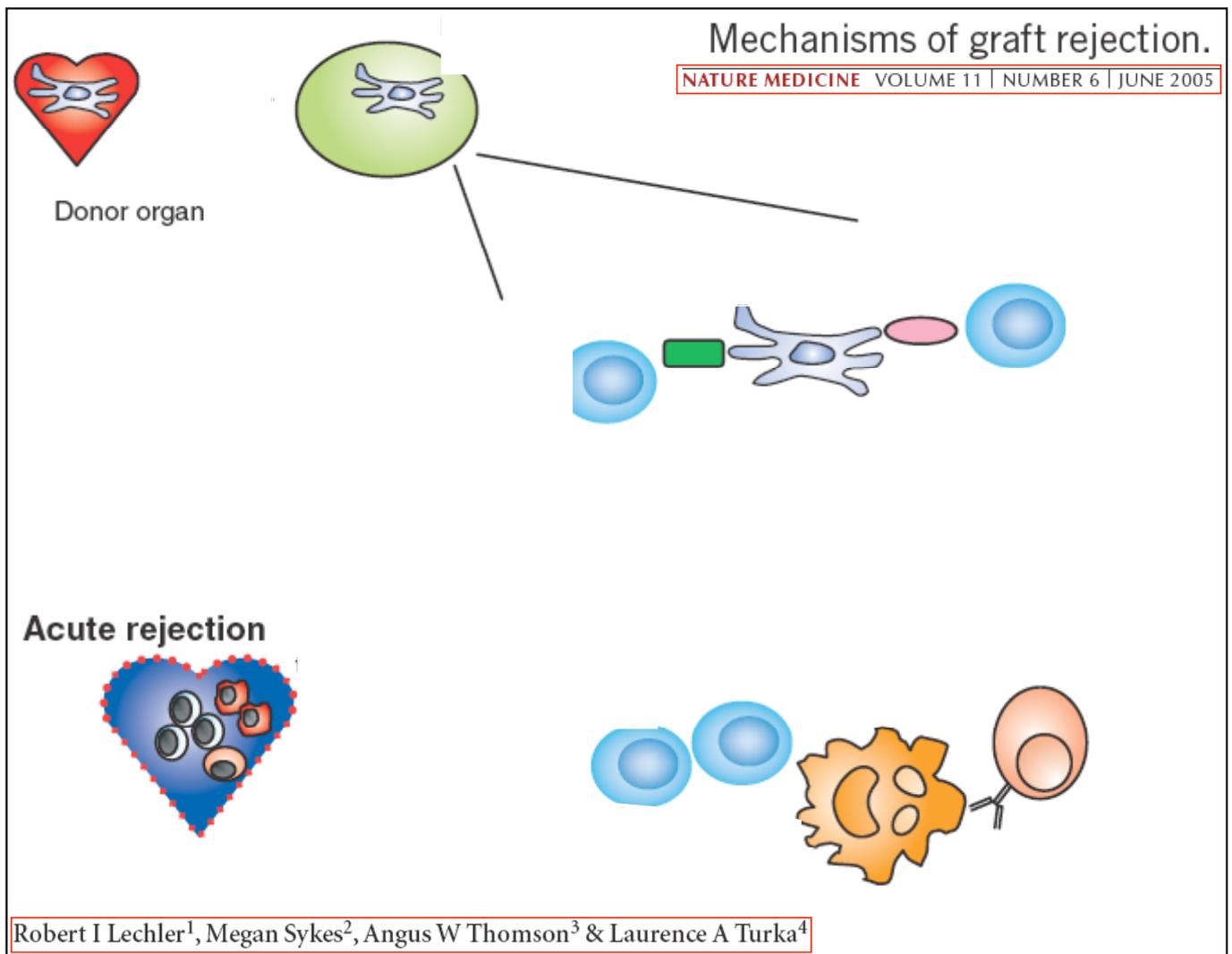
Rejet de greffe (2)

Les mécanismes immunologiques du rejet de greffe mettent en cause l'immunité à médiation cellulaire et humorale.

Complétez les schémas ci-joint :

- les molécules antigéniques reconnues
- les molécules nécessaires à la coopération cellulaire et à l'induction du rejet

Figure 11



La réaction leucocytaire mixte, modèle *in vitro* de réponse immune à médiation cellulaire vis-à-vis d'incompatibilités tissulaires

Figure 12

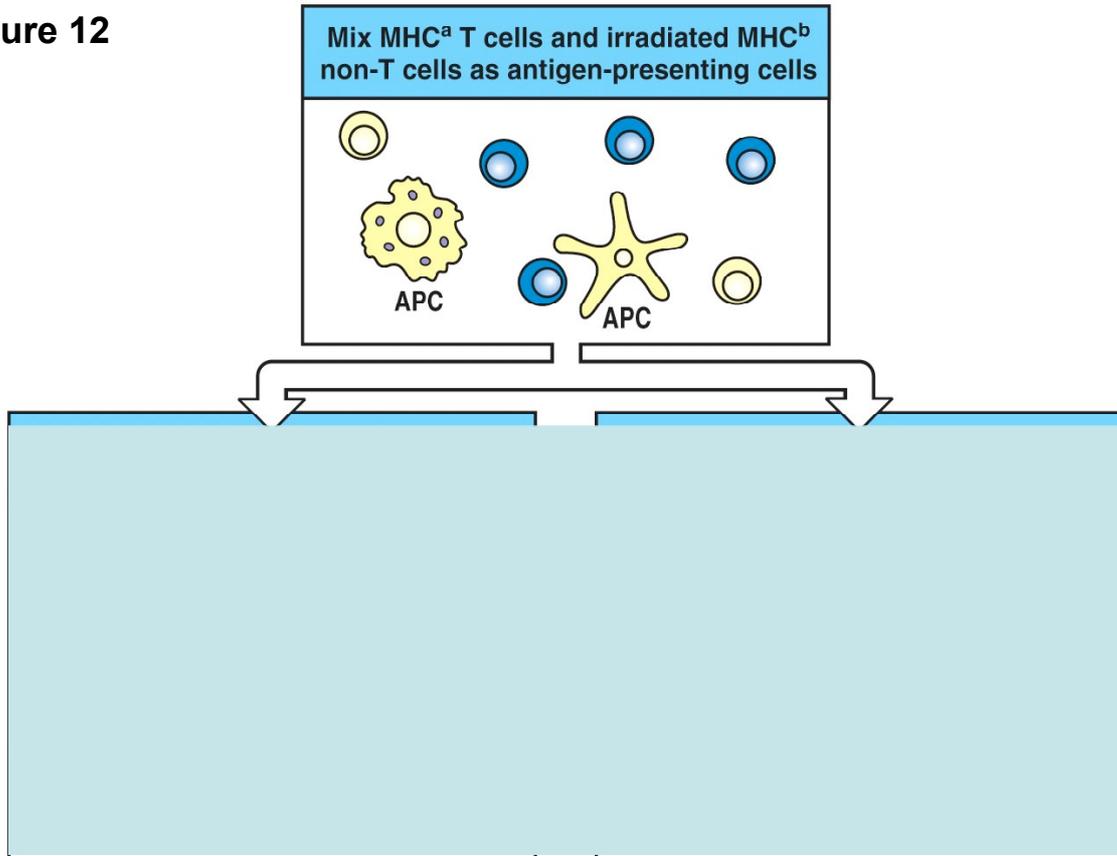
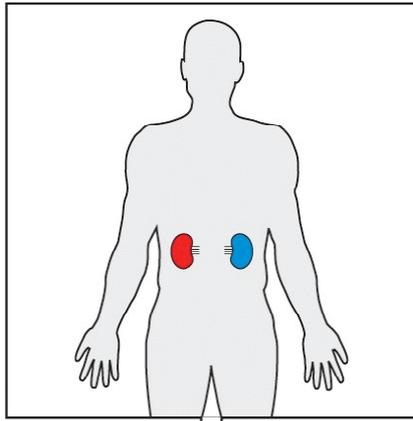


Figure 13-42 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figure 13



Les allo-antigènes d'un transplant ou d'une greffe sont reconnus de deux façons :

- 1.
- 2.

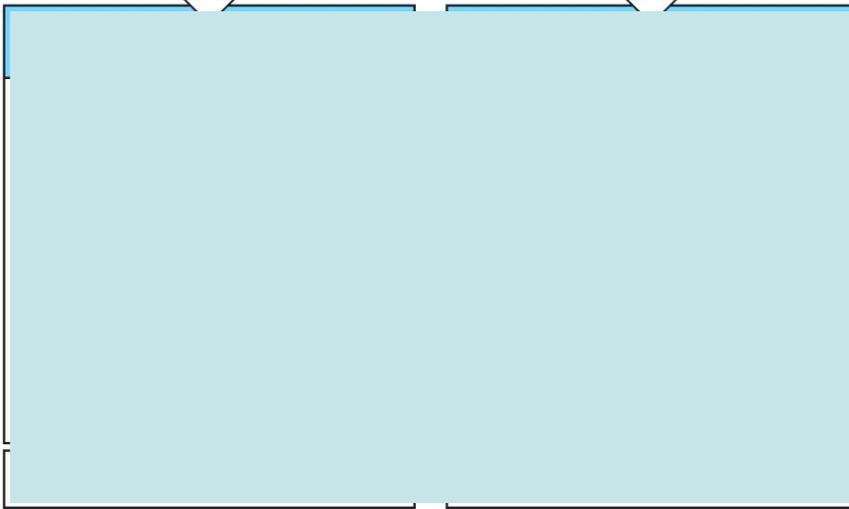


Figure 13-38 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Greffes de moelle osseuse

- 1- Physiopathologie de la réaction du greffon contre l'hôte (GVH).
- 2- De quels côtés sont les acteurs immunologiques du rejet ou de la GVH ?
- 3- Dans quel sens se font le rejet et la GVH ?
- 4- Quelles sont les conséquences thérapeutiques ?

Physiopathologie de la GVH

1. La GVH survient après **injection de cellules immunocompétentes** (Lymphocytes T) chez un **receveur immunodéficient**
 - greffe de moelle osseuse allogénique après conditionnement immunosuppresseur
 - transfusion de produits sanguins non irradiés à un sujet immunodéprimé
2. Le receveur possède des **allo-antigènes absents chez le donneur** (HLA, Ags mineurs d'histocompatibilité)
3. Le receveur **ne peut pas développer une réponse immune contre le greffon** (pas de rejet)
4. Un traitement immunosuppresseur transitoire peut conduire à la prise permanente (+/-) de greffe

Commenter la figure ci-jointe.

Figure 14

The Pathophysiology of Acute Graft-Versus-Host Disease
 M. Jaksch* & J. Mattsson*†
Scandinavian Journal of Immunology 61, 398–409
 2005

Lésions tissulaires
Interfaces !

- peau
- poumon
- intestin
- foie

Figure 1 The three-phase model of acute graft-versus-host disease (GVHD). During step 1, the conditioning regimen (irradiation and/or chemotherapy) leads to damage, activation of host tissues and induction of inflammatory cytokines [tumour necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1] secretion. Increased expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens and adhesion molecules leads to enhancement of the recognition of host MHC and/or minor histocompatibility antigens by mature donor T cells. During step 2, donor T cells proliferate and secrete IL-2 and interferon (IFN)- γ . These cytokines induce further T-cell expansion, induce cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells responses and prime additional mononuclear phagocytes to produce TNF- α and IL-1. Also, nitric oxide (NO) is produced by activated macrophages, and it may contribute to the tissue damage seen during step 3. Lipopolysaccharide (LPS), which leaks through the intestinal mucosa that was damaged during step 1, together with IFN- γ , from step 2, further stimulate macrophages to secrete cytokines and NO. During step 3, CTL and NK cells induce target tissue damage through cell-mediated cytotoxicity.

