



HAL
open science

Détection des Anticorps anti-HLA-G chez les patients transplantés -impact sur la survenue de rejet aigu et chronique.

Audrey Charlier-Tous

► **To cite this version:**

Audrey Charlier-Tous. Détection des Anticorps anti-HLA-G chez les patients transplantés -impact sur la survenue de rejet aigu et chronique.. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-02408825

HAL Id: hal-02408825

<https://ephe.hal.science/hal-02408825>

Submitted on 13 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
Présenté par
Audrey Charlier-Tous

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Détection des Anticorps anti-HLA-G chez les patients transplantés
- impact sur la survenue de rejet aigu et chronique

Soutenu le 25/11/2019

Devant le jury suivant :

- *M CANQUE Bruno* – **Président**
- *M PICARD Christophe* – **Tuteur scientifique**
- *M DUTOUR Olivier* – **Tuteur pédagogique**
- *Me BERNARD Ghislaine* – **Rapporteur**
- *M HUBERT Lucas* – **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

M PICARD Christophe

Intitulé de la structure d'accueil : Biologie des Groupes Sanguins, UMR7268
ADES, AMU/EFS/CNRS Faculté de Médecine Timone 4ème étage aile Rouge, 27
bd Jean Moulin 13005 Marseille

Directeur : *M BAILLY Pascal*

et de

M DUTOUR Olivier

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : Laboratoire d'Anthropologie biologique
de l'EPHE (laboratoire Paul Broca) - UMR 5199 PACEA – Equipe A3P – Bat. B8 -
Allée Geoffroy Saint Hilaire. CS 50023 - 33615 PESSAC cedex

Directrice : *Me DELAGNES Anne*

**Détection des Anticorps anti-HLA-G chez les patients transplantés
- impact sur la survenue de rejet aigu et chronique**

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je remercie tous les acteurs qui ont joué un rôle et soutenu dans la réalisation de ce projet. Je tiens à remercier quelques personnes plus particulièrement :

Au Dr Pascal BAILLY pour m'avoir proposé de réaliser ce diplôme EPHE et conseillé. Au Pr Jacques CHIARONI pour m'avoir permis de réaliser cette formation et pour tout le soutien matériel.

Sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour : A toi Christophe PICARD. Merci pour ta confiance, ta bienveillance et ton aide précieuse. Merci pour avoir été mon tuteur scientifique. J'exprime également ma gratitude à Lucas HUBERT, qui fut un référent impliqué et qui m'a aiguillé sur l'ensemble du travail accompli lors de la dernière année et m'a beaucoup appris.

A vous, Professeur Ghislaine BERNARD, je suis vraiment très honorée que vous soyez le rapporteur de mon travail.

A mon tuteur pédagogique, M. Olivier DUTOUR. Vous avez été le lien avec l'école. Je vous remercie d'avoir été une source de conseils et d'informations.

A vous M. Bruno CANQUE, je suis honorée que vous soyez à la présidence de ce jury.

Mes pensées se tournent également vers les membres, chercheurs et ITA, de l'équipe de Recherche EFS Marseille "Biologie des Groupes Sanguins" UMR 7268. Vous m'avez entouré d'une atmosphère bienveillante, conseillé et aidé. Recevez mes remerciements chaleureux. Je vous suis reconnaissante pour vos explications, votre disponibilité et votre bienveillance.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire HLA du site de Baille. Et plus particulièrement les techniciens du secteur "immunologie plaquettaire", pour leur accueil et leur conseil.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	9
INTRODUCTION	12
1. Le contexte particulier de la Transplantation.....	12
2. Le système HLA (<i>Human Leukocyte Antigen</i>).....	12
2.1. Notions générales	12
2.2. Structure de la molécule HLA de classe I.....	15
3. Les molécules HLA de classe I “Non-Classique” (Ib).....	16
3.1. La molécule HLA-G.....	17
3.2. La molécule HLA-E.....	19
4. Relation entre risque de rejet et molécule HLA en contexte de transplantation ..	20
5. Les anticorps en Transplantation	20
5.1. Allo-anticorps anti HLA : <i>Donor-Specific Antibody</i> (DSA).....	21
5.2. Anticorps “Naturels” HLA ou “NDSA” (Anticorps Non Spécifiques du Donneur)	22
5.3. L’IVig (Intraveineuse Immunoglobuline) supplantée par un anticorps monoclonal anti-HLA-E	23
5.4. Anticorps anti-HLA non classique dans les maladies auto-immunes	24
HYPOTHESE ET OBJECTIFS.....	26
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	28
1. Sérums/plasmas.....	28
2. Création des lignées cellulaires SPI-801 “Transduites”	28
2.1. Entretien des cellules SPI-801 “Transduites”	29
2.2. Création des cinq lignées SPI-801 “Transduites”	29
3. Étude des protéines membranaires sur les cinq lignées “Transduites”, par la technique de cytométrie en flux.....	37
4. Étude des protéines membranaires sur les cinq lignées “Transduites”, par la technique de Western-Blot	40
5. Techniques d’immunoprécipitation révélée par ELISA	42
RESULTATS.....	46
1. Qualification des cinq vecteurs de transferts issus de la lignée SPI-801 “Transduites”	46
1.1. Qualification de l’expression protéique des cellules “Transduites” SPI-801	47
1.1.1. Vérification de l’expression protéique des lignées HLA-G	47
1.1.2. Vérification de l’expression protéique des lignées HLA-E	50
2. Validation de la méthode de détection	52

2.1. Immobilisation de la molécule HLA-G suite à sa capture par un anticorps anti-B2M.....	54
2.2. Validation de la capture de la molécule HLA-G par un anticorps monoclonal de souris spécifique.....	56
2.3. Identification du contrôle positif du test MAIGA.....	57
3. Optimisation du protocole MAIGA (<i>Monoclonal Antibody-specific Immobilization of HLA-G Antibody</i>)	59
3.1. Concentration en cellules	60
3.2. Concentration en sérum.....	61
3.3. Concentration de l'anticorps de capture	62
4. Validation d'un test de dépistage et d'identification.....	63
5. Recherche d'anticorps anti-HLA-G chez les sujets sains, les femmes ayant accouché et les transplantés pulmonaires.....	64
5.1. Les sujets sains et les femmes ayant accouché	65
5.2. Les transplantés pulmonaires	66
DISCUSSION	70
CONCLUSION/PERSPECTIVES	78
ANNEXES	80
RÉFÉRENCES.....	82

TABLES/TABLEAUX/FIGURES

FIGURE 1: CARYOTYPE HUMAIN	13
FIGURE 2: ORGANISATION ET LOCALISATION GENETIQUE DU COMPLEXE HLA	14
FIGURE 3: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MOLECULE HLA DE LA CLASSE I	15
FIGURE 4: ISOFORMES DE LA MOLECULE HLA-G	17
FIGURE 5: PRINCIPE DU SEQUENÇAGE METHODE SANGER	30
FIGURE 6: STRUCTURE DU VECTEUR LENTIVIRAL PWPXL (ADDGENE #12257).....	32
FIGURE 7: STRUCTURE DU SITE D'INSERTION DU VECTEUR LENTIVIRAL PWPXL PRESENTANT LE TRANSGENE HLA-G*01 :01, AVEC SES SITES DE RESTRICTION A BOUTS COHESIFS	32
FIGURE 8: PRINCIPE DE CLONAGE.....	34
FIGURE 9: REPRESENTATION DU PRINCIPE DU WESTERN-BLOT.....	40
FIGURE 10: PRINCIPE DE LA TECHNIQUE MAIPA INDIRECTE.....	42
FIGURE 11: SCHEMA DU PRINCIPE DE DETECTION EN AC ANTI-HLA-G (OU -E) READAPTE DU PROTOCOLE MAIPA DE APDIA.....	44
FIGURE 12: SEQUENÇAGE DES ZONES D'INSERTIONS DU TRANSGENE DANS LE VECTEUR DE TRANSFERT PWPXL	46
FIGURE 13: HISTOGRAMME REPRESENTATIF D'UNE CARACTERISATION PAR CMF DU CLONE EXPRIMANT L'ALLELE HLA-G*01:01 (G101)	48
FIGURE 14: EXPRESSION DE HLA-G DANS LES CLONES SELECTIONNES	48
FIGURE 15: HISTOGRAMME DES INTENSITES DE FLUORESCENCE (MFI) SUR LES CLONES SELECTIONNES POUR CHACUN DES 3 ALLELES HLA-G.....	49
FIGURE 16: EXPRESSION DES ISOFORMES HLA-G SUR LES CLONES SELECTIONNES	50
FIGURE 17: EXPRESSION DE HLA-E SUR LES CLONES SELECTIONNES.....	50
FIGURE 18: EXPRESSION DES ISOFORMES HLA-E SUR LYSAT CELLULAIRE TOTAL.....	51
FIGURE 19: TRANSPOSITION DU PROTOCOLE MAIPA POUR LA DETECTION D'ANTICORPS ANTI-HLA-G	53
FIGURE 20: SCHEMATISATION DU PROTOCOLE MAIPA/WESTERN.....	55
FIGURE 21: RESULTATS REPRESENTATIFS DU MAIPA/WESTERN.....	57
FIGURE 22: CARACTERISATION DU SIGNAL EN FONCTION DE L'ANTICORPS DE CAPTURE.....	58
FIGURE 23: ÉVALUATION DE LA QUANTITE DE CELLULES SUR LE SIGNAL DETECTE	60
FIGURE 24: OPTIMISATION DE LA QUANTITE DE CELLULES SUR LE SIGNAL DETECTE	61
FIGURE 25: EFFET DE LA CONCENTRATION EN SERUM SUR LE SIGNAL NEGATIF (GAUCHE) ET POSITIF (DROITE)	62
FIGURE 26: EFFET DOSE DE LA CONCENTRATION EN ANTICORPS DE CAPTURE MEM-G9.....	63
FIGURE 27: EVALUATION DU SIGNAL NEGATIF ET POSITIF SUR UN MIX DE CELLULES (POOL)	64

.....

TABLE 1: PRESENTATION DE LA COHORTE DE SUJETS SAINS/GROSSESSES	66
TABLE 2: RESULTATS DE LA COHORTE DE SUJETS SAINS/GROSSESSES.....	66
TABLE 3: COHORTE DES PATIENTS TRANSPLANTES PULMONAIRES : RESULTATS ET DESCRIPTION	69
TABLE 4: RESULTATS (DO) DE LA COHORTE DE SUJETS SAINS : FEMMES	80
TABLE 5: RESULTATS (DO) DE LA COHORTE SUJETS SAINS : HOMMES	81

.....

TABLEAU 1: RECAPITULATIF DES ANTICORPS UTILISES.....	39
--	----

Liste des abréviations

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.
 ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire.
 Ac : anticorps.
 Ag : antigène.
 [Ag/Ac] : complexe antigène / anticorps.
 AMR : *Antibody Mediated Rejection* : (rejet induit par les anticorps).

B

B2M : B₂-Microglobuline.
 BSA : *Bovine Serum Albumin*.

C

C° : degré Celsius.
 Ca : calcium.
 CD : Classe de Différenciation.
 CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène.
 CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité.
 CMF : cytométrie en flux.

D

dNTP : Désoxyribonucléotides.
 ddNTP : DiDesoxyribonucléotide.
 DO : densité optique.
 DSA : *Donor Specific Antibody* (Anticorps spécifique du donneur).

E

EDTA : acide Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique.
 EF1 α : *Elongation Factor 1 alpha*.
 EGFP : *Enhanced Green Fluorescent Protein*.
 ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*.

G

g : unité de centrifugation.
 G101 : protéine HLA-G*01:01.
 G104 : protéine HLA-G*01:04.
 G106 : protéine HLA-G*01:06.
 GvHD : *Graft versus Host Disease* (Maladie du greffon contre l'hôte).

H

h : heure.
 HLA : *Human Leukocyte Antigens*.
 HLA Ia : HLA de classe I "classique".
 HLA Ib : HLA de classe I "non-classique".
 HRP : *Horseradish Peroxydase*.
 (H+L) : (*Heavy + Light*) : Chaîne lourde et chaîne légère.

I

IgG : Immunoglobuline de type G.
 IgM : Immunoglobuline de type M.
 IgA : Immunoglobuline de type A.
 IL : Interleukine.
 ILT : Interleukine Transmembranaire.

IVig : *IntraVenous immunoglobulin* : préparation thérapeutique d'Immunoglobuline intraveineuse.

J

J+X: X jours depuis l'évènement.

K

kb : kilo base.

kDa : kilo Dalton.

L

LED : Lupus Erythémateux Disséminé.

LTR 5' : *Long Terminal Repeat sequence en 5'*.

LTR 3' : *Long Terminal Repeat sequence en 3'*.

M

MAIPA : *Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen*.

MAIGA : *Monoclonal Antibody-specific Immobilization of HLA-G Antibody*.

MFI : *Mean Fluorescence Intensity*.

Mg : magnésium.

µL : microlitre.

µm : micromètre.

mL : millilitre.

mM : millimolaire.

min : minute.

MOI : *Multiplicity Of Infection* (Nombre de particules virales nécessaires à l'infection).

N

nb : nombre.

ng : nanogramme.

NK : *Natural Killer*.

nm : nanomètre.

P

PBS : *Phosphate Buffered Saline*.

Pb : paire de base.

P.V : particule virale.

R

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute 1640*.

S

sec : seconde.

Sérum CONTR. HLA : sérum contrôle positif HLA.

Sérum CONTR. NÉG. : sérum contrôle négatif HLA.

SBF : Sérum Bovin Fœtal.

T

TA : température ambiante.

TSA : gélose Trypticase Soja Agar.

TRALI : *Transfusion-Related Acute Lung Injury* : Lésion pulmonaire aiguë liée à la transfusion.

U

UTR : *Untranslated Transcribed Region*.

V

VSVG : *Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein*.

W

WPRES : *Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element*.

WT : *Wild-Type* = sauvage.

Pour notre étude nous nous intéresserons à la détection d'anticorps dirigés contre deux molécules HLA non classique : HLA-E et HLA-G. Elles jouent un rôle essentiel dans la tolérance en transplantations d'organes [1].

INTRODUCTION

1. Le contexte particulier de la Transplantation

En cas de perte fonctionnelle d'un organe vital, l'issue thérapeutique possible est la *Transplantation*. Elle définit l'action du transfert d'un organe d'un individu donneur vers un individu receveur.

Pratique possible depuis les années 1950, elle est aujourd'hui "usuelle". En 2018, 3546 transplantations rénales, 1323 transplantations hépatiques, 458 transplantations cardiaques, 372 transplantations pulmonaires, 78 transplantations pancréatiques, et 3 greffes intestinales ont été réalisées (données Agence de la Biomédecine). Néanmoins, elles restent complexes et présentent un risque majeur d'allo-immunisation humorale et cellulaire pour le patient. Ce risque engendre, vis-à-vis du greffon, la perte fonctionnelle voire le décès du patient. Les avancées sur les drogues immunosuppressives permettent de limiter ce risque de rejet aigu ou chronique sur le court terme. Des recherches sont menées pour améliorer les outils de diagnostics d'évolution de la greffe, l'enjeu étant de limiter les dysfonctions sur le long terme.

2. Le système HLA (*Human Leukocyte Antigen*)

2.1. Notions générales

Tous les mammifères présents sur terre, comportent un groupe de gènes étroitement liés, qui contrôle la reconnaissance entre les cellules. Chez l'Homme, il s'agit du système HLA (*Human*

Leukocyte Antigen) également nommé Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Ce système permet la distinction entre le « soi » et le « non soi », c'est lui qui définit l'histocompatibilité. En contexte de transplantation, c'est ce système HLA qui détermine, en grande partie, si un tissu transplanté doit être accepté ou rejeté. Il est quasiment impossible de retrouver deux individus non apparentés possédant des groupes de gènes HLA identiques. Ce système présente une très grande diversité due à des recombinaisons génétiques. La fréquence de ces recombinaisons alléliques est faible (0.5%), mais rapportées sur l'ensemble des générations humaines, le nombre devient très étendu.

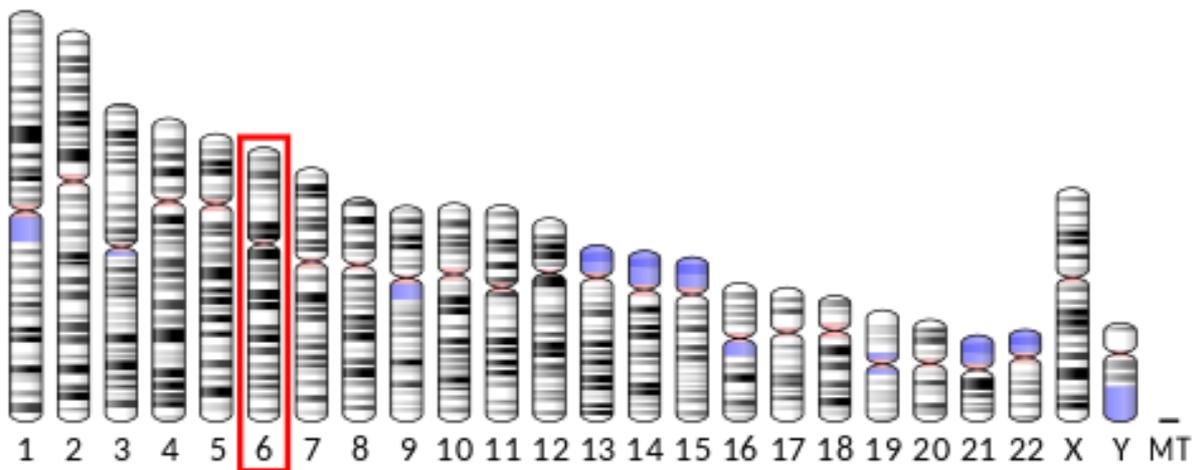


Figure 1: Caryotype humain

Source : Wikimédia

Le système HLA est localisé sur le chromosome 6 chez l'Homme et s'étale sur 4000kb. Les gènes qui constituent ce système sont compartimentés en trois grandes classes : les gènes de la classe I "Classique" (Ia) qui codent pour les HLA classique HLA-A, HLA-B, HLA-C. Ils sont présents sur toutes les cellules, et jouent un rôle essentiel dans la présentation des antigènes peptidiques aux lymphocytes T cytotoxiques. Également, les gènes HLA de classe I "Non-Classique", qui codent pour HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-X et MIC. Seuls quelques types cellulaires spécifiques expriment ces molécules HLA de classe I "Non-Classique" et jouent un rôle immunitaire spécialisé mais encore mal connu. Le système HLA, compte aussi une région pour les gènes HLA de classe II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) qui

sont exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B). Les gènes de classe III, codent pour différentes protéines sécrétées, telles que le Complément ou d'autres protéines qui sont impliqués dans l'inflammation. Pour notre étude, seules les molécules HLA de classe I seront développées.

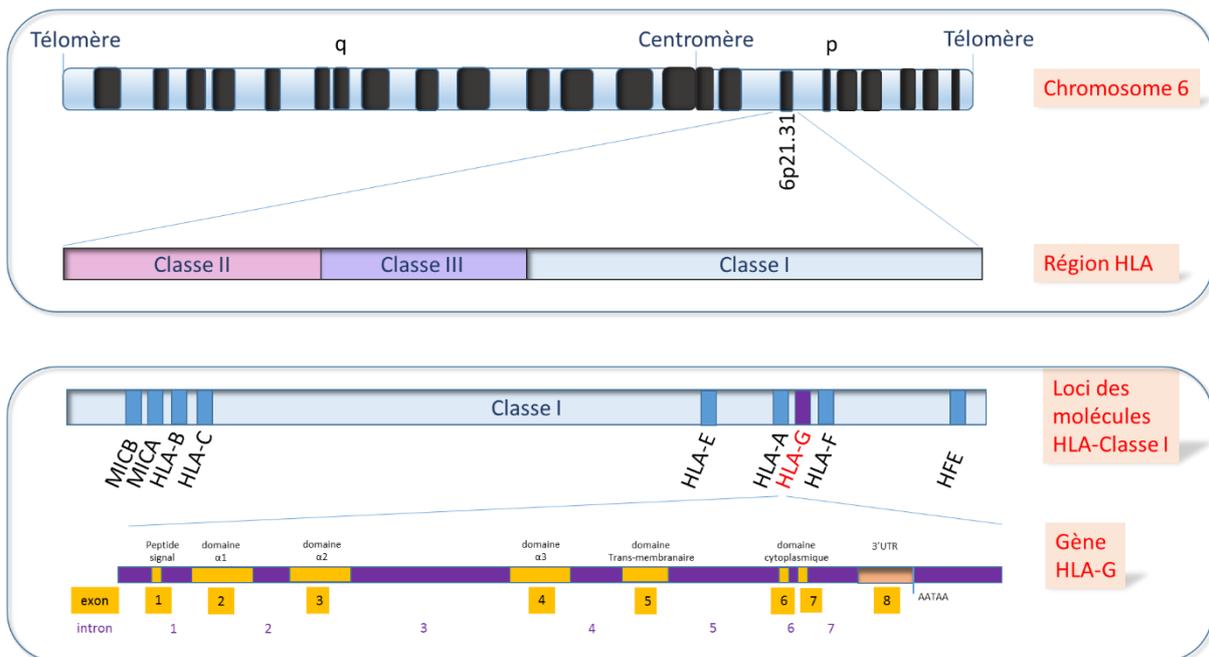


Figure 2: Organisation et localisation génétique du complexe HLA

(D'après la thèse de Federico Carlini et Atlas généticoncology.org)

2.2. Structure de la molécule HLA de classe I

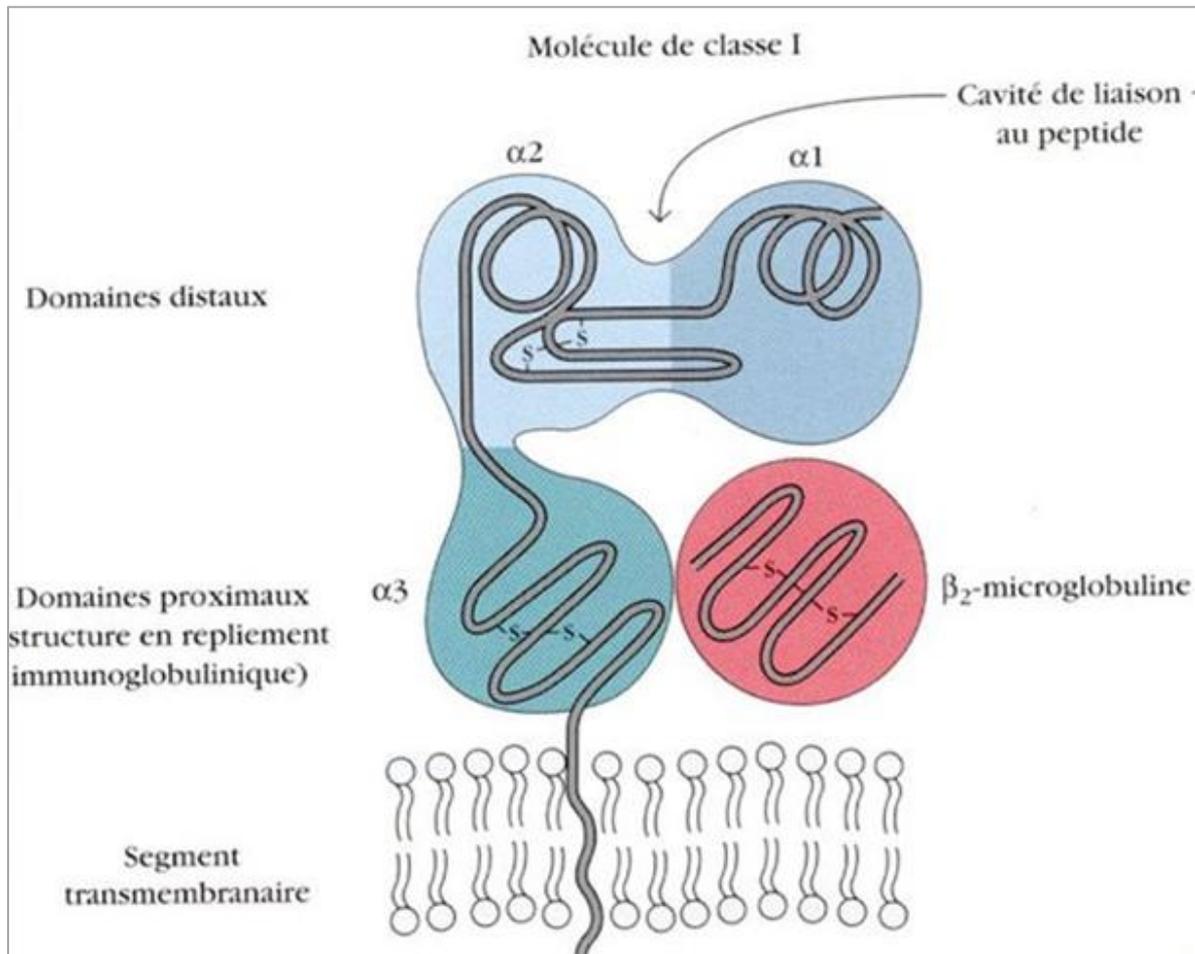


Figure 3: Représentation schématique de la molécule HLA de la classe I

Visualisation des domaines externes, segments transmembranaires et queues cytoplasmiques, des cavités de liaison au peptide. Source "Immunologie", le cours de Janis Kuby

La molécule de classe I est une glycoprotéine transmembranaire retrouvée sur la surface des cellules. Elle est constituée d'une grande chaîne α et liée de façon non covalente à un domaine appelé B_2 -microglobuline (gène codé par le chromosome 15). Pour être exprimée à la membrane d'une cellule, la molécule HLA doit impérativement être associée à cette B_2 -microglobuline. La chaîne α de la molécule HLA est de 45kDa, et celle de la B_2 -microglobuline est de 12kDa. Ainsi la molécule HLA de classe I native est de 57kDa.

La structure de la molécule HLA de classe I présente trois parties : la première partie, la chaîne α qui a trois domaines : $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$. Chaque domaine de cette chaîne α est constitué de 90 acides

aminés, et sont codés par les exons 2 à 4. Les domaines externes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment un site de fixation pour les peptides antigéniques (niches peptidiques). Le polymorphisme de la niche peptidique entre les individus, est issu d'un large répertoire allélique, et qui se traduit par un éventail d'antigènes. La seconde partie, de 25 acides aminés est transmembranaire. Une troisième partie, de 30 acides aminés, constitue la queue cytoplasmique.

Les gènes codant les molécules HLA (*Human Leukocyte Antigens*) sont les plus polymorphiques du génome humain et plus de 10 000 allèles ont été répertoriés [3]. Ce polymorphisme touche principalement des acides aminés localisés dans la niche peptidique et se traduit par des répertoires d'antigènes variés et des réponses immunitaires différentes entre les individus. Le polymorphisme confère d'ailleurs aux molécules du CMH des propriétés antigéniques intrinsèques induisant le rejet de greffes lors des transplantations d'organes entre individus incompatibles.

3. Les molécules HLA de classe I "Non-Classique" (Ib)

Les molécules HLA-E, HLA-F, HLA-G et HLA-H, HLA-J, HLA-X et MIC sont les molécules HLA de classe I "Non-Classique". Certains sont des pseudo-gènes, c'est-à-dire aucune protéine n'est produite. D'autres ont la même structure que les molécules HLA de classe I "Classique". Pour autant, les molécules HLA de classe I "Non-Classique" se distinguent notamment par la faible variabilité au niveau de la niche peptidique, la profondeur de cette dernière et une large sélection de ligands possibles.

Dans le cadre de notre étude, nous recentrons nos observations sur les molécules HLA-G avec un poids moléculaire de 39kDa, et HLA-E de 43kDa. Ce sont des déterminants antigéniques peu polymorphes qui jouent un rôle capital dans la régulation de la tolérance immunitaire. Les molécules HLA-G et HLA-E ont des propriétés à la fois anti-inflammatoires et

immunosuppressives humorales et cellulaires, en inhibant en particulier la fonction cytotoxique des cellules NK et des sous-populations lymphocytaires T et B [2].

Ainsi, de façon générale, les molécules HLA non classique ne participent pas à l'immunité adaptative, mais dans un microenvironnement particulier, avec la présence de certains peptides, seules les molécules HLA-E peuvent présenter des peptides le plus souvent viraux aux lymphocytes T [3]. Ceci suggère que certaines molécules HLA non classique seraient les précurseurs de l'immunité adaptative et pourraient établir un lien entre l'immunité innée et l'origine de l'immunité adaptative.

3.1. La molécule HLA-G

La molécule HLA-G (39kDa) exprimée par les cellules du système immunitaire et les cellules épithéliales, intervient dans les mécanismes de tolérance périphérique en transplantation d'organe, en inhibant les effecteurs d'allo-immunisation par des récepteurs spécifiques et constitue ainsi une protection contre la réaction de rejet [4]. Elle connaît différents niveaux de polymorphismes.

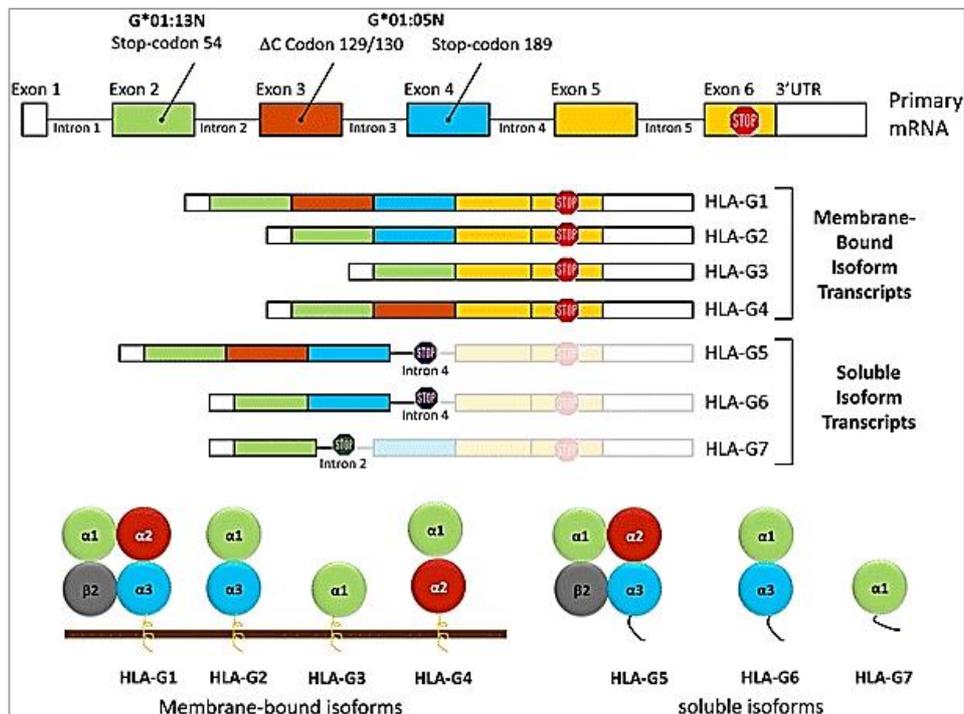


Figure 4: Isoformes de la molécule HLA-G

Quarante-quatre allèles HLA-G sont actuellement identifiés dont seulement 5 (HLA-G*01 :01, G*01 :03, 01 :04, G*01 :05N et G*01 :06) sont retrouvés avec une fréquence > 5% dans l'ensemble des populations [5].

La fréquence des isoformes est relativement stable entre les différentes populations du monde. Au contraire des molécules HLA classique, les régions régulatrices en 5' et 3' du gène allant de la position -1600 à +3300 sont très polymorphes. Ces derniers semblent affecter l'expression des différents transcrits HLA-G et la production d'HLA-G soluble chez les sujets sains [6]. L'ensemble de ces polymorphismes associés aux allèles HLA-G définissent 9 haplotypes avec une fréquence > 1%, conservés dans les différentes populations. Notre équipe et d'autres ont montré que ces haplotypes pouvaient déterminer des populations de niveaux de production différentiels de HLA-G soluble. Ainsi, l'haplotype UTR-2 produit des taux plus faibles d'HLA-G soluble que les autres haplotypes [5, 7].

Des épissages alternatifs et des modifications traductionnelles constituent différents isoformes HLA-G. L'existence d'un épissage alternatif du transcrit primaire du gène HLA-G conduit à 7 transcrits secondaires générant 7 isoformes protéiques. Parmi ces isoformes, on dénombre 4 protéines membranaires (HLA-G1 à HLA-G4) et 3 protéines solubles (HLA-G5 à HLA-G7) [8]. L'isoforme HLA-G1 correspond à la protéine complète similaire aux protéines HLA classique. Les isoformes HLA-G2 et HLA-G3 sont respectivement dépourvues des domaines $\alpha 2$ et $\alpha 2/\alpha 3$. Ces isoformes membranaires peuvent se retrouver sous forme soluble après clivage protéolytique au niveau de la membrane plasmique. Les isoformes solubles sécrétées HLA-G5 et HLA-G6 correspondent respectivement aux isoformes membranaires HLA-G1 et HLA-G2. L'existence d'un codon STOP au niveau de leur région 5' de l'exon 4 confère une queue, de 21 acides aminés, impliquée dans leur solubilité. L'isoforme soluble HLA-G7 est composée du domaine $\alpha 1$ qui est ainsi le seul domaine commun à toutes les isoformes de HLA-G.

L'augmentation de l'expression ou de la production d'HLA-G a été mise en évidence par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 dans un mécanisme de feed-back positif [8].

Les molécules HLA-G reconnaissent différents récepteurs, mais il semble que les récepteurs ILT-2 et ILT-4, sont les principaux vecteurs des propriétés tolérogènes de HLA-G. Ils interagissent avec le domaine extra-membranaire alpha3 [9].

3.2. La molécule HLA-E

La molécule HLA-E (43kDa) est exprimée sur les cellules endothéliales, les cellules du système immunitaire et les cellules du trophoblaste. Une augmentation de l'expression cellulaire de l'antigène HLA-G après inflammation, peut induire la libération de l'antigène HLA-E en circulation [10].

La molécule HLA-E a un polymorphisme plus limité avec neuf allèles actuellement identifiés dont seulement deux sont détectés dans les populations humaines avec des fréquences similaires d'environ 50% [11]. Ces isoformes diffèrent au niveau du codon 107 (R/G), codant pour deux protéines : HLA-E^R (E*01:01) et HLA-E^G (E*01:03) respectivement. HLA-E*01:03 est associée à une meilleure affinité peptidique, à un niveau plus élevé d'expression à la surface de la cellule et à un plus grand potentiel d'inhibition de l'activité lytique des cellules NK et lymphocytes T. Une caractéristique importante est qu'HLA-E est exprimée à la surface des cellules seulement si au préalable un peptide signal/leader est chargé/fixé. Le peptide leader est un nonamère dérivé de la séquence signal d'une autre molécule HLA, préférentiellement de HLA-G [12]. Ce complexe interagit avec CD94 / récepteur NKG2 sur les cellules NK, en particulier avec les inhibiteurs CD94-NKG2A. Ainsi, les protéines membranaires et solubles HLA-G protègent directement les cellules des réponses immunitaires via les cellules NK et indirectement par l'activation de l'expression de surface HLA-E [13].

4. Relation entre risque de rejet et molécule HLA en contexte de transplantation

Comme la molécule HLA-E, la molécule HLA-G, augmente son expression membranaire et soluble en contexte inflammatoire. Certaines isoformes de HLA-G et HLA-E semblent être des marqueurs de mauvais pronostics de transplantations. En transplantation pulmonaire, les isoformes HLA-G*01:04 et HLA-E*01 :03 prédisent une évolution péjorative, augmentant le risque de rejet aigu et chronique. Également, la production d'allo- ou d'auto-anticorps dirigée contre ces molécules peut influencer le pronostic clinique du patient [14, 15].

Par ailleurs, l'inhibition des molécules régulatrices HLA-G provoque une diminution de la tolérance chez le patient. En contexte inflammatoire, après transplantation, des molécules HLA-E solubles, secondaires à un clivage de la forme membranaire, peuvent être relarguées. Ces protéines se caractérisent par une absence de la B₂-microglobuline laissant libre des antigènes cryptiques du domaine alpha3 qui entraînent la production d'anticorps anti-HLA-E. [16]. Ces anticorps anti-HLA-E ont été mis en évidence dans un certain nombre de pathologies inflammatoires de l'appareil vasculaire [17].

5. Les anticorps en Transplantation

Les rejets aigus après transplantation peuvent être d'origine cellulaire (réactivité des cellules T cytotoxiques ou *Natural Killer* contre le greffon), humorale (avec des apparitions d'anticorps dirigés contre le greffon) ou mixte. Quel que soit le greffon, la fréquence du type de réactivité est dans 95% cellulaire ou mixte. Cependant, bien que plus rare, les rejets aigus d'origine humorale sont confrontés à une problématique de prise en charge thérapeutique efficace. Différents types d'anticorps sont recherchés chez les patients transplantés : les anticorps issus d'une allo-immunisation, le plus souvent contre les molécules HLA classique (DSA) et les auto-anticorps dirigés contre des antigènes le plus souvent exprimés fortement par les cellules endothéliales.

5.1. Allo-anticorps anti HLA : *Donor-Specific Antibody (DSA)*

La détection des allo-anticorps anti-HLA, est associée à des évènements immunisants tels que la transfusion sanguine, la transplantation d'organe ou plus fréquemment la grossesse. Ils ciblent les molécules HLA classique de classe I : HLA-A, -B et -C, et les molécules HLA de classe II : HLA-DR, -DQ et -DP.

Deux types de DSA existent : Les DSA préformés sont les anticorps anti-HLA associés au rejet aigu ou hyper aigu (*Antibody Mediated Rejection = AMR*). Ils sont déjà présents chez le patient avant transplantation. Le test de compatibilité *Cross-Match* avant la réalisation d'une transplantation qui est la réactivité des sérums du patient contre les cellules du donneur associé à une recherche régulière d'une allo-immunité chez le patient avant transplantation, ont permis la disparition du rejet hyper-aigu et une limitation de rejet aigu précoce après transplantation.

Les DSA *de novo* sont les anticorps anti-HLA associés au rejet aigu et chronique, qui peuvent apparaître n'importe quand après transplantation. Leur production est associée à un mauvais pronostic. Les patients qui présentent ces anticorps ont une survie de 10 ans de moins [18]. L'incidence de ces DSA *de novo* provient d'une immunosuppression insuffisante. Les DSA *de novo* ont pour cible l'endothélium du receveur, entraînant soit directement la mort cellulaire par signal apoptotique sur la cellule cible, soit indirectement en engageant la cascade du complément ou une réactivité humorale cellulaire, par engagement des récepteurs FC des Immunoglobulines, provoquant la mort de la cellule cible. Cette agression dirigée contre l'endothélium se traduit par un risque cardiovasculaire accru et une dysfonction du greffon. La prévention de ce risque, associée à la présence chez le receveur d'anticorps dirigés contre l'organe greffé, constitue un enjeu majeur de la gestion et du suivi des transplantations [19].

Deux techniques sont aujourd'hui utilisées en routine pour la recherche des anticorps anti-HLA chez les patients avant et après transplantation d'organe.

La technique LCT, peu sensible, révèle l'activité lytique humorale dépendante du Complément sur les cellules qui lie l'anticorps [20]. C'est la technique de choix de la sélection finale du greffon (*cross-match*) car elle évalue la lyse des cellules du donneur en présence de sérum du receveur. De même, des tests de liaison par cytométrie en flux semblent prédictifs des rejets aigus. Cependant la détection des spécificités dirigées contre les molécules HLA de classe II est difficile de part une auto-fluorescence des lymphocytes B [21].

Les tests luminex détectent de manière très sensible les anticorps HLA anti-greffons, mais leur valence fonctionnelle est actuellement discutée et ceux-ci ne permettent d'anticiper qu'un tiers des rejets aigus humoraux [22]. De même, plusieurs articles sont contradictoires sur l'intérêt de la détection des DSA avant greffe [23] [24]. Actuellement, cette technique est utilisée pour déterminer les patients immunisés de ceux qui ne le sont pas. Ces résultats sont à la base des scores d'accès des patients en attente de greffon rénal [25]. Des études rétrospectives sont contrastées sur la morbidité des patients pour lesquels des anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon rénal ont été détectés par le luminex. Ces différences sont probablement secondaires au niveau du seuil de détection des anticorps anti-HLA et à leur morbidité associée [26].

5.2. Anticorps "Naturels" HLA ou "NDSA" (Anticorps Non Spécifiques du Donneur)

Ce sont des anticorps qui ciblent les molécules HLA également. Dans les années 1970, des anticorps de type IgM, ciblant des molécules HLA chez des hommes en absence de facteurs allo-immunisants, sont mis en évidence. Les moyens techniques de l'époque ne permettant pas d'explorer ces anticorps chez un plus grand nombre de sujets sains, cette observation fut mise de côté jusqu'en 2008, avec l'essor de la technologie Luminex. Aussi, sur une cohorte de 424 sérums de donneurs sains sans allo-immunisation préalable, plus de la moitié des sérums sont détectés positifs et présentent des anticorps anti HLA de types IgM et IgG. En outre, le test a été approfondi chez cinq de ces hommes, à partir de huit prélèvements espacés, sur un intervalle

de 6 mois. Les niveaux de détections restent inchangés [27]. Cette technique très résolutive offre une grande sensibilité et a comme particularité de présenter des antigènes dénaturés [16]. L'hypothèse principale portant sur la détection de ces anticorps anti HLA sans phénomène immunisant est : une cross-réactivité des molécules HLA avec des épitopes d'origines bactériennes ou de protéines animales, faisant d'eux des anticorps naturels. Une autre hypothèse porte sur une cross-réactivité entre les molécules HLA non classique et classique. L'origine de production de ces anticorps serait issue de molécules HLA-E solubles qui, libérées dans la circulation sans la B2M, lors de réaction inflammatoire, découvre une séquence antigénique nouvellement exposée projetant la production d'auto-anticorps anti HLA-E [28]. La dénaturation de nombreux antigènes HLA classique sur les billes permettrait de les mettre en évidence par la technique Luminex.

5.3. L'IVig (Intraveineuse Immunoglobuline) supplantée par un anticorps monoclonal anti-HLA-E

La préparation thérapeutique d'Immunoglobuline intraveineuse (IVig) a pour rôle de supprimer les IgG chez les patients transplantés sensibilisés. Elle est extraite à partir de plasma de milliers de donneurs. Une de ses caractéristiques est d'être très riche en anticorps anti-HLA-I classique et non classique. L'IVig sert à réduire la production d'allo-anticorps contre les molécules HLA classique. Il s'avère que l'IVig est riche en anticorps anti-HLA-E, et qu'en les retirant de l'IVig, la réactivité disparaît. Il a même été observé qu'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine alpha3 de la molécule HLA-E reproduit l'activité suppressive de l'IVig, envers les molécules HLA classique avec une meilleure efficacité, qui plus est en abolissant le risque de TRALI (*Transfusion-Related Acute Lung Injury*) : syndrome de détresse respiratoire qui peut survenir avec l'IVig [29].

5.4. Anticorps anti-HLA non classique dans les maladies auto-immunes

Plusieurs types d'anticorps monoclonaux anti-HLA-E ont été produits après immunisation de sa chaîne lourde [29] : des anticorps monospécifiques anti-HLA-E, des anticorps spécifiques dirigés contre les molécules HLA non classique et des anticorps polyspécifiques dirigés contre les molécules HLA classique et non classique. Il est supposé que les anticorps dirigés contre les molécules HLA non classique puissent impacter le dépistage des anticorps anti-HLA, la sélection des greffons et le devenir des transplantations d'organes. Aussi, les anticorps dirigés spécifiquement contre les molécules HLA non classique pourraient avoir un impact péjoratif sur le devenir de la transplantation. En effet, ils diminueraient la fonction de tolérance des molécules HLA non classique. Ceci s'expliquerait par l'interférence de ces anticorps entre les molécules HLA non classique et leurs récepteurs inhibiteurs et/ou la capacité de ces anticorps à se lier aux molécules HLA solubles et de les éliminer de la circulation sanguine. Il a été montré que ces anticorps peuvent se lier aux HLA non classique exprimées par les greffons induisant un rejet aigu voire une perte du greffon. De plus, les anticorps anti-HLA-E spécifiques sont capables d'augmenter la sous-population CD8 et donc la fonction cytotoxique cellulaire [30].

En contexte de maladie auto-immune, telle que la maladie lupique (LED – Lupus Erythémateux Disséminé), ont montré que certains patients pouvaient produire des anticorps cytotoxiques, suggérant que les molécules du système HLA seraient les cibles des anticorps cytotoxiques [31]. Cette maladie systémique auto-immune chronique affecte dix femmes pour un homme et touche plusieurs organes selon les individus. L'activité clinique du LED est associée à l'hyperactivation de réponses immunitaires contre des auto-antigènes [32, 33]. L'inflammation chronique augmente l'expression des molécules HLA classique mais aussi les molécules HLA non classique (HLA-E, -F et -G). Elles sont surexprimées à la surface de lymphocytes hyperactivés, puis se diffusent dans la circulation. Zhou et al ont montré que la présence d'anticorps anti-HLA classique n'était pas associée au développement du LED, ni à l'activité

de la maladie [34]. À l'aide d'une plateforme Luminex®, l'équipe de Terasaki a analysé les réactivités IgG et/ou IgM dirigées contre les molécules HLA-E, -F, et -G, chez des patients atteints de LED et chez des sujets sains [35, 36]. De manière intéressante, chez ces derniers les anticorps de type IgG anti-HLA-G étaient détectés dans 30% des cas (6/17) et étaient plus fréquents que ceux dirigés contre HLA-E et HLA-F (50%). L'équivalent de la forme HLA-G*01 :01 était liée aux billes.

Des anticorps (IgM et IgG) anti-HLA classe I non classique et anti-B2M étaient détectés chez les patients atteints de LED. Les niveaux de réactivité des IgG anti-HLA non classique étaient significativement plus élevés chez les patients atteints de LED comparés aux individus sains. Tous les patients positifs avaient des anticorps anti-HLA-F détectables avec des MFI plus élevées que celles des anti-HLA-E et -G. Il est à noter que ces réactivités sont faibles puisque la médiane de MFI était autour de 1000. L'intensité de réactivité des auto-anticorps IgG anti-HLA-F était inversement associée à l'activité, ou aux poussées de la maladie, suggérant un effet protecteur de ces anticorps. Cette tendance suggère qu'à la suite d'une poussée de la maladie, où les lymphocytes hyperactivés sur-expriment HLA-F puis les sécrètent dans la circulation, les IgG anti-HLA-F spécifiques participent à éliminer les HLA-F solubles. La prépondérance d'IgG anti-HLA-F libre suggère que la réponse immunitaire contre les HLA-F pourrait participer à la régulation de l'auto-immunité, en particulier intervenir dans l'interaction entre les HLA-F solubles et les différents récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes B et des monocytes, notamment ILT2 et ILT4 [37]. En revanche, l'implication de HLA-F, exprimée à la surface membranaire ou soluble, dans la régulation de l'auto-immunité reste à être élucidée. Par ailleurs, l'importance de monitorer les HLA-F solubles chez les patients atteints de LED est soutenue par plusieurs publications montrant que lors d'épisodes d'inflammatoires tels que ceux retrouvés dans le LED, la grossesse, les rejets aigus de greffe, la GvHD, les maladies auto-immunes, les tumeurs cancéreuses et les infections virales, le taux des molécules HLA de classe I classique et non classique solubles augmente dans la circulation [38].

HYPOTHESE ET OBJECTIFS

A la lumière des données sur le LED, les auto-anticorps dirigés contre les molécules HLA non classique pourraient participer à la régulation de l'inflammation dans certaines pathologies inflammatoires et en être des indicateurs. Ils permettraient de fournir une meilleure compréhension clinico-biologique de la maladie, de proposer de nouveaux bio-marqueurs de l'évolution de la maladie et de développer des stratégies thérapeutiques pour maintenir la maladie en rémission.

Aussi, notre hypothèse est que les molécules HLA non classique sont les cibles de réactions immunitaires humorales qui sont aujourd'hui non explorées. Ces réactions pourraient affecter le devenir des transplantés, notamment en favorisant la survenue de rejet aigu ou chronique. Notre laboratoire travaille depuis plus de 10 ans sur l'impact de l'expression des molécules HLA-G et de leur régulation sur le devenir des transplantations d'organe notamment pulmonaire. De manière intéressante, ces transplantations se caractérisent par la détection de nombreux auto-anticorps qui impactent leur devenir.

Aussi, l'objectif de mon travail a été de mettre en place une technologie de détection d'anticorps anti-HLA-G non dénaturés afin de déterminer leur prévalence chez les sujets sains, les femmes après grossesse et chez des patients transplantés pulmonaires lors de rejet aigu et chronique. Afin d'obtenir une spécificité de réaction, il a été décidé d'adapter la technique MAIPA (*Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen*) à la détection d'anticorps anti-HLA-G. Nous avons nommé ce test MAIGA (*Monoclonal Antibody-specific Immobilization of HLA-G Antibody*).

La première étape de mon travail a été de mettre en place un système cellulaire exprimant les différentes isoformes des molécules HLA-G et HLA-E. Des lignées cellulaires ont été créées à partir de transductions par technologie lentivirale, exprimant les protéines HLA-G*01:01,

G*01:04, G*01:06 et E*01:01, E*01:03. Cette technologie lentivirale a été choisie pour sa capacité à intégrer sur le long terme un transgène, et à obtenir une expression à haut titre et stable de la protéine. Après leur production, j'ai validé les cellules transduites par cytométrie en flux et Western-Blot. Dans une deuxième étape, la technique MAIGA a été mise au point, optimisée et validée. La dernière étape de mon travail a été d'évaluer la prévalence des anticorps anti-HLA-G à partir des sérums de sujets sains, de femmes ayant accouché et d'une cohorte de transplantés pulmonaires compliqués ou non de rejet aigu et/ou de rejet chronique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Sérums/plasmas

Le sérum ou plasma utilisé est récupéré après centrifugation à 800 g de sang total en tube sec ou tube sur EDTA, respectivement. De couleur jaune plus ou moins translucide, le sérum ou plasma est stocké à -80°C. Le jour de l'utilisation le sérum est dilué au 1/5^{ème} (=20%) dans du PBS.

Au total 250 sérums/plasma ont été testés :

- 90 plasmas de sujets sains dont 49 hommes *et* 41 femmes.
- 16 sérums de femmes, prélevés 3 jours après l'accouchement, présentant une incompatibilité foëto-maternelle plaquettaire.
- 144 sérums de 35 transplantés pulmonaires. Un à cinq sérums ont été testés avec 30 sérums pré-greffe (J0) et à 25 sérums à quinze jours (J15), 28 sérums à 1 mois (M1), 32 sérums à 3 mois (M3) et 29 sérums à 12 mois (M12).

2. Création des lignées cellulaires SPI-801 "Transduites"

La mise en place de la technique de détection en anticorps anti-HLA-G et anti-HLA-E, a nécessité l'utilisation de cellules n'exprimant pas les molécules HLA de classe I non classique ni (ou faiblement) les molécules HLA de classe I classique. Le modèle cellulaire retenu est la lignée humaine SPI-801-ACC-86 (DSMZ) issue de leucémie myéloïde chronique en phase aiguë (dérivée de K562). Par technologie lentivirale, cette lignée est transduite pour exprimer l'un de ces cinq allèles : HLA-G*01 :01, HLA-G*01 :04, HLA-G*01 :06, HLA-E*01 :01 et

HLA-E*01 :03, dans le but d'obtenir cinq lignées SPI-801 produisant ces cinq types de protéines membranaires.

2.1. Entretien des cellules SPI-801 "Transduites"

Ces cellules en suspension sont cultivées dans du milieu RPMI medium 1640 1X GlutaMAX-I (GIBCO, Thermo Fisher, Waltham, MA, États-Unis) contenant 1% Pénicilline/Streptomycine (GIBCO, Thermo Fisher) et 10% sérum bovin fœtal (préalablement décomplémenté 35 minutes (min) à 56°C) (GIBCO, Thermo Fisher). Maintenu en phase de prolifération entre 0.5 et 1×10^6 cellules/mL, elles sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂.

2.2. Création des cinq lignées SPI-801 "Transduites"

Préparation des vecteurs de Transferts (lentiviraux)

Également appelé cassette, ce type de vecteur permet le transport d'un gène (= insert ou encore transgène), qui est une succession d'acides nucléiques codant pour une protéine. Le vecteur présente six régions, auquel on ajoute l'insert.

✓ Les inserts HLA-G*01 :01, HLA-G*01 :04, HLA-G*01 :06, HLA-E*01 :01 et HLA-E*01 :03

Les séquences d'ADN complémentaires sont issues de IMGT (banque de données de séquences HLA). Elles codent pour HLAG*01 :01 (IMGT/HLA n°HLA00939), G*01:04 (IMGT/HLA n°HLA00949), G*01 :06 (IMGT/HLA n°HLA01357), HLA-E*01 :01 (IMGT/HLA n°HLA00934) et E*01 :03 (IMGT/HLA n°HLA00936). La région codante de chaque ADNc est amplifiée spécifiquement par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec un couple d'amorces qui encadre la région d'intérêt (sens : atgcatgcatgcggatccatggtggtcatggca et antisens : atgcatgcatgcactagttcaatctgagctcttct ; Eurogentec, Liège, Belgique). Ces amorces introduisent également des sites de restriction (BamH1 en 5' et Spe1 en 3'). Ces sites permettent d'orienter le produit de PCR lors de l'insertion dans le vecteur, au moment du clonage. Une région aspécifique d'une dizaine de nucléotides est également ajoutée aux extrémités du produit de PCR pour permettre l'encrage des enzymes de restriction lors de l'étape de digestion

enzymatique. Les réactions de PCR ont été effectuées en utilisant la *Taq DNA Polymerase haute-fidélité* (Life Technologie, Thermo Fisher) selon les conditions suivantes : 94°C pendant 2 min, suivie par 35 cycles à 94 °C pendant 30 secondes (sec), 57 °C pendant 30 sec, et 72 °C pendant 1 min ; et 72 °C pendant 10 min. Chaque produit de PCR est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose (taille de 1017 pb) et par séquençage selon la méthode de Sanger en utilisant le kit *BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies, Thermo Fisher). Succinctement, 200ng de réaction sont analysées sur le séquenceur automatique à capillaire ABI2120 (Applied Biosystems, Thermo Fisher). Les données sont alors collectées avec le logiciel *Sequencing Analysis* puis l'analyse des séquences est faite avec le logiciel *Codon-code Aligner*. A l'aide du kit "*Monarch DNA gel extraction kit*" (New England of Biolabs, Ipswich, MA, États-Unis) les inserts sont purifiés, élués dans 20µL de tampon puis quantifiés en évaluant l'intensité des bandes par électrophorèse sur gel d'agarose.

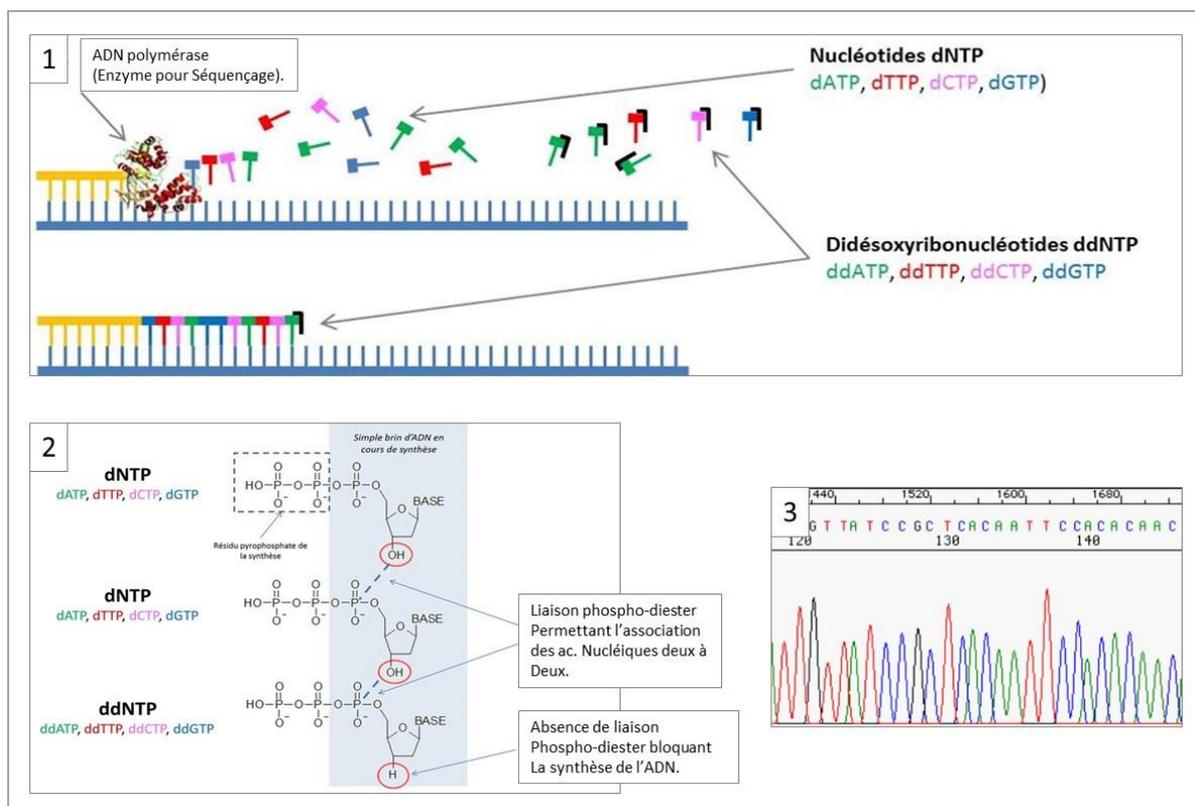


Figure 5: Principe du séquençage méthode Sanger

(1) Elongation. (2) Descriptif enchainement des acides nucléiques en Sanger. (3) Chromatogramme obtenu après passage d'une réaction sur le séquenceur. (Source Olivier Ezratti)

✓ Préparation du vecteur lentiviral

La structure du vecteur lentiviral pWPXL (Fig. 6) comprend une cassette constitutive encadrée en 5' et 3' par deux séquences LTR (*Long Terminal Repeat sequence*) (Fig. 7). Ces LTR participent à l'intégration des éléments viraux dans le génome de l'hôte. La cassette contenue entre ces extrémités est composée :

- d'un promoteur EF1 α , essentiel à la transcription par recrutement de la RNA pol II (*Elongation Factor 1 α*),
- d'une zone dite "*polylinker*", qui recense un grand nombre de sites de restriction, servant de zone d'insertion pour le transgène (ADNc à exprimer),
- d'une séquence régulatrice, WPRE (*Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element*), positionnée entre le transgène et la séquence LTR 3', pour augmenter l'expression du transgène.

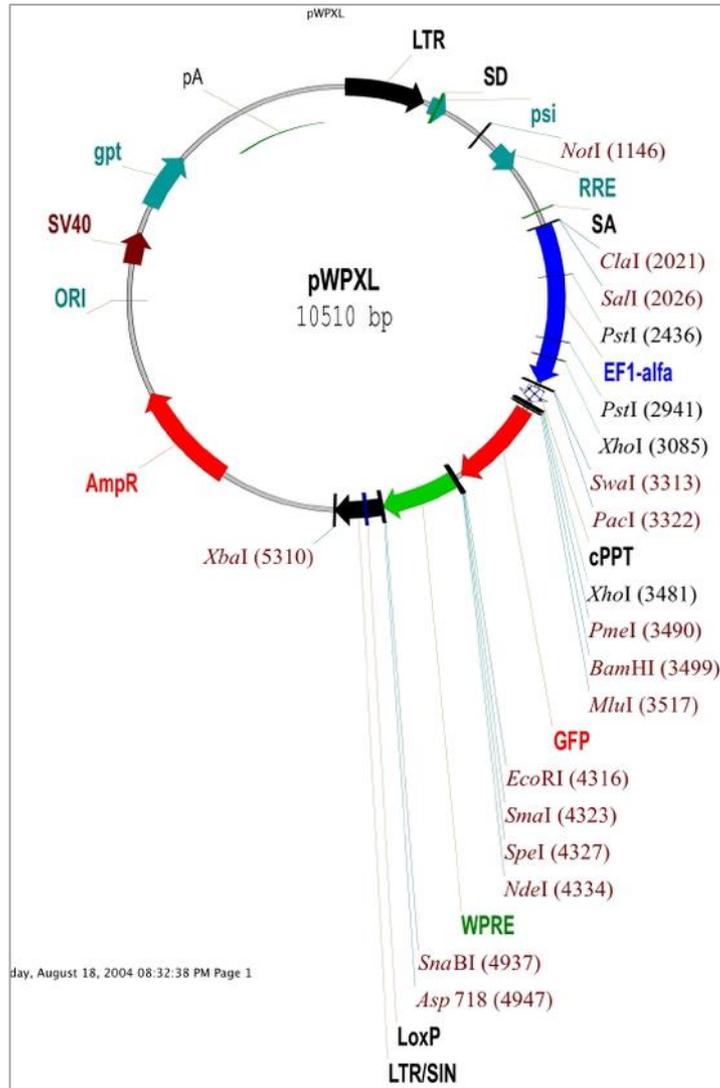


Figure 6: Structure du vecteur lentiviral pWPXL (ADDGENE #12257)

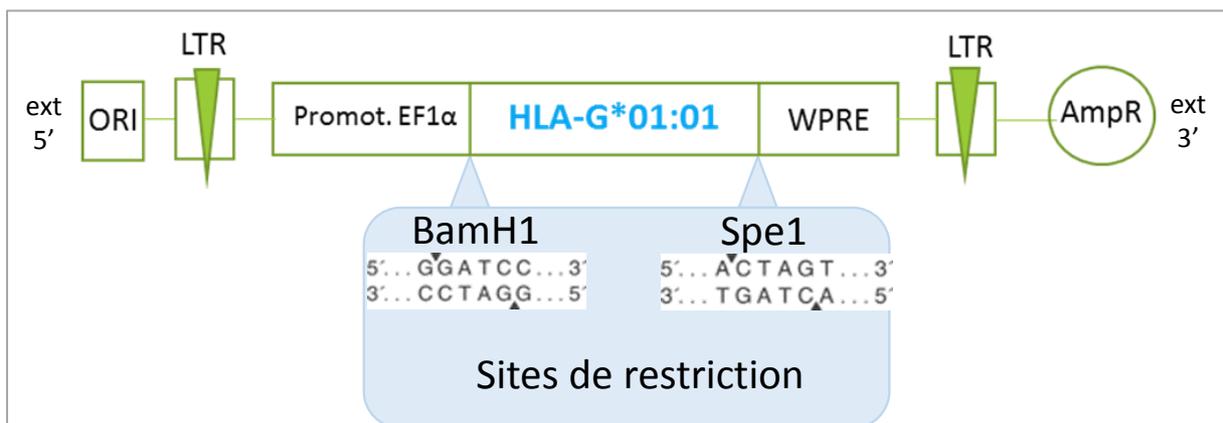


Figure 7: Structure du site d'insertion du vecteur lentiviral pWPXL présentant le transgène HLA-G*01 :01, avec ses sites de restriction à bouts cohésifs

ORI : Origine de réplication, LTR : Long Terminal Repeat, Promot. EF1 α : Promoteur Elongation Factor 1 α , WPRE : Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element, AmpR : résistance à l'ampicilline

Le vecteur pWPXL est alors amplifié par Maxiprep avec “*Plasmid mini, Midi, Maxi kit*” (Qiagen, Hilden, Allemagne) puis élué dans 300µL de Tris-HCl à 10mM. Le vecteur amplifié est vérifié par séquençage des deux brins avec l’amorce sens ttgcccttttgagtttgg et l’amorce antisens gggccacaactcctcataaa.

✓ Clonage

Une double digestion enzymatique est réalisée sur chacun des cinq produits de PCR (10µL), ainsi que sur le vecteur pWPXL (1ng) en utilisant les sites BamH1-HF et Spe1. Ces digestions sont réalisées à 37°C durant 2h dans un mix de 30µL contenant comme enzymes 1.5µL de BamH1-HF à 20.000U/µL (NEB) et 1.5µL de Spe1 à 10.000U/µL (NEB). Après électrophorèse sur gel d’agarose les produits digérés sont extraits puis purifiés avec le kit “*Monarch DNA gel extraction kit*” (NEB). L’étape de ligation (Fig. 8) est réalisée avec la T4 ligase (Promega, Madison, WI, États-Unis), avec un ratio vecteur/insert de 1/1, enfin l’incubation s’effectue au bain marie à 10°C durant la nuit. Afin d’isoler et d’amplifier chaque vecteur de transfert, une étape de transformation est réalisée pour chacun des cinq produits de ligation ainsi que pour une construction contenant l’EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Une souche d’*E. Coli* est transformée par choc thermique, selon le protocole du kit *One Shot Top 10 Chemically Competent E. Coli* (Invitrogen, Thermo Fisher). Les clones bactériens ainsi obtenus sont isolés par étalement sur une gélose Trypticase Soja Agar (TSA) (Biomérieux, Marcy-l’Étoile, France). Le criblage des colonies est réalisé par PCR. Une colonie positive pour chacun des vecteurs est sélectionnée et amplifiée par Maxiprep. Un contrôle par séquençage des deux brins est réalisé comme précédemment.

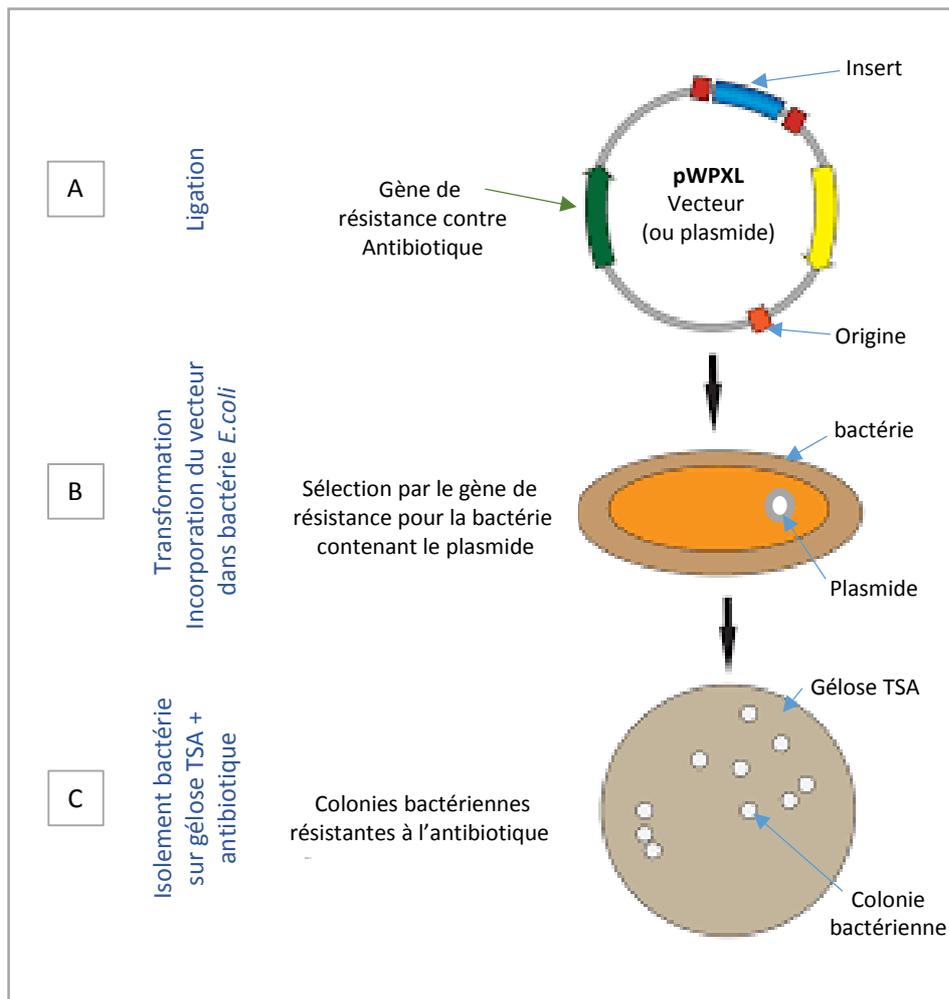


Figure 8: Principe de Clonage

- Ligation entre insert d'intérêt et vecteur (de transfert) pWPXL.
- Transformation sur souche E.Coli par choc thermique.
- Isolément des clones bactériens sur gélose TSA + antibiotique.

Source : Addgene

Expression de protéines par technologie lentivirale

Les cinq vecteurs de transferts prêts, l'étape suivante est la production des cinq particules virales qui infecteront notre modèle cellulaire SPI-801. Pour ce faire, une seconde lignée cellulaire, communément utilisée en technologie lentivirale, est sélectionnée. Il s'agit de la lignée des HEK293T (DSMZ, Brunswick, Allemagne). Cette lignée est dérivée de cellules humaines embryonnaires de rein. Elle présente l'avantage d'avoir une grande efficacité de production de particules virales.

✓ Production des particules virales : transfection sur lignée HEK293T

Les particules virales sont produites par co-transfection des HEK293T. Pour cette étape, en plus du vecteur de transfert (contenant le transgène d'intérêt), deux autres vecteurs sont nécessaires à la formation de la particule virale : le vecteur de packaging p8.91 (qui code pour les protéines gag et pol : protéines constitutives de la particule virale), et le vecteur d'enveloppe pMDG (qui code pour la protéine VSVG, molécule fusigène, afin de favoriser la fusion aux cellules). L'agent de transfection utilisé est le Polyéthylèneimine (PEI) (Thermo Fisher) à 25kD, qui, de par sa charge globale positive, rend la membrane des cellules perméable. Les particules virales ainsi produites contiennent le transgène codant pour la protéine d'intérêt. En parallèle, une production avec le vecteur pWPXL-EGFP a aussi été réalisée. Cette production EGFP est un témoin de transduction qui sert également pour la titration et la calibration de l'ensemble des productions. La co-transfection est effectuée sur les cellules HEK293T à 80% de confluence. Celles-ci sont incubées en présence des trois vecteurs et du PEI à 37°C dans une atmosphère humide en présence de 5% de CO₂. A J+1, le milieu est remplacé par du milieu de production Optimem (GIBCO, Thermo Fisher) contenant 1% Pénicilline/Streptomycine (GIBCO, Thermo Fisher). Le surnageant contenant les particules virales est récolté à J+2, J+3 et J+4. Ils sont ensuite filtrés à 0.22µm. Les particules virales sont concentrées en polyéthylène glycol 10%, (Thermo Fisher) resuspendues en PBS et stockées stérilement à -80°C pour une utilisation ultérieure.

✓ Détermination du titre en particules virales

On cherche à déterminer la MOI (*Multiplicity of infection*), qui est le nombre de particules virales nécessaires à l'infection d'une cellule. L'estimation de la MOI d'une production de particules virales est réalisée par transduction de 5×10^4 cellules de la lignée cellulaire HEK293T avec 1µL de particules virales pWPXL-EGFP. La transduction est optimisée avec l'action du polybrène (Thermo Fisher) (à 8µg/ml), polymère cationique qui augmente

l'adsorption récepteur-indépendante des virus. Les cellules sont cultivées pendant 6 jours dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO, Thermo Fisher) supplémenté avec 1% Pénicilline/Streptomycine, et 10% de SBF. La titration est réalisée par cytométrie de flux, en regardant le pourcentage de cellules fluorescentes, c'est-à-dire le nombre de cellules qui exprime l'EGFP. Ce pourcentage permet de déterminer le titre en particules virales (P.V) dans le surnageant, en considérant qu'une particule infecte une cellule. L'estimation du titre infectieux EGFP est ensuite extrapolée pour les productions de particules virales HLA-G*01 :01, G*01 :04, G*01 :06, HLA-E*01 :01 et E*01 :03 en utilisant la formule ci-dessous.

Titre viral = (% cellules EGFP positives) x (vol. P.V) x (nb de cellules) où vol. P.V. est le volume de particules virales utilisées lors de la titration.

✓ Transduction de chacune des cinq particules virales

La transduction est une technique permettant l'infection de cellules par des P.V, grâce à l'action du polybrène, qui augmente l'efficacité de transfert du gène dans la cellule, de 100 à 1000 fois lors de l'infection avec les P.V. Notre modèle cellulaire SPI-801, dérivé des cellules K562 sont des cellules humaines érythroleucémiques n'exprimant, initialement, aucune protéine HLA de classe I. Pour une transduction, 5×10^4 cellules sont placées dans un puits de plaque 96 avec $8 \mu\text{g/mL}$ de polybrène, et une MOI (ratio : nombre de P.V, pour une cellule) de 20. Cinq transductions ont été pratiquées pour chacun des cinq types de particules virales (HLA-G*01 :01, G*01 :04, G*01 :06, HLA-E*01 :01 et E*01 :03). Une transduction avec les particules virales EGFP est réalisée comme témoin. Une fois transduites, ces cellules sont cultivées pendant 6 jours, puis un immuno-marquage est réalisé afin de déterminer le niveau d'expression de chaque variant, HLA-G et HLA-E, à la surface des cellules.

✓ Sous-clonage en méthylcellulose

Pour optimiser notre modèle cellulaire en sélectionnant différents clones qui expriment le plus fortement nos protéines d'intérêts. Cette sélection de clones cellulaires est effectuée à partir de 100 cellules isolées dans un milieu de culture semi-liquide MethoCult™ (Stemcell, Vancouver, Canada). Après 14 jours d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, dix clones, formant des colonies pour chacune des cinq cultures, sont prélevés et cultivés dans du milieu de culture RPMI glutaMAX-I associé à 10% de SBF et 1% de Pénicilline/Streptomycine avec une incubation à 37°C, 5% de CO₂.

3. Étude des protéines membranaires sur les cinq lignées "Transduites", par la technique de cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant la mise en évidence des protéines à la surface des cellules, grâce à des anticorps spécifiques marqués par un fluorophore. Il s'agit d'une technique de caractérisation individuelle, qualitative et quantitative. Les cellules sont isolées en passant dans un flux liquide rapide. Après excitation du fluorophore porté par l'anticorps, une lumière est émise, amplifiée puis détectée par des capteurs. L'analyse de ces signaux permet d'obtenir les caractéristiques individuelles de chaque cellule telles que la taille, la structure interne et l'intensité de fluorescence. Les différentes analyses peuvent alors être comparées en fonction des moyennes de fluorescence (ou MFI : *Mean Fluorescence Intensity*) obtenues, représentatives du niveau d'expression ou de reconnaissance par l'anticorps.

Chaque marquage est réalisé sur 2.5×10^5 cellules. Tous les lavages sont faits avec 3ml de PBS 1X (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis) additionnés de 0.2% d'albumine sérique bovine (*Bovine Serum Albumin* ou BSA, Sigma Aldrich). Les cellules sont culottées par centrifugation à 2000 rpm durant 4 min à 4°C, suivi par l'élimination du surnageant. Les cellules, remises en suspension dans 100µL de solution de lavage, sont incubées une heure à 4°C avec soit un anticorps anti-HLA-G, soit un anticorps anti-HLA-E, soit un anticorps anti-

B2M (Tableau 1). L'anticorps anti-B2M cible la B₂-microglobuline, qui peut être associée aux molécules HLA de classe I (classique et non classique). Après un nouveau lavage, les cellules sont analysées sur le cytomètre en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, États-Unis).

Des contrôles d'isotypes sont utilisés pour évaluer le niveau de marquage non-spécifique des différents anticorps.

Tableau 1: Récapitulatif des anticorps utilisés

Type d'Anti-corps	Protéine cible	Nom Anticorps / clone	Mono / polyclonal	Fluoro-chrome	Hôte de production	Isotypes	Réaction envers l'espèce	Site immunogène (antigénique)	Fournisseur	Réf	Dilution	Techniques utilisées
Ac I°	HLA Classe 1	W6-32	Monoclonal	PE	Souris	IgG2a, kappa	anti-Humain	cible : région non polymorphique partagée par les molécules HLA de classe I	Invitrogen	12-9983-42	1/20	CMF
		MEM-147	Monoclonal	PE	Souris	IgG1	anti-Humain	Cible : forme native membranaire des molécules HLA de classe I Classique. épitope ressemblant au W6.32	Abcam	ab52451	1/20	CMF
	HLA Classe 1 sans B2M	no B2M (clone A4)	Monoclonal	APC	Souris	IgG1, kappa	anti-Humain	réagit aux molécules HLA de classe I exempt du domaine B2M. Site antigénique non précisé	Invitrogen	17-9958-42	1/20	CMF
	B2M	B2M-01	Monoclonal	PE	Souris	IgG2a	anti-Humain	B2M humaine	Thermofisher	A15770	1/20	CMF
				/					kit MAIPA	kit MAIPA	pur	MAIPA
	HLA-G (Classe 1b)	MEMG-9	Monoclonal	APC	Souris	IgG1	anti-Humain	réagit à la forme HLA-G native associée à la B2M site non précisé	Thermofisher	MA1-19465	1/100	CMF
				/					Novusbio	NB500-314	1/1000	MAIPA
		87G	Monoclonal	APC	Souris	IgG2a, kappa	anti-Humain		Thermofisher	17-9957-42	1/20	CMF
		4H84	Monoclonal	HRP (chimiluminescence)	Souris	IgG1	anti-Humain		Novusbio	NB110-55297H	1/1000	WB
	HLA-E (Classe 1b)	3D12HLA-E	Monoclonal	PE	Souris	IgG1, kappa	anti-Humain	non précisé	Thermofisher	12-9953-42	1/20	CMF
				/					Novusbio	NBP1-43124-0,1mg	1/100	MAIPA
		MEM-E/07	Monoclonal	/	Souris	IgG1	anti-Humain	chaîne lourde native	Thermofisher	MA1-19360	1/100	CMF MAIPA
MEM-E/02		Monoclonal	/	Souris	IgG1	anti-Humain	chaîne lourde dénaturée de HLA-E	Thermofisher	MA1-19309	1/500	WB	
Ac II°	Rat anti-Souris anticorps IgG1 Secondaire	M1-14D12	Monoclonal	PE	Rat	IgG1	anti-Souris	/	Invitrogen	12-4015-82	1/100	CMF
	Chèvre anti-Humain anticorps IgG, IgM, IgA (H+L) secondaire	/	Polyclonal	HRP (chimiluminescence)	Chèvre	IgG	anti-Humain	IgG / IgA / IgM	Thermofisher	A18847	1/5000	WB
				kit MAIPA					kit MAIPA	pur	MAIPA	
	Ane anti-souris anticorps IgG (H + L) secondaire	Alexa Fluor 488	Polyclonal	fluorescence	Ane	IgG (H+L)	anti-Souris	Gamma Immunoglobines chaînes lourdes et chaînes légères	Invitrogen	A21202	1/3000	WB
Anti-Souris Polyvalent anticorps (IgG,IgA,IgM)	/	Polyclonal	HRP (chimiluminescence)	Chèvre	IgG, IgA, IgM	anti-Souris	/	Sigma	A0412	1/2000	WB	

4. Étude des protéines membranaires sur les cinq lignées "Transduites", par la technique de Western-Blot

Le principe de cette technique est de mettre en présence des cellules transduites avec du sérum de patients ou sujet sain. L'objectif étant de visualiser la présence d'une bande spécifique, matérialisée par un complexe [Ag/Ac]: HLA-G / Ac anti-HLA-G, visible par chimioluminescence (Fig. 9).

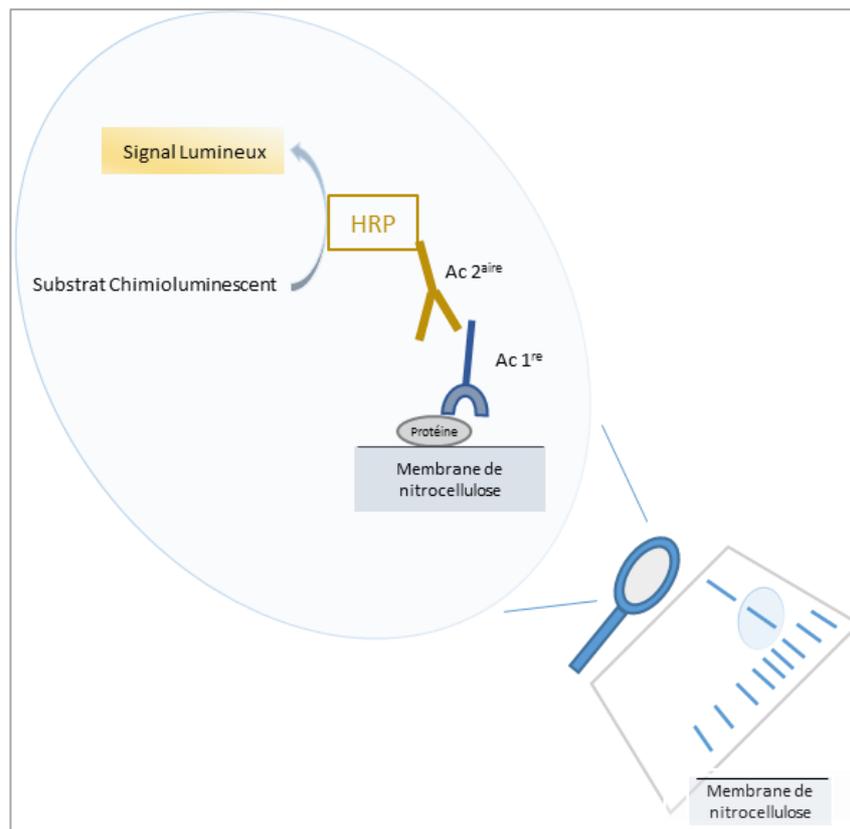


Figure 9: Représentation du principe du Western-Blot

✓ Protocole Western-Blot

Cette technique nécessite l'utilisation d'une solution qui sert à saturer la membrane et à diluer les deux Ac : PBS 1X, BSA 3% et Tween 20 à 0.05%. Et d'une solution de lavage composée de PBS 1X et de Tween 20 à 0.5%. Les lavages des membranes de nitrocellulose sont réalisés par immersion, de trois fois 10 min, avec agitation.

A partir de chaque lignée transduite, un culot cellulaire est préparé à raison de 12×10^6 cellules/mL. Après un lavage dans du PBS froid, les protéines totales sont extraites par lyse des

cellules avec du tampon RIPA (Tris-HCl pH8 25mM, NaCl 200mM, EDTA 1mM, NP40 1%) pendant 30 min dans la glace. La concentration en protéines totales est mesurée avec le kit *Pierce BCA protein Assay Kit Reducing Agent Compatible* (Thermo Fisher), selon les recommandations du fournisseur.

Les lysats totaux (30µg) additionnés de tampon Laemmli, sont dénaturés par chauffage 5 min à 95°C en présence de 1% de β-mercaptoéthanol (agent réducteur des liaisons disulfures). Les échantillons sont ensuite séparés sur un gel de polyacrylamide concentré à 10% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose en présence de 20% de méthanol. Le bon déroulement de la migration et du transfert sont vérifiés grâce à l'utilisation d'une solution de rouge ponceau à 0.1% (Sigma Aldrich).

La détection des molécules HLA-G et HLA-E est réalisée par un marquage indirect. La membrane est d'abord saturée pendant 30 min dans une solution de PBS contenant 3% BSA (Euromedex, Souffelweyersheim, France) et 0.5% de Tween 20 (Sigma Aldrich). Incubation sur la nuit de la membrane de nitrocellulose avec soit l'anticorps de souris anti-HLA-G 4H84 (R&D system) dilué au 1 :1000, soit l'anticorps anti-HLA-E MEM-E/02 (Thermofisher) dilué au 1 :500. Après trois lavages de 10 min dans du PBS contenant 0.5% de Tween 20, la membrane est incubée pendant une heure dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-humain dirigé contre les IgG, IgM, IgA (H+L) couplé HRP (Lifetechnologies), dilué au 1/5000 dans une solution de PBS contenant 3% de BSA et 0.5% de tween 20. Après trois nouveaux lavages, la membrane est révélée par chimioluminescence avec le kit ECL (Amersham Healthcare) et lu sur l'imageur ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Science). La taille théorique de la molécule HLA-G dissociée à la B₂-microglobuline est de 39 kDa, les dimères d'HLA-G sont attendus à 80 kDa. La taille théorique de la molécule HLA-E est 43kDa.

5. Techniques d'immunoprécipitation révélée par ELISA

✓ Principe de la technique MAIPA ApDia

La technique sur laquelle nous nous sommes appuyés est une technique ELISA. Le kit commercialisé est nommé MAIPA. Ce nom est issu de *Monoclonal Antibody Immobilization Specific of Platelett Antigen*, issue du fournisseur ApDia. Il s'agit d'une technique de détection en Ac anti-plaquettaire par immuno-précipitation, révélée par méthode immuno-enzymatique (Fig. 10).

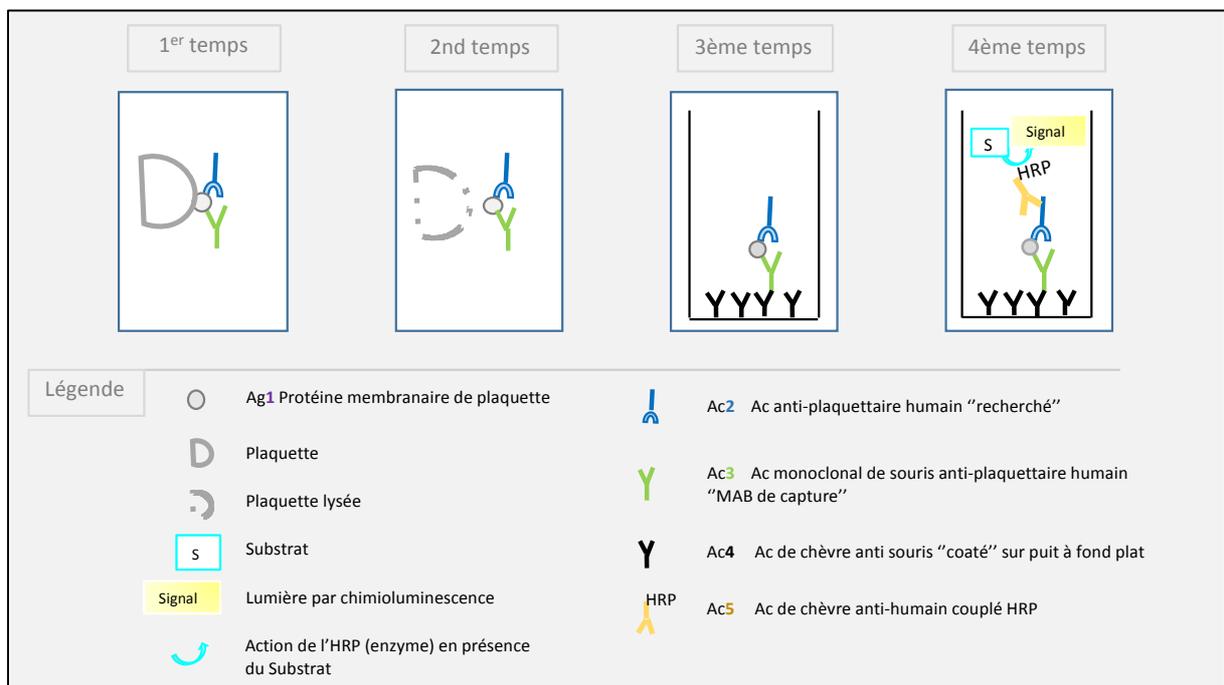


Figure 10: Principe de la technique MAIPA indirecte

L'Ac3, est une IgG de souris anti-humain spécifique de la protéine ciblée (sur la plaquette). Cette protéine ciblée, localisée sur la plaquette, offre un site spécifique qui est l'épitope (Ag1). Et l'élément inconnu (Ac2), dont on cherche à déterminer sa présence est une IgG humaine anti-plaquettaire.

Cette technique se décompose en 4 temps :

- 1- Formation d'un complexe [Ac anti-plaquette (3) / Ag plaquettaire (1) / Ac sériques (2)].
- 2- Solubilisation du complexe après lyse cellulaire.
- 3- Immobilisation du complexe sur plaque par un Ac anti-souris (4).

- 4- Révélation de la présence de l'anticorps sérique (2) du complexe par chimioluminescence suite à la fixation d'un anticorps anti-humain-HRP (5).

Le kit MAIPA permet de mener en parallèle, la recherche d'Ac anti-plaquettaire sous forme libre (circulant dans le sérum) : technique DIRECTE, et sous forme complexée/liée avec la plaquette : technique INDIRECTE.

✓ **Présentation de la technique immuno-précipitation révélée par méthode immuno enzymatique pour la recherche en Ac anti-HLA-G et anti-HLA-E**

Dans le cadre de notre projet d'étude, nous détournons la technique INDIRECTE du protocole MAIPA, afin de déterminer si on détecte un signal spécifique en Ac anti-HLA-G et/ou Ac anti-HLA-E pouvant être sous forme libre dans le sérum (Fig. 11). Les consommables et réactifs conservés sont : la plaque coatée en Ac de chèvre anti-souris, le CONJUGUE (Ac de chèvre anti-humain de type IgG, couplé HRP), le CHROMOGEN (substrat), le StopSol : pour arrêter la réaction enzymatique (H₂SO₄). Les deux solutions de lavage du kit (CellWash 1X et ElisaWash 1X) sont également détournées. Pour la réalisation de témoins de manip nous utiliserons aussi l'anticorps monoclonal de souris anti-B2M (spécifique des HLA de classe I) et le pool de plaquettes.

Les outils spécifiques pour détecter HLA-G, sont les cellules SPI-801-ACC86 transduites exprimant HLA-G*01 :01, HLA-G*01 :04, HLA-G*01 :06, HLA-E*01 :01, ou E*01 :03 et l'anticorps monoclonal de souris MEM-G9 (réf MA1-19014, Thermo Fisher) pour la capture de la molécule HLA-G ou le 3D12 (réf 14-9953-82, Thermo Fisher) pour la capture de HLA-E. Les expériences de détection des Ac sériques anti-HLA-E sont en projet à venir.

✓ Schématisation du principe de la détection des Anticorps anti-HLA-G (ou Ac anti-HLA-E)

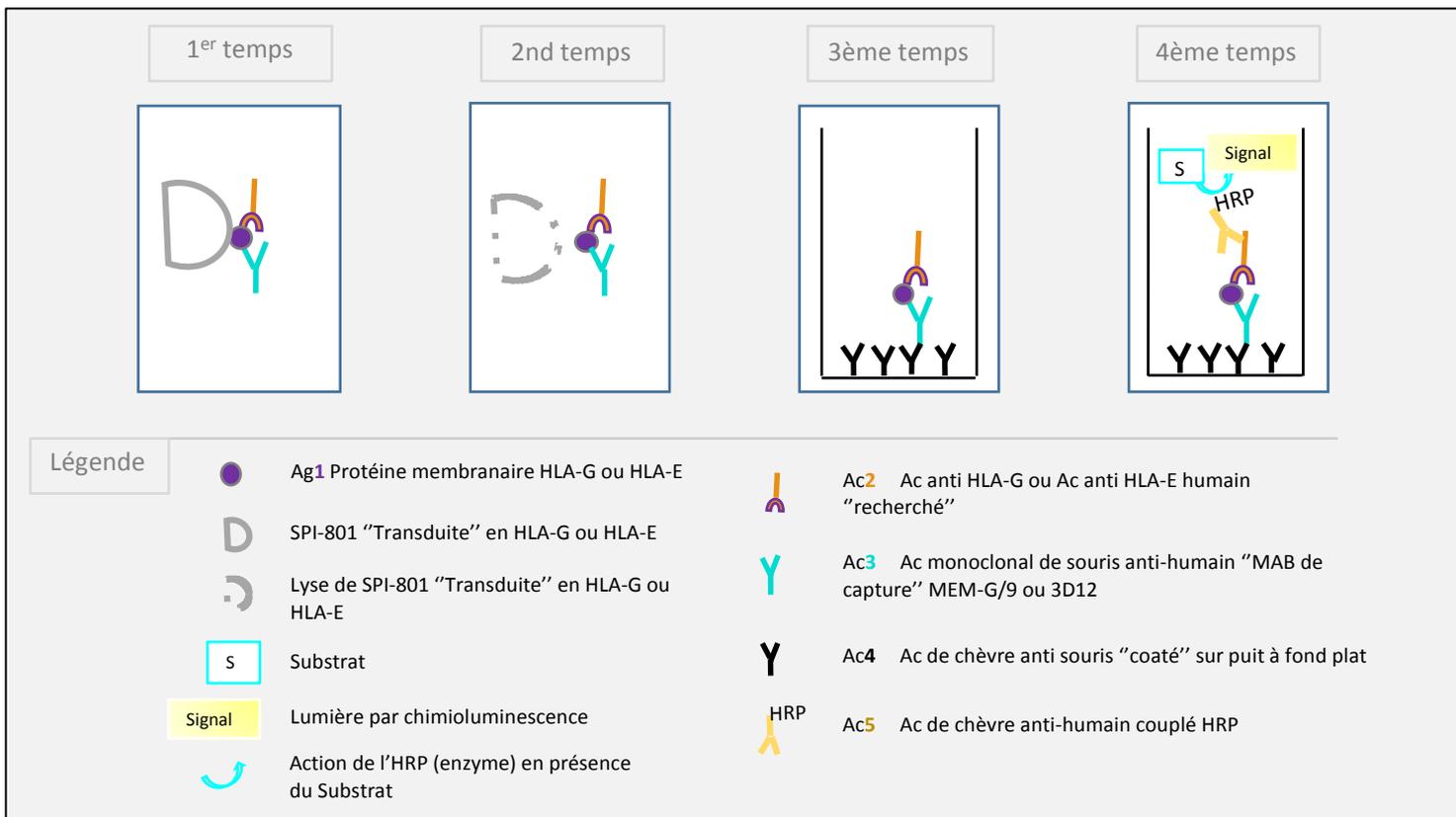


Figure 11: Schéma du principe de détection en Ac anti-HLA-G (ou -E) réadapté du protocole MAIPA de ApDia

Chaque sérum est testé dans deux conditions : un puits qui contient un pool de trois lignées transduites en HLA-G, et un puits testé sur des cellules *Wild-Type*.

✓ Protocole

Les cellules sont préalablement lavées en PBS, centrifugées à 300 g, 5min à T° ambiante, puis récupération du culot cellulaire (WT ou lignées transduites) après aspiration du surnageant. Les concentrations sont ajustées à 10×10^6 cellules/mL avec du PBS. Pour la constitution du Pool : les volumes sont ajustés pour conserver les trois concentrations à l'identique. Un puits présentant un culot cellulaire avec la lignée SPI-801-ACC86 sauvage et un puits avec un culot cellulaire des trois lignées transduites mélangées et de quantité identiques (HLA-G*01 :01, -G*01 :04 et -G*01 :06).

Pour chaque sérum à tester contenant potentiellement l'anticorps recherché (AC2), nous distribuons dans un puits de plaque à fond en U 100µL d'une suspension cellulaire « WT » ou « Pool » de 1×10^6 cellules. Puis 100µL de PBS Mg- Ca- sont ajoutés. Les cellules sont alors culotées par centrifugation à 1000g durant 3 min à T° ambiante (TA). Le surnageant est éliminé par retournement de la plaque et les cellules sont resuspendues dans 50µL de sérum dilué à 20% (=1/5^{ème}). Le mix cellules/sérum est incubé 30 min à 35°C puis centrifugé à 1000g 3 min à TA. Après élimination du surnageant par retournement, deux cycles de lavage en CellWash 1X par centrifugation 1000g, 3 min, TA sont réalisés. Le mix est cette fois-ci re-suspendu par ajout de 50µL de l'anticorps de capture (AC3) MEM-G9 dilué au 1/1000^{ème} et incubé 35°C, 30 min. Après 4 cycles de lavage en CellWash 1X par centrifugation 1000g, 3 min, TA, 130µL de LyseBuffer sont ajoutés au culot puis incubés 15 min à 4°C. La plaque est alors centrifugée 15 min à 1000g à TA, afin de culoter les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré, déposé pour être immobilisé sur la plaque coatée d'anticorps de chèvre anti-souris (AC4) et incubé 35°C, 33 min. Six cycles de lavage par centrifugation sont réalisés avec la solution ElisaWash 1X, suivi de l'ajout de 100µL d'anticorps de chèvre anti-humain couplé HRP. Il s'ensuit une incubation de 30min à 35°C. Après 6 cycles de lavage en ElisaWash 1X par centrifugation, 100µL de CHROM (substrat chromogène) sont ajoutés et incubé 12 min à 35°C dans l'obscurité. La réaction est arrêtée et stabilisée suite à l'addition de 100µL de StopSol (H2SO4). Une lecture est faite sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450nm.

RESULTATS

1. Qualification des cinq vecteurs de transferts issus de la lignée SPI-801 "Transduites"

Pour établir les lignées exprimant les protéines HLA-G*01 :01, G*01 :04, G*01 :06 et HLA-E*01 :01, E*01 :03 par transduction lentivirale, cinq constructions de vecteur (pWPXL-HLA-G*01 :01, G*01 :04, G*01 :06, pWPXL-HLA-E*01 :01 et E*01 :03) ont été réalisées. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage (Fig. 12).

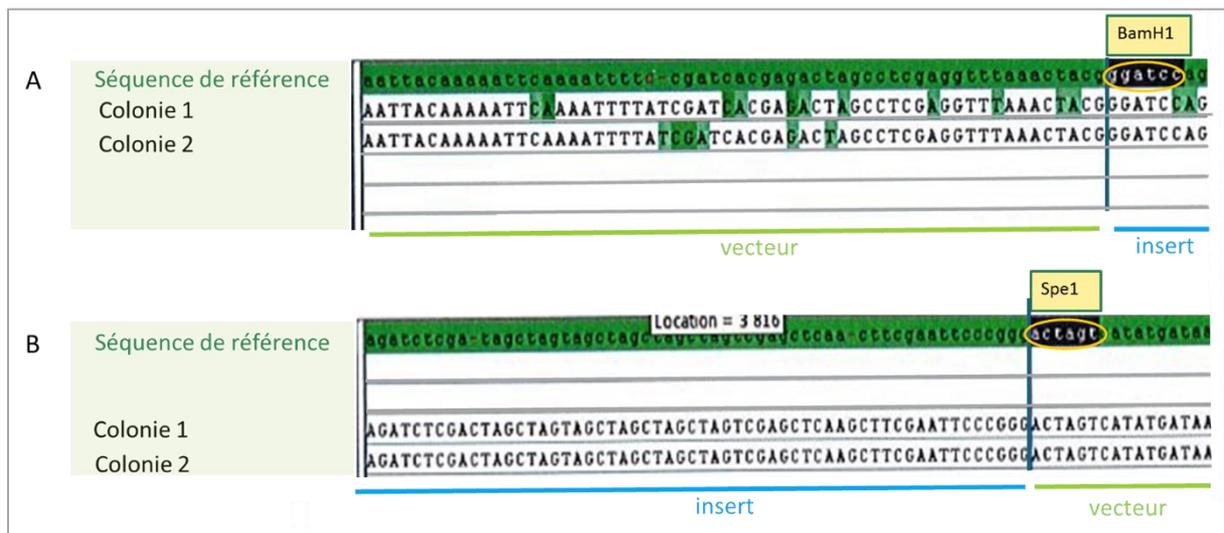


Figure 12: Séquençage des zones d'insertions du transgène dans le vecteur de transfert pWPXL

Séquences vertes : séquence de références. Séquences noires : colonies testées. Cercles jaunes : sites de restrictions enzymatiques. A : lecture forward 5' -> 3'. B : lecture reverse 3' -> 5'

Comme présenté dans le chapitre « Matériel et Méthode », des particules virales ont été produites dans les cellules HEK293T, suivi de la transduction sur cellules SPI-801 avec les différentes constructions. Un sous-clonage des cellules en méthylcellulose est réalisé afin de sélectionner trois clones, exprimant le plus la protéine pour chacune des isoformes.

L'expression des protéines HLA-G et HLA-E est vérifiée au niveau intracellulaire par Western-Blot et au niveau membranaire par cytométrie en flux.

1.1. Qualification de l'expression protéique des cellules "Transduites" SPI-801

1.1.1. Vérification de l'expression protéique des lignées HLA-G

Au préalable avant chaque protocole, une évaluation de l'expression d'HLA-G sur les SPI-801 transduites est réalisée par technique CMF, comme indiqué précédemment. En cas de diminution significative de l'expression protéique ou de contamination, la culture cellulaire est éliminée.

L'expression des différents allèles d'HLA-G dans les différents clones est vérifiée par cytométrie en flux en utilisant l'anticorps monoclonal MEM-G9. Un témoin isotypique est utilisé pour fixer le seuil de positivité et des cellules exprimant HLA-E sont également utilisées comme contrôle de spécificité de l'anticorps. Les résultats montrent que tous les clones transduits, expriment spécifiquement HLA-G (Fig. 13). En effet, 92% des cellules expriment spécifiquement la protéine HLA-G*01 :01 (Fig. 13 MEM-G9/G101). Ce résultat est à corrélérer au résultat de l'anticorps anti-B2M qui montre également que 92% de la population exprime une protéine couplée à la B2M (Fig. 13 – B2M/G101). Ces résultats suggèrent que la plus grande part des cellules exprime HLA-G couplé à la B2M. La spécificité du marquage par l'anticorps MEM-G9 est démontrée par l'absence de signal des cellules SPI-801 sauvages (fig.13 MEM-G9/WT) et les cellules exprimant HLA-E*01:03 (Fig.13 MEM-G9/WT). Cependant une population non négligeable de cellules sauvages exprime faiblement la B2M (Fig. 13 B2M/WT). Cette faible expression ne devrait cependant pas altérer les résultats à la vue de la spécificité de l'anticorps contre HLA-G ainsi que du niveau d'expression de la protéine.

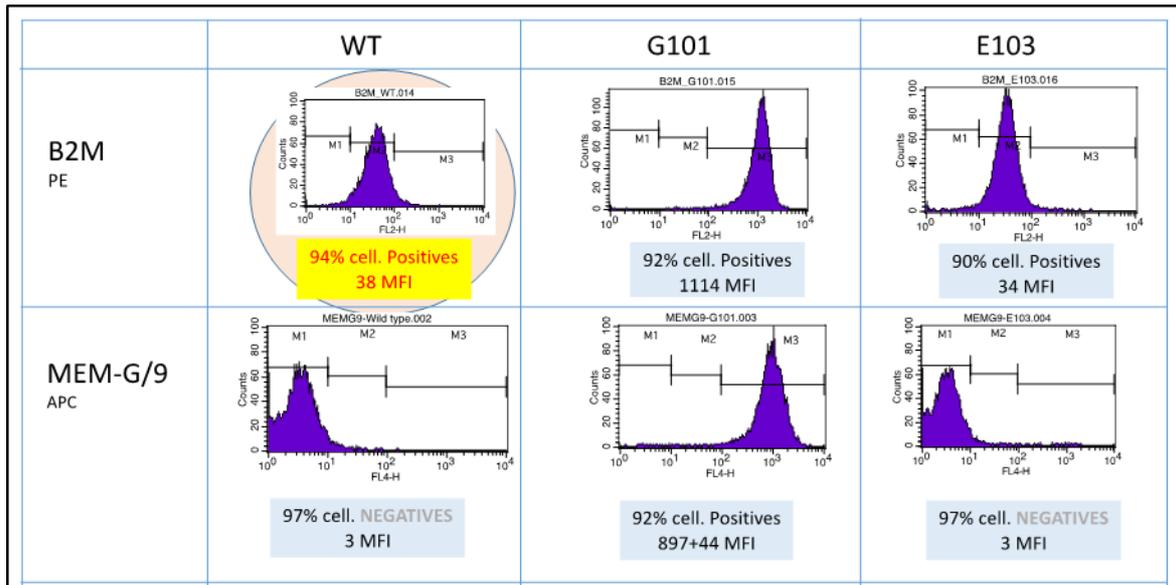


Figure 13: Histogramme représentatif d'une caractérisation par CMF du clone exprimant l'allèle HLA-G*01:01 (G101)

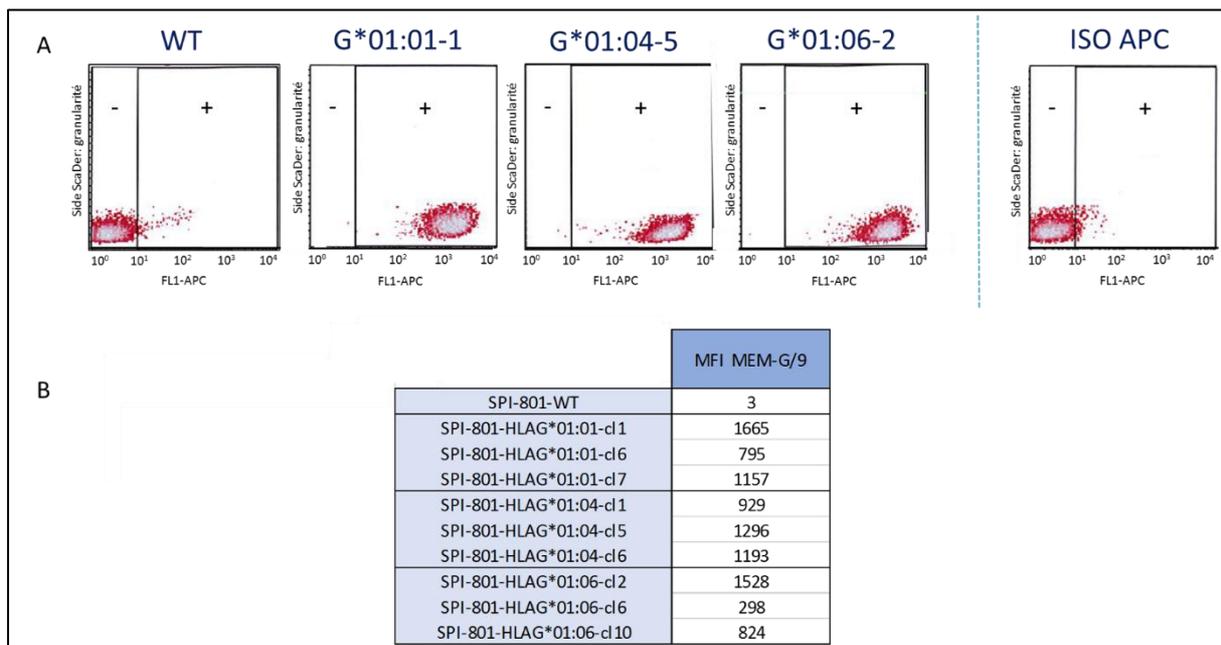


Figure 14: Expression de HLA-G dans les clones sélectionnés

A : density plot. B : lecture des intensités de fluorescence (MFI)

Les intensités de fluorescence (MFI) sont colligées dans la Figure 14.B. Les valeurs observées pour les trois clones exprimant l'allèle G*01 :04 sont homogènes (proche de 1000). Pour l'allèle G*01 :01, on relève une plus grande disparité entre les trois clones avec la MFI du clone 1 qui est deux fois plus élevée que celle du clone 6 (MFI de 1665 et de 795). Une disparité des MFI

encore plus importante est visualisée entre les clones correspondants à l'allèle G*01 :06. Le clone G*01 :06-2 présente une MFI environ cinq fois plus élevée que le clone G*01 :06-6 (1528 *versus* 298).

Pour chaque allèle, le clone ayant l'expression la plus importante de HLA-G a été sélectionné. Ainsi, une caractérisation plus complète a été réalisée sur les clones G*01:01-1, G*01 :04-5 et G*01 :06-2. Les MFI entre ces trois allèles varient peu, mais la question sur une éventuelle différence de reconnaissance par l'anticorps en fonction des protéines est soulevée. Comme la molécule HLA-G membranaire est toujours associée à la B₂-microglobuline, on analyse le ratio MFI_{MEM-G9} / MFI_{B2M} pour chaque isoforme. Ce calcul nous permet d'estimer si l'affinité de l'anticorps pour chaque isoforme est constante. Les ratios MFI_{MEM-G9} / MFI_{B2M} pour les clones G*01 :01-1, G*01 :04-5 et G*01 :06-2 sont assez proches (respectivement 1.4, 1.2 et 2) (Figure 15) ce qui suggère que les variations de MFI_{MEM-G9} seraient plutôt dues à une différence de quantité de protéines à la membrane.

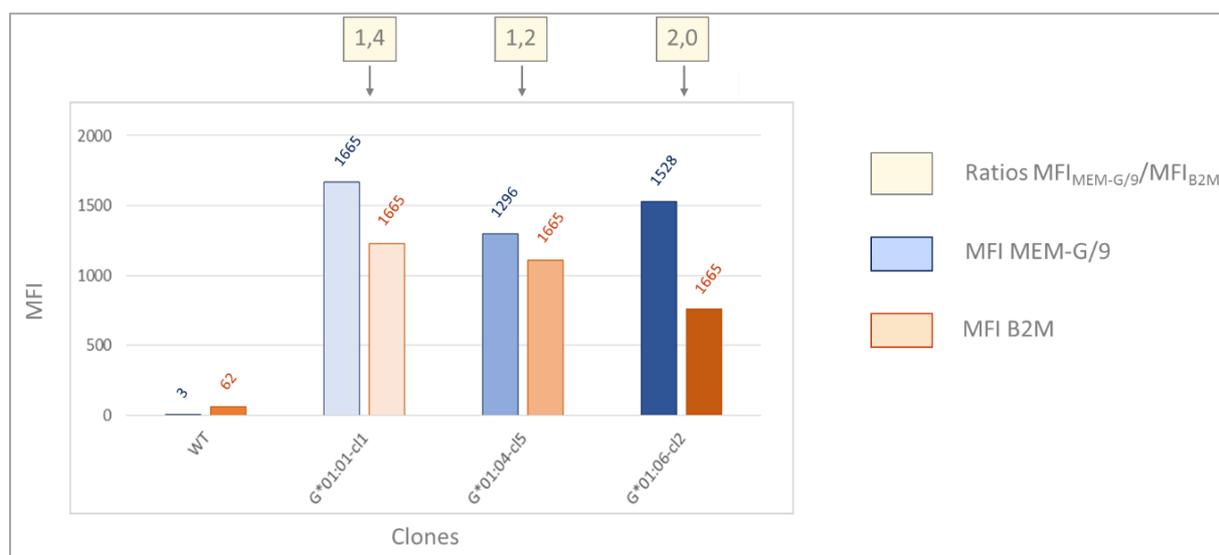


Figure 15: Histogramme des intensités de fluorescence (MFI) sur les clones sélectionnés pour chacun des 3 allèles HLA-G

Pour confirmer cela, nous avons réalisé une étude par Western-Blot sur des lysats cellulaires totaux en utilisant un autre anticorps monoclonal spécifique de HLA-G (clone 4H84) (Fig. 16).

Nous retrouvons la taille attendue, pour HLA-G à 39kDa. Et nos résultats concordent vers une variation de la quantité de protéines dans les cellules suivant le clone. G*01:01-1 et G*01:06-2 ont des intensités similaires, ils expriment fortement la protéine, et G*01:04-5 est visiblement plus faible.

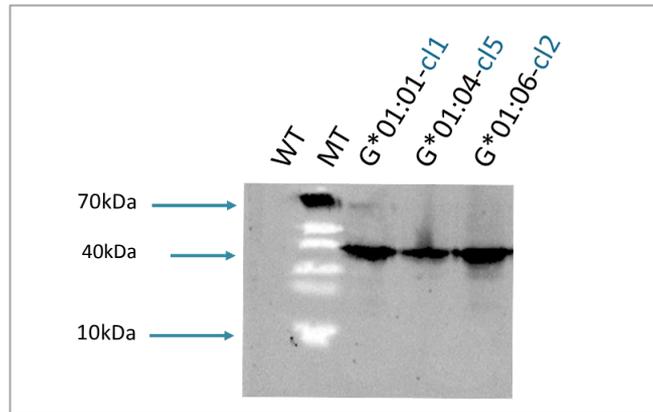


Figure 16: Expression des isoformes HLA-G sur les clones sélectionnés

(MT : Marqueur de Taille)

1.1.2. Vérification de l'expression protéique des lignées HLA-E

La même étude a été réalisée sur les différents clones exprimant HLA-E*01:01 et E*01:03 avec l'anticorps monoclonal 3D12. Les résultats de cytométrie en flux montrent que les clones expriment HLA-E (Fig. 17A).

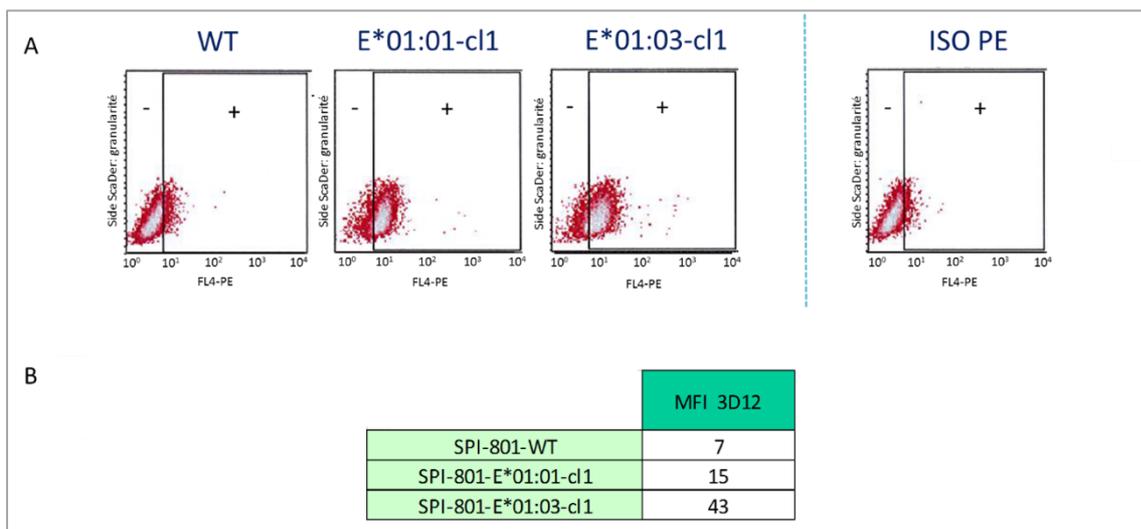


Figure 17: Expression de HLA-E sur les clones sélectionnés.

A : Density plot. B : lecture des intensités de fluorescence (MFI)

Toutes les MFI sont faibles (< 50) ce qui suggère une expression faible d'HLA-E à la membrane de la cellule (Fig. 17B). Ceci n'est pas surprenant puisqu'il est connu que l'expression membranaire de HLA-E dépend de la disponibilité de la séquence signal des molécules HLA de classe I. D'ailleurs, une autre équipe du laboratoire a réalisé les tests fonctionnels qui ont permis de montrer qu'en présence de peptide signal de HLA-G, l'expression membranaire de HLA-E est augmentée dans les différents clones (données non montrées).

L'analyse des protéines totales par Western-Blot, est corrélée avec les données de cytométrie en flux puisque la détection des deux clones HLA-E est faible : le clone E101 étant plus faible que le clone E103 (Fig. 18). Et nous retrouvons bien le poids moléculaire attendu de 43kDa.

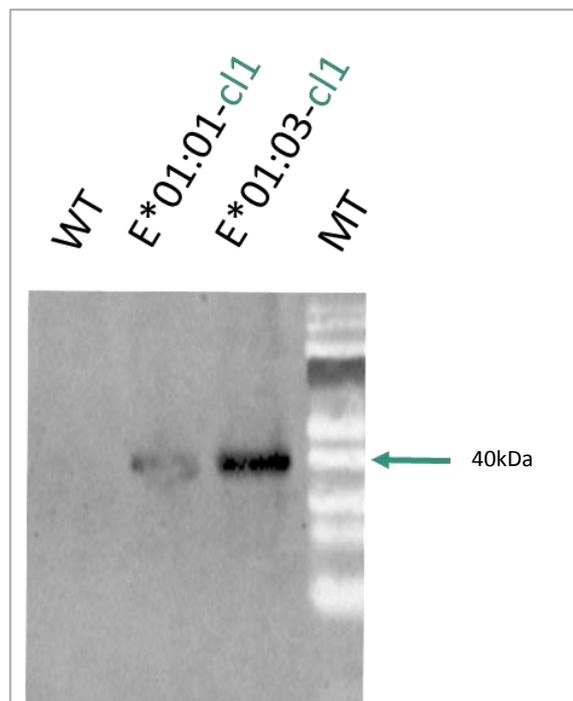


Figure 18: Expression des isoformes HLA-E sur lysat cellulaire total

2. Validation de la méthode de détection

La détection de la présence d'anticorps anti-HLA-G dans le sérum est basée sur une adaptation de la méthode MAIPA indirecte de la solution commerciale ApDIA® (Fig. 19.A et 19.B). Comme précisé dans le chapitre « Matériel et Méthode », cette méthode permet la révélation d'anticorps sériques anti-glycoprotéines suite à l'immobilisation d'antigènes plaquettaires par un anticorps monoclonal spécifique.

Dans notre étude, l'adaptation repose sur l'utilisation de cellules exprimant HLA-G et d'un anticorps monoclonal spécifique (clone MEM-G9) permettant sa capture (Fig. 19.D).

Ces différentes adaptations ont nécessité de mettre en place une évaluation de la méthode afin de valider et d'optimiser le protocole.

En effet il était nécessaire de s'assurer dans un premier temps que l'antigène HLA-G présenté par les cellules puisse être immobilisé et que l'anticorps spécifique anti-HLA-G (clone MEM-G9) soit inclus dans le processus.

Dans un deuxième temps nous avons cherché à optimiser les différents éléments des protocoles afin de maximiser le signal sur bruit de fond pour évaluer la méthode. Enfin nous avons mis en place un protocole de « screening » haut débit renseignant la présence ou l'absence d'anticorps sérique anti-HLA-G et un protocole identifiant l'isoforme.

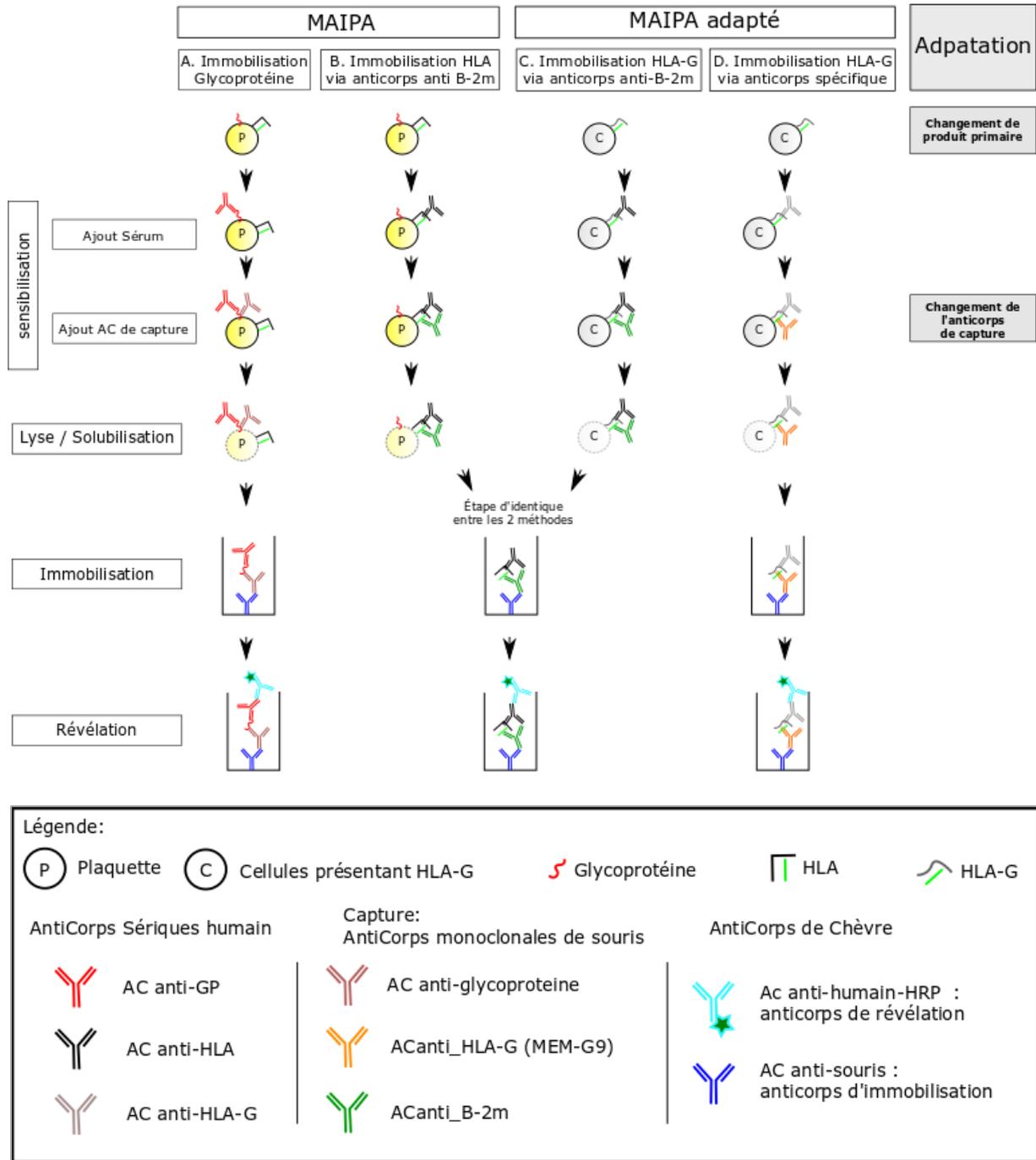


Figure 19: Transposition du protocole MAIPA pour la détection d'anticorps anti-HLA-G

2.1. Immobilisation de la molécule HLA-G suite à sa capture par un anticorps anti-B2M

Une fois la caractérisation des cellules transduites, nous avons validé la capacité de nos cellules à présenter HLA-G et avons vérifié sa capture et son immobilisation dans les conditions du MAIPA Apdia.

Pour cela nous avons utilisé les conditions de capture (anticorps anti-B2M) et d'immobilisation (anticorps anti-souris) du kit en remplaçant uniquement les plaquettes (Fig. 19.B) par des cellules transduites ou sauvage (Fig. 19.C).

La capture/immobilisation de la molécule est identifiée par technique Western-Blot selon le protocole schématisé en figure 20.A en révélant la présence de la protéine par un anticorps spécifique anti-HLA-G (4H84). Les résultats sont présentés en figure 21.

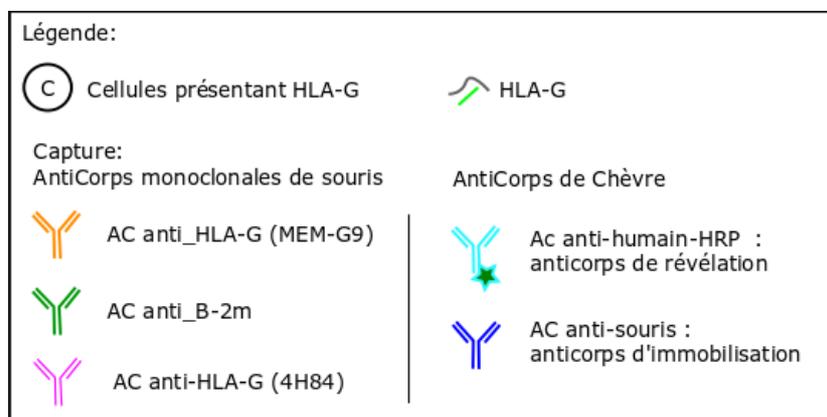
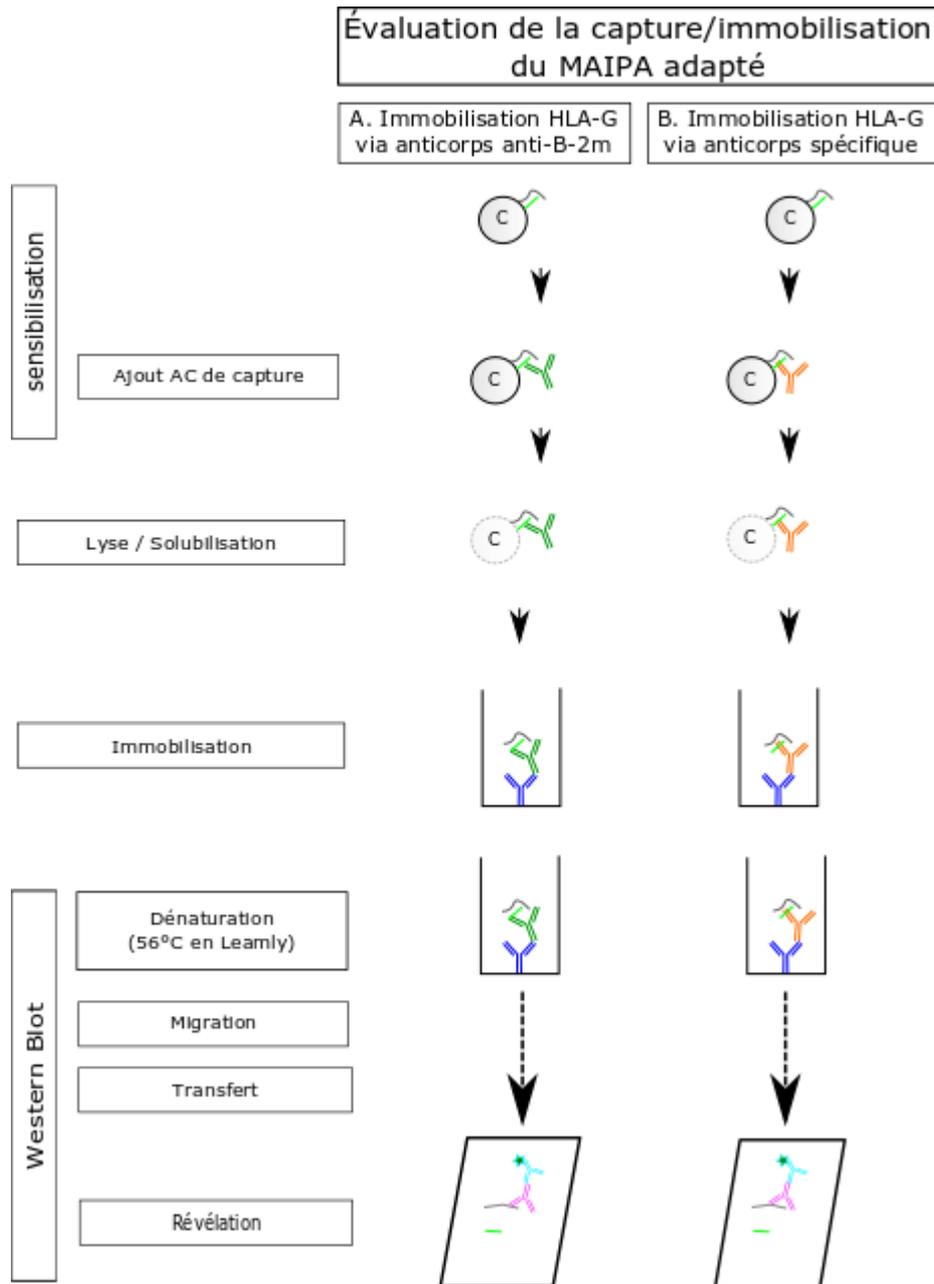


Figure 20: Schématisation du protocole MAIPA/Western

Suite à la capture par un anti-B2M et la réalisation d'un Western-Blot en condition réductrice (Fig. 21 colonnes 1 et 3), nous observons une bande aux alentours de 39kDa. Cette taille correspond à la taille attendue de la molécule HLA-G dans ces conditions. De plus, cette bande est observée uniquement lors de l'utilisation de cellules transduites HLA-G.

Une autre bande moins intense et de poids moléculaire plus élevé pourrait être un complexe hétéromère composé d'HLA-G. [39]

Des lysats totaux de cellules sauvage ou transduites HLA-G ont été utilisés comme contrôle (Fig. 21 colonnes 5 et 6 respectivement) lors du Western-Blot. Une bande correspondante à HLA-G est révélée spécifiquement sur le lysat total des cellules transduites HLA-G (Fig. 21.6). Pris ensemble, ces résultats montrent que notre protocole permet la capture/immobilisation spécifique de molécules couplées à la B2M tout en permettant une « épuration » des protéines non désirées.

Ces observations valident la possibilité d'utiliser notre outil cellulaire dans l'adaptation du protocole MAIPA ApDIA.

2.2. Validation de la capture de la molécule HLA-G par un anticorps monoclonal de souris spécifique

En suivant le même protocole que précédemment, nous adaptons l'anticorps de capture en utilisant un anticorps spécifique de HLA-G : l'anticorps monoclonal de souris MEM-G9 (Fig. 20.B).

Nous ne révélons l'existence d'une bande assignée à HLA-G uniquement lors de l'utilisation de cellules présentant HLA-G (Fig. 21 colonnes 2 et 4).

Par ailleurs, en comparant les 2 anticorps (B2M et MEM-G9) nous observons des résultats identiques corrélant les résultats de cytométrie en flux.

Ces résultats permettent de valider l'utilisation du MEM-G9 dans l'adaptation du protocole MAIPA ApDIA.

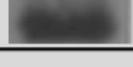
Protocole		MAIPA				Lysat Cellulaire Total		
		1	2	3	4	5	6	
Type cellulaire		WT	WT	HLA-G	HLA-G	WT	HLA-G	
AC de Capture	Anti-B-2m	+	-	+	-	-	-	
	Anti-HLA-G	-	+	-	+	-	-	
AC de Révélation	Anti-HLA-G	+	+	+	+	+	+	
Membrane	Marquer de Taille (KDa)							
	55							
	43							
	34							
Résultats		Abs	Abs	Pres	Pres	Abs	Pres	

Figure 21: Résultats représentatifs du MAIPA/Western

En conclusion, nous avons démontré que nous sommes capables de capturer et d'immobiliser spécifiquement HLA-G par l'utilisation de nos cellules transduites et d'un anticorps spécifique de HLA-G.

Ces adaptations confirmées du MAIPA ApDIA valident la mise au point de notre outil pour tester la détection d'anticorps sériques anti-HLA-G.

2.3. Identification du contrôle positif du test MAIGA

Nous avons choisi de tester le contrôle plaquette/HLA du Kit MAIPA ApDIA® afin d'identifier un contrôle positif du MAIGA. Le protocole « MAIPA adapté » a été réalisé en utilisant nos cellules (transduites ou sauvage) avec comme anticorps de capture l'anti-B2M (Fig. 19.C) ou l'anti-HLA-G (MEM-G9) (Fig. 19.D).

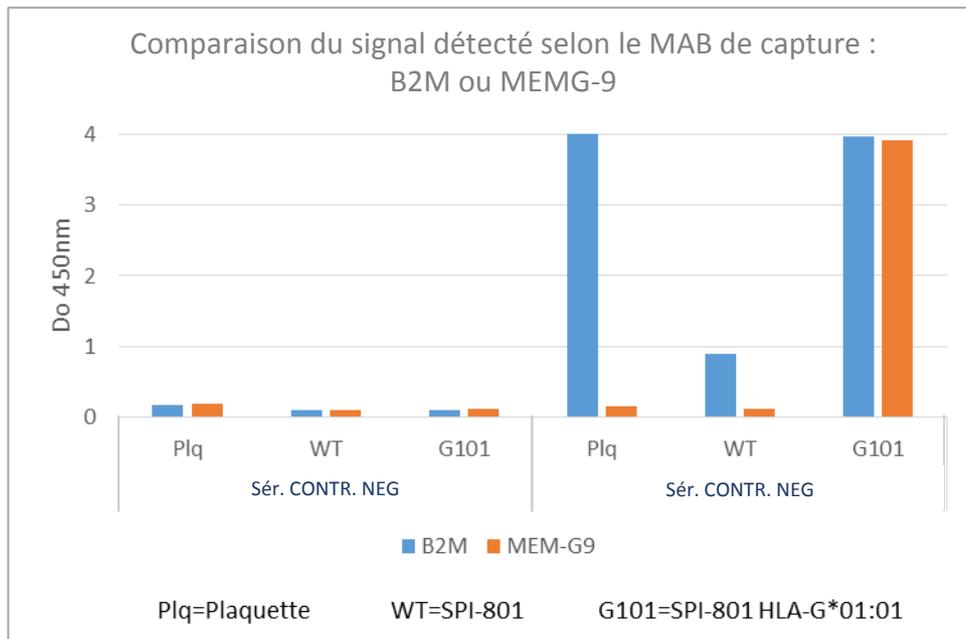


Figure 22: Caractérisation du signal en fonction de l'anticorps de capture

Les résultats nous montrent que l'ensemble des conditions de capture sur le sérum CONTR.NEG ne révèlent pas la présence d'anticorps dirigés contre HLA (WT) ou HLA-G (G*01 :01). Ils sont confirmés par le témoin d'expérience Plaquette/B2M/CONTR.NEG (DO=0,17) et démontrent également que les adaptations (utilisation des cellules transduites/WT et de l'anticorps anti-HLA-G) réalisées n'engendrent ni bruit de fond ni signal non spécifique (DO \geq à 0.1) (Fig. 22).

Par ailleurs nous pouvons voir des résultats différents sur le sérum CONTR.HLA. Suite à la capture de molécules HLA par un anti-B2M nous détectons fortement la présence d'anticorps anti-HLA lors de l'utilisation des cellules exprimant HLA-G*01 :01 (G101) et plus faiblement avec les cellules sauvages.

Ces résultats suggèrent que les cellules expriment des molécules HLA fixant l'anticorps anti-B2M.

Les résultats les plus intéressants sont donnés par l'utilisation de l'anticorps spécifique anti-HLA-G en présence du sérum CONTR.HLA (Fig. 22). En effet nous pouvons voir que seules les cellules exprimant HLA-G engendrent un signal détectable (G101 DO= 3.92 vs plq

DO=0.15 vs WT DO=0.12). Ces résultats témoignent de la spécificité de capture de l'anticorps MEM-G9.

L'ensemble de ces résultats valide l'utilisation des sérums CONTR.NEG et CONTR.HLA comme sérums contrôles dans la méthode MAIPA adapté et également la spécificité du signal suite à l'utilisation de l'anticorps anti-HLA-G.

L'ensemble de ces tests valide les différentes adaptations de protocole MAIPA permettant ainsi d'immobiliser spécifiquement une molécule HLA-G (ici HLA-G*01 :01) afin de détecter la présence d'anticorps anti-HLA-G dans un sérum et cela sans générer de bruit de fond supplémentaire.

Le protocole « MAIPA adapté » repose donc sur l'utilisation de :

- la lignée cellulaire SPI-801 WT
- la lignée cellulaire SPI-801 exprimant HLA-G
- l'anticorps de capture anti-HLA-G (clone MEM-G9)
- un sérum témoin négatif (CONTR.NEG)
- un sérum témoin positif (CONTR.HLA)

3. Optimisation du protocole MAIGA (*Monoclonal Antibody-specific Immobilization of HLA-G Antibody*)

Après avoir validé les adaptations nous avons optimisé les différentes étapes du protocole afin d'obtenir l'intervalle de valeur le plus discriminant. Nous nous sommes fixés comme objectifs : obtenir un bruit de fond bas et avoir une amplitude maximale de détection par les spectrophotomètres. Pour se faire nous avons joué sur la quantité de cellules, la concentration en anticorps de capture et sur la dilution du sérum.

3.1. Concentration en cellules

Une gamme de cellules de $0,125 \cdot 10^6$ à $8 \cdot 10^6$ cellules/test a été testé. Confrontée avec un sérum CONTR.NEG : un signal non négligeable est détecté lors de l'utilisation de $8 \cdot 10^6$ cellules/test, quel que soit le type cellulaire utilisé (DO moyenne=0,38). Les autres quantités n'engendrent pas de bruit de fond significatif (Fig. 23 gauche).

Et lorsque cette gamme de cellules est confrontée avec un sérum CONTR.HLA, seules les cellules exprimant HLA-G (G101 et G104) engendrent un signal, confirmant les résultats précédents. On identifie également que le signal maximum détecté se situe entre $2 \cdot 10^6$ et $0,5 \cdot 10^6$ cellules/test. (Fig. 23 droite).

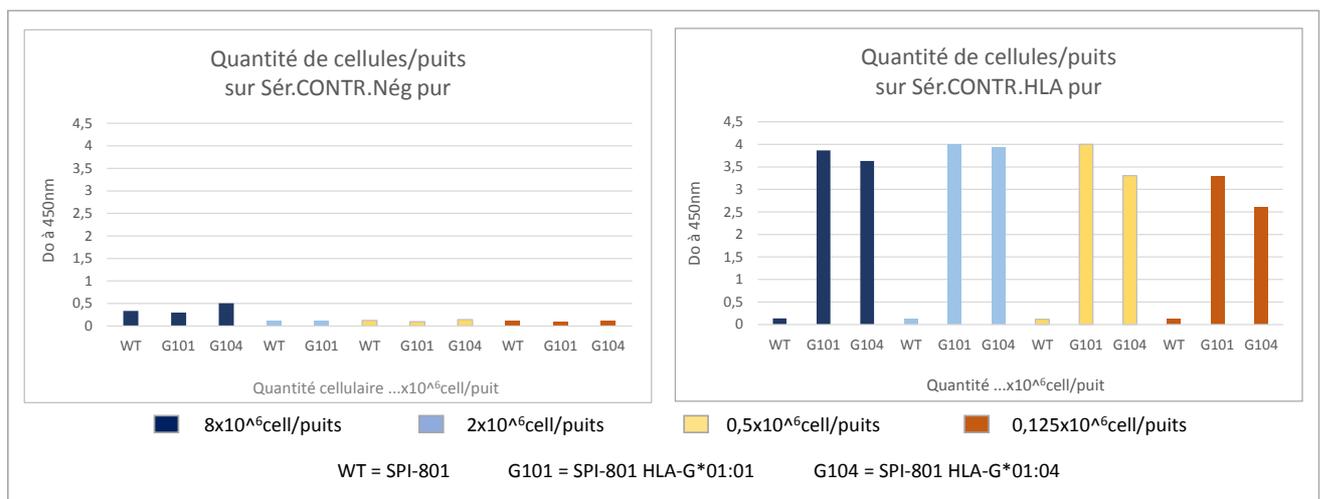


Figure 23: Évaluation de la quantité de cellules sur le signal détecté

Pour affiner la quantité cellulaire optimale nous avons, dans un second temps, travaillé sur 3 quantités cellulaires $2 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ et $0,5 \cdot 10^6$. En prenant en compte les résultats précédents montrant la faible variation du signal entre les différentes isoformes d'HLA-G, seule l'isoforme HLA-G*01:01 a été utilisée dans l'expérience suivante. (Fig. 24)

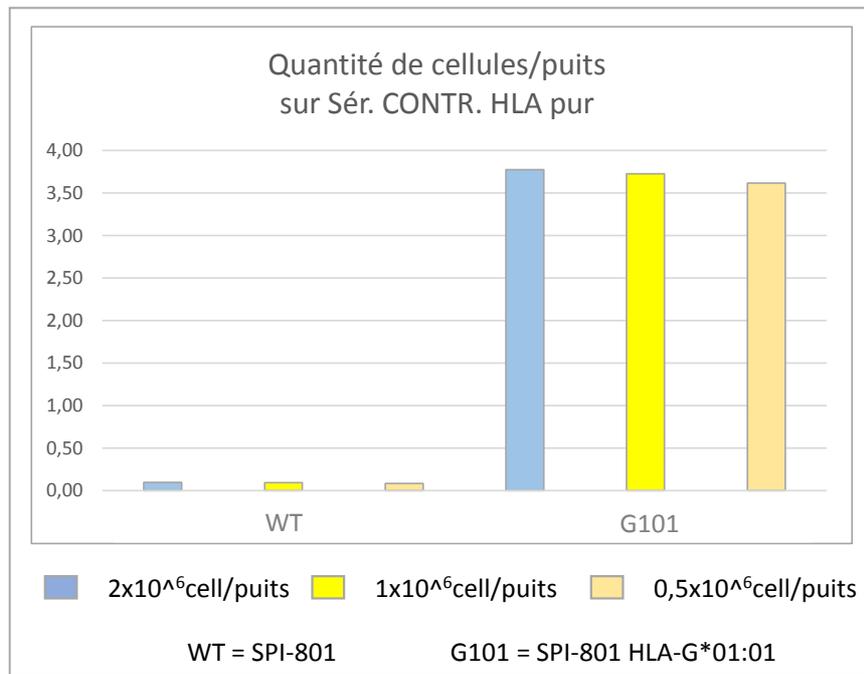


Figure 24: Optimisation de la quantité de cellules sur le signal détecté

Le graphique de la figure 24 montre qu'aucun signal n'est détecté sur les cellules WT quelle que soit la quantité et montre également qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes quantités de cellules.

L'analyse de l'ensemble des résultats permet d'identifier la condition de $1 \cdot 10^6$ cellule/test comme optimale. En effet, cette condition présente un bruit de fond faible et une amplitude de signal élevée. De plus, l'utilisation de cette condition intermédiaire renforce la robustesse du protocole car une variation d'un facteur 2 n'engendre pas de variation significative de signal.

3.2. Concentration en sérum

Par la suite, nous avons voulu identifier une dilution d'utilisation des sérums que nous testerons. Pour ce faire nous nous sommes basés sur le sérum positif CONTR.HLA en testant différentes dilutions. Nous pouvons, sur le graphique, voir l'effet dose de la dilution du sérum sans que cela, comme il était attendu, n'impacte sur le bruit de fond. Cette expérience nous montre que la dilution à 20% nous permet d'obtenir un signal fort non saturant et détecter dans l'intervalle linéaire de la plupart des spectrophotomètres. Cette dilution devrait permettre d'identifier les

sérums présentant un taux d'anticorps anti-HLA-G et de re-tester, plus concentrés, les sérums aux signaux faibles. (Fig. 25)

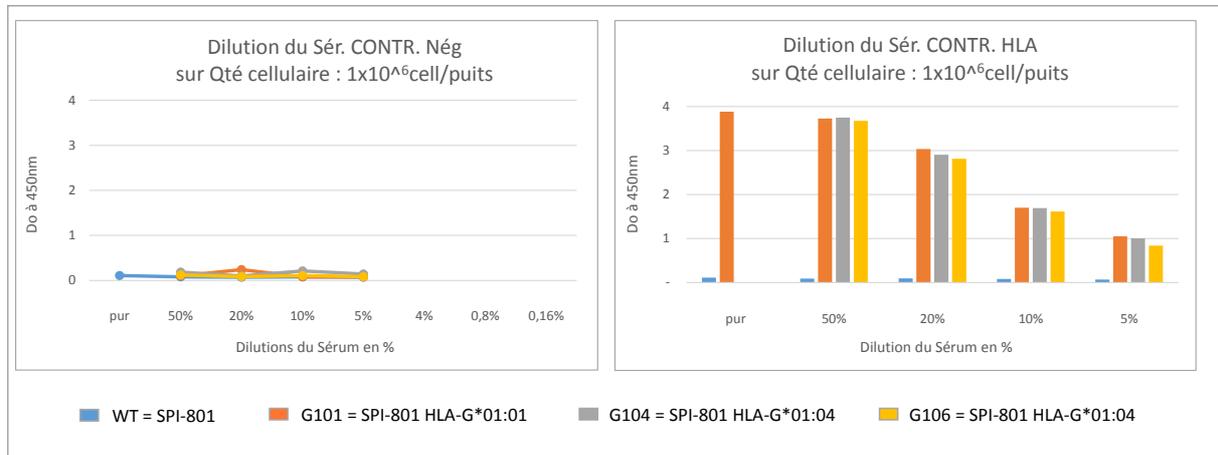


Figure 25: Effet de la concentration en sérum sur le signal négatif (Gauche) et positif (Droite)

3.3. Concentration de l'anticorps de capture

La dernière étape d'optimisation a été d'évaluer la concentration en anticorps de capture. La nécessité était de trouver la concentration saturante la plus faible afin d'éviter un gaspillage mais surtout l'effet délétère généré par un excès d'anticorps. (Fig. 26)

Pour cela nous avons titré dans les conditions de notre MAIPA « Adapté » (1.10⁶ cellules/test ; Sérums témoins dilués à 20%) sur une gamme allant d'un facteur de dilution 1/100^{ème} jusqu'à 1/12800^{ème}.

Le graphique montre l'effet dose de cette gamme de dilution sur le signal détecté. Nous observons une phase plateau (Fig. 26 (1)) où il y a peu de variation du signal (DO max= 2,92 ; DO min= 2,55) puis une phase descendante (Fig. 26 (2)) où le signal décroît jusqu'à la limite de détection. Ces résultats identifient le facteur de dilution 1/1600^{ème} comme concentration « pivot » où les sites antigéniques ne sont plus saturés par l'anticorps.

Pris ensemble, ces résultats nous permettent d'identifier le facteur de dilution de 1/1000^{ème} (1ng/ μ L) comme concentration d'utilisation adéquate. En effet, celle-ci est saturante et une variation modérée ne modifie pas significativement le signal.

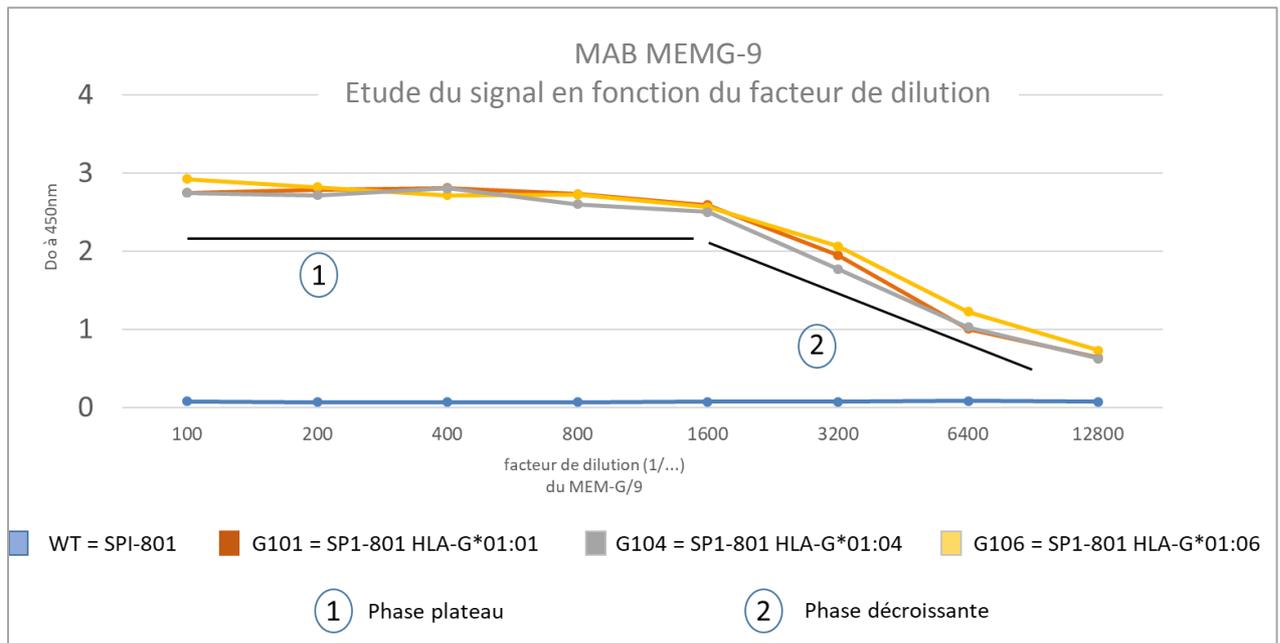


Figure 26: Effet dose de la concentration en anticorps de capture MEM-G9

4. Validation d'un test de dépistage et d'identification

Pour finir, nous avons testé la possibilité d'utiliser notre test selon deux procédés : identification et criblage.

La première correspond à l'identification de l'isoforme HLA-G telle que nous l'avons mis au point dans les expériences précédentes. A ce jour nous sommes capables d'identifier les anticorps dirigés contre 3 protéines HLA-G*01:01, HLA-G*01:04 et HLA-G*01:06.

La seconde correspond à un test de type positif/négatif qui permettrait de cribler à « haut débit » les sérums.

Ce test repose sur l'utilisation d'un pool de cellules exprimant différentes isoformes d'HLA-G.

Nous avons donc testé 2 mix cellulaires ($0,5 \cdot 10^6$ cellules pour chaque isoforme et $1 \cdot 10^6$ cellules pour chaque isoforme).

Nous remarquons que l'utilisation d'un pool à $3 \times 1 \cdot 10^6$ cellules engendre un signal plus bas

que chaque lignée utilisée de manière indépendante (Fig. 27 droite) contrairement au pool à $3 \times 0,5 \cdot 10^6$ cellules (Fig. 27 gauche).

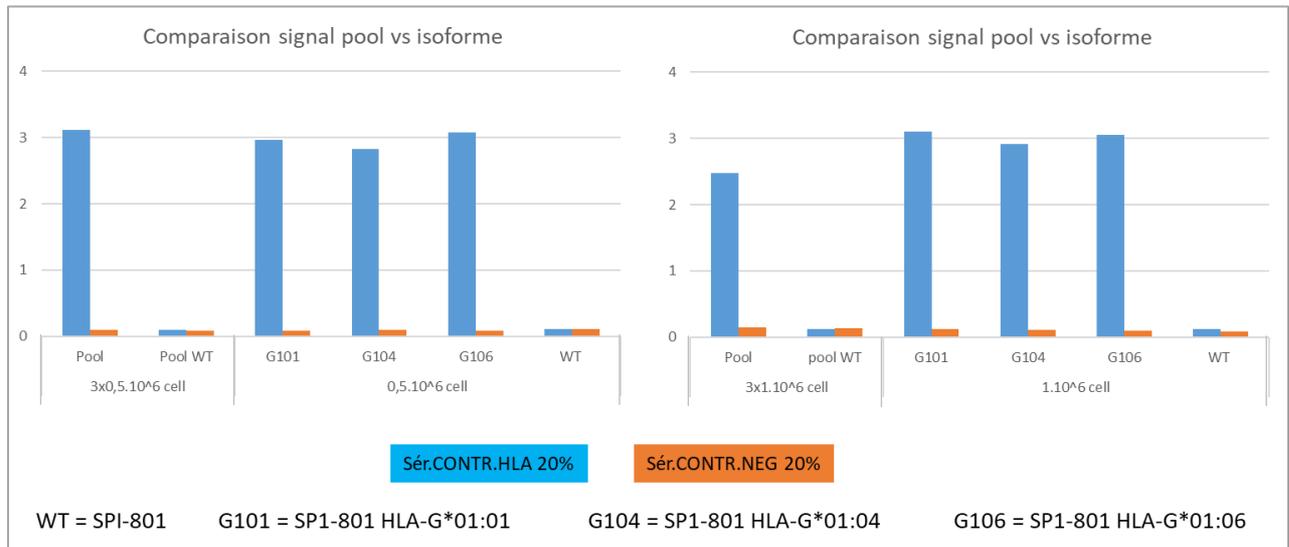


Figure 27: Evaluation du signal négatif et positif sur un mix de cellules (pool)

Pris ensemble les résultats nous ont permis d'élaborer un test capable de détecter la présence sérique d'anticorps anti-HLA-G et d'identifier l'isoforme cible de l'anticorps.

Le protocole se déroule comme détaillé dans la figure 19.D et se compose donc pour les étapes adaptées :

- d'une présentation d'HLA-G par $1 \cdot 10^6$ cellules SPI-801 que nous avons préalablement transduites et phénotypiquement caractérisées
- de l'utilisation d'un sérum dilué à 20%
- d'une capture par $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'anticorps spécifique anti-HLA-G MEM-G9

5. Recherche d'anticorps anti-HLA-G chez les sujets sains, les femmes ayant accouché et les transplantés pulmonaires

Toutes les recherches d'anticorps anti-HLA-G ont été réalisées en comparant les densités optiques du MAIGA entre le pool de lignée transduite et de la lignée sauvage. En cas de résultat

positif ou douteux, un test d'identification était réalisé, permettant de comparer les DO entre les lignées transduites par les différentes isoformes HLA-G, la lignée sauvage et une lignée transduite avec HLA-E. Un test était comparé suivant l'intensité de la DO obtenue par la lignée transduite HLA-G puis par le ratio entre la lignée transduite positive et la lignée sauvage. Aussi, il a été admis qu'un sérum avait un anticorps anti-HLA-G lorsqu'il réagissait avec le pool pour une $DO > 0.150$ (correspondant à la moyenne + 3DS des contrôles négatifs et sérums AB testés) et un ratio > 1.5 en comparaison avec la lignée sauvage avec une $DO < 0.150$.

5.1. Les sujets sains et les femmes ayant accouché

90 sujets sains et 16 femmes en post-partum immédiat ont été testés. Les sujets sont des donneurs de sang, caractérisés par un âge médian de 42 ans (18 ans – 65 ans) et d'une répartition de sex ratio 0.54 (Table 1). Les femmes avaient été prélevées après leur accouchement pour la survenue d'une thrombopénie néo-natale potentiellement suite à une incompatibilité foeto-maternelle dans le système antigénique plaquettaire. La moyenne des DO du pool sur la cohorte complète était de 0.07 ± 0.012 sans différence statistique entre les hommes et les femmes (0.071 ± 0.021 vs 0.074 ± 0.023 , $p=0.45$). La réactivité des sérums contre le pool était en moyenne de 0.066 ± 0.02 , correspondant à un ratio de DO entre le pool et la lignée sauvage de 1.02 (Table 2).

De manière surprenante, un seul cas était positif. Il s'agit d'une femme âgée de 22 ans et de groupe sanguin A+. Un sujet masculin, 30 ans de groupe sanguin A+, avait une réactivité avec une Densité Optique $> 0,150$ avec un ratio près de 1 entre le pool et la lignée sauvage, ne signant pas une détection spécifique d'anticorps anti-HLA-G mais très probablement une détection d'anticorps contre un antigène cellulaire non identifié exprimé par la lignée cellulaire.

Les femmes ayant accouché avaient une moyenne de réactivité de 0.07 ± 0.1 . Aucune réactivité contre le pool n'a été mise en évidence.

Les résultats complets sont présentés en annexe (Table 4 et 5).

		Sujets Sains/grossesses			Total
		Femmes	Hommes	IFM/TNN	
nbr de patients de la cohorte		54	67	16	137
Age médian		39	40	32	
Age mini-maxi		19-66	18-69	25-39	
Age < 44 ans		32	40	16	88
Age ≥ 44 ans		22	27	0	49
Groupage A,B,O	A	20	27	-	47
	B	3	7	-	10
	AB	4	5	-	9
	O	26	28	-	54

Table 1: Présentation de la cohorte de sujets sains/grossesses

		Sujets Sains/grossesses			Total
		Femmes	Hommes	Grossesse IFM/TNN	
nbr d'éch testés en MAIGA		49	41	16	106
		plasma	plasma	plvt à terme sérum	
Do à 450nm	NR sur WT	49	17	16	
	Nég. sur WT	-	23	-	
	Pos. sur WT	-	1	-	
	Nég. sur Pool	48	40	16	
	Pos. sur Pool	1	1	-	

Table 2: Résultats de la cohorte de sujets sains/grossesses

5.2. Les transplantés pulmonaires

Le sérum pré-greffe (J0), et les sérums post-greffe (allant de J15 à M12) de 35 transplantés pulmonaires ont été étudiés (Table 3). Dans la première année, huit transplantés ont fait des rejets aigus et sept ont développé un rejet chronique. Dix-sept produisaient des DSA après transplantations. Un seul rejet aigu était associé à la détection de DSA.

Trois sérums de deux transplantés (patient n°33 à J0 et patient n°9 à J15 et M1) avaient les critères positifs de réactivité anti-HLA-G lors du test de dépistage. Cependant, ces critères

devenaient négatifs chez les 3 sérums, après identification et un nouveau dépistage avec le pool. Aussi, la recherche d'anticorps anti-HLA-G était négative pour tous les sérums étudiés. Cependant, comme pour les deux transplantés sus-cités, certains sérums de 10 autres transplantés avaient une réactivité avec une densité optique $> 0,150$ pour la lignée transduite, mais avec un ratio proche de 1 entre la lignée transduite et la lignée sauvage : ne signant pas une détection spécifique d'anticorps anti-HLA-G. Il s'agirait très probablement d'une détection d'anticorps contre un antigène cellulaire non identifié exprimé par la lignée cellulaire. Ces cas ont été confirmés par la reproduction du test au moins une fois, soit en dépistage soit en identification soit les deux. Aussi, sept sérums avaient cette réactivité positive avant transplantation (à J0), 3 sérums positifs à J15, 3 sérums positifs à M1 et 2 sérums positifs à M3 après la transplantation. Seulement trois patients avaient cette réactivité reproductible à différents temps, le transplanté n°23 (à J0 et à J15), le n°25 (à M1 et M3) et le n°9 (à J15 et M1). Ce dernier était transplanté pour emphysème et produisait un DSA anti-B7 avant transplantation et persistant jusqu'à M3 avec une intensité de fluorescence variant de 13 000 à 7000. Le patient n°23 était transplanté pour une dysplasie bronchique. Aucun évènement humoral n'était détecté jusqu'à M12. Le patient n°25 était transplanté pour une fibrose pulmonaire et produisait un DSA anti-DQ7 avec une intensité de fluorescence de 7000 dès J15 jusqu'à M12. Aucun de ces 3 patients ne se compliquait de rejet aigu dans la première année. Le patient n°23 déclarait un rejet chronique. Le groupe sanguin des trois patients était différent (données non montrées). Les données sont résumées en Table 3.

Synthèse P. Transplantés - 20190924

Légende

Sur puits WT
Ratio $\frac{Do_{Pool}}{Do_{WT}} > 1.2$ Sur puits Pool
Do > 0,150

Contexte cohorte	Patients	Dates de prélèvements (J : Jour ; M: Mois)										maladie	rejet aigu	rejet chronique	DSA	génotypes HLA-G	Haplotypes UTR
		Jo	J15	M1	M3	M12	Do WT/ser à 20% data brute	Do Pool/ser à20% data brute	Do WT/ser à 20% data brute	Do Pool/ser à20% data brute	Do WT/ser à 20% data brute						
Patients Transplantés Pulmonaires	1	NR	NR	0,055	0,066	0,054	0,058	0,052	0,073	0,055	0,056	Histicocytose		oui	J15		
	2	0,099	0,082	0,059	0,071	0,071	0,061	0,085	0,058	0,07	0,06	Mucoviscidose			J15		
	3	0,062	0,058	0,051	0,063	NR	NR	0,074	0,06	0,059	0,058	Fibrose			M1		
	4	0,115	0,136	0,154	0,127	0,115	0,106	0,06	0,063	0,084	0,092	Fibrose	M12		J15		
	5	0,149	0,182	0,064	0,08	0,09	0,108	0,076	0,082	0,071	0,107	Emphysème					
	6	0,078	0,077	NR	NR	0,058	0,061	0,052	0,059	0,051	0,056	NR					
	7	0,06	0,065	0,056	0,058	0,051	0,051	0,061	0,067	0,061	0,067	Emphysème				G*01:01,G*01:06	UTR2,UTR6
	8	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,068	0,072	NR	NR	Mucoviscidose				G*01:01,G*01:04	UTR1,UTR3
	9	0,062	0,105	0,096	0,325	0,262	0,734	0,058	0,076	0,057	0,088	Emphysème			J0	G*01:01,G*01:06	UTR2,UTR2
	10	1,162	0,627	0,064	0,057	0,167	0,081	0,074	0,077	0,072	0,068	Mucoviscidose			M1		
	11	0,385	0,394	0,065	0,074	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Emphysème			J15		
	12	0,05	0,063	0,061	0,066	0,059	0,07	0,061	0,06	0,052	0,059	NR	M1		J15	G*01:01 ,G*01:05N	UTR4,UTR3
	13	0,102	0,103	0,064	0,062	0,088	0,084	0,07	0,057	0,066	0,072	Mucoviscidose			M1	G*01:01 ,*--	UTR1,UTR2
	14	0,35	0,069	NR	NR	0,057	0,06	0,061	0,059	0,09	0,068	Fibrose				G*01:01,G*01:04	UTR3,UTR7
	15	0,086	0,078	0,054	0,057	0,064	0,06	0,068	0,064	0,057	0,078	Mucoviscidose			M1	G*01:01 ,*--	UTR1,UTR2
	16	0,06	0,06	NR	NR	0,29	0,23	0,06	0,06	0,06	0,07	Fibrose					
	17	0,101	0,088	0,053	0,102	0,064	0,076	0,078	0,085	0,07	0,07	Fibrose			J15	G*01:01 ,G*01:03	UTR1, UTR2

18	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,057	0,055	NR	NR	Mucoviscidose			J0	G*01:01,*--	UTR4,UTR2
19	0,728	0,564	0,134	0,104	0,112	0,094	0,081	0,073	0,08	0,074	Mucoviscidose			J15	G*01:03,G*01:06	UTR2,UTR5
20	0,122	0,081	0,314	0,247	0,054	0,059	0,057	0,07	0,06	0,077	Mucoviscidose					
21	0,078	0,068	0,071	0,058	NR	NR	0,051	0,059	0,07	0,093	Fibrose	M3	oui	M1		
22	0,138	0,143	0,059	0,054	0,059	0,063	0,058	0,07	0,055	0,075	Emphysème		oui	J15	G*01:01,*--	UTR1,UTR2
23	0,194	0,209	0,116	0,178	0,118	0,301	0,117	0,192	NR	NR	Dysplasie bronchique		oui			
24	0,076	0,07	0,058	0,059	0,134	0,055	0,058	0,055	0,065	0,069	Mucoviscidose			J0		
25	0,11	0,117	0,1	0,072	0,194	0,194	0,418	0,466	0,082	0,068	Fibrose			J15		
26	NR	NR	0,077	0,081	NR	NR	NR	NR	0,056	0,068	Mucoviscidose			J15	G*01:01,*--	UTR1,UTR2
27	0,059	0,065	0,061	0,058	0,055	0,069	0,059	0,058	0,07	0,063	Emphysème	M12	oui	M1	G*01:01,*--	UTR1,UTR2
28	0,169	0,208	0,057	0,059	0,125	0,074	0,061	0,074	0,06	0,063	Mucoviscidose	M3			G*01;01,*--	UTR2,UTR4
29	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,07	0,058	NR	NR	NR					
30	0,073	0,081	NR	NR	0,078	0,096	0,058	0,067	NR	NR	NR	M3			G*01:01,*--	UTR1,UTR2
31	0,083	0,077	NR	NR	0,055	0,062	0,056	0,054	0,064	0,069	Mucoviscidose		oui	J0	G*01:01,*--	UTR7,UTR1
32	0,07	0,101	0,067	0,068	0,094	0,079	0,139	0,154	0,071	0,061	Fibrose					
33	0,61	0,397	0,057	0,054	0,11	0,1	0,066	0,058	0,088	0,065	Mucoviscidose	M3		M1		
34	NR	NR	NR	NR	0,06	0,066	NR	NR	0,053	0,058	Emphysème					
35	0,077	0,1	NR	NR	0,076	0,084	0,063	0,076	0,08	0,131	Fibrose		oui		G*01:01,*--	UTR1,UTR1

Table 3: Cohorte des patients Transplantés Pulmonaires : Résultats et Description

DISCUSSION

Environ 5000 transplantations d'organes sont réalisées chaque année en France (données agence de Biomédecine, rapport d'activité). Leur suivi est émaillé malgré l'utilisation d'immunosuppresseurs par la survenue d'épisodes de rejets aigus entraînant un rejet chronique, jusqu'à parfois la perte de greffon. La connaissance des mécanismes d'allo-réactivité régissant ces complications est essentielle. Parmi ceux-ci, la détection de DSA par la technique luminex après la transplantation est reconnue à ce jour comme un évènement de mauvais pronostic [18]. Dans certains cas, elle est même concomitante à un rejet aigu suivi d'une perte rapide du greffon. L'apparition de DSA chez les transplantés pulmonaires est très précoce dès le premier mois et leur persistance à 3 mois et à 1 an semble être associée à la survenue d'un rejet chronique (Picard, C. données personnelles). A l'opposé, il a été montré que l'expression d'HLA-G sur le greffon limite la survenue de rejet aigu, probablement en induisant une tolérance immunitaire dans le microenvironnement pulmonaire [40]. Cependant, malgré cette expression, certains transplantés rejettent leur greffon. Les études récentes ont montré que la molécule HLA-G pouvait être la cible d'auto-anticorps chez des sujets sains comme chez des patients atteints de maladies auto-immunes [35, 36]. La technique luminex était utilisée pour les détecter. Il est connu que la liaison des molécules HLA de classe I sur les billes du luminex ne soit pas toujours intègre. Aussi, il est possible que les anticorps détectés soient dirigés contre des molécules HLA-G dénaturées, c'est-à-dire ne liant pas la B2M. Ses formes peuvent être la cible d'anticorps naturels reconnaissant le domaine alpha3 couvert par la B2M [28]. Plus intéressant, il semble que certaines isoformes d'HLA-G soit associées à un plus mauvais pronostic que d'autres, pouvant suggérer que les patients peuvent aussi produire des allo-anticorps contre différentes formes d'HLA-G [15]. Cette molécule exprimée au niveau des membranes extra-

villeuses a un rôle essentiel lors de la grossesse, en particulier dans la tolérance du tissu fœtal vis-à-vis du système immunitaire. Certains allèles HLA-G semblent être associés à des complications telles que la pré-éclampsie [41, 42]. Aussi, l'hypothèse de mon travail est que la molécule HLA-G peut être la cible d'allo-immunisation. Cette dernière entraîne une incapacité d'induire un microenvironnement tolérant, en empêchant l'interaction de la molécule HLA-G avec ses récepteurs immunomodulateurs. Mon travail a donc porté sur la mise en place d'une technique permettant la détection d'anticorps dirigés contre les molécules HLA-G intègres, forme *in vivo* la plus exprimée sur le greffon. Après une lecture exhaustive de la littérature et l'échec des tests de réactivité par technique Western-Blot, l'adaptation d'une technique utilisée dans le laboratoire pour la détection d'anticorps anti-glycoprotéines plaquettaire, le MAIPA nous a semblé pertinente. Cette technique nécessite cependant beaucoup de matériels cellulaires et une expression cellulaire d'HLA-G suffisante, constante et reproductible. Pour identifier des allo-anticorps dirigés contre les différentes isoformes HLA-G, il a fallu identifier un modèle d'expression cellulaire qui puisse les produire en respectant une expression similaire. Aussi, notre modèle de production des différentes isoformes HLA-G fut la lignée cellulaire SPI-801 dérivée de K562 transduite par des lentivirus insérant dans le génome cellulaire les différentes constructions d'HLA-G. Ces cellules ont été choisies parce qu'elles sont dépourvues d'expression de molécules HLA de classe I. Trois constructions HLA-G : HLA-G*01:01, HLA-G*01:04, HLA-G*01:06, et deux HLA-E : HLA-E*01 :01 et HLA-E*01 :03 ont été introduites dans le lentivirus pWPXL, par une technique utilisée au sein du laboratoire de recherche « biologie des groupes sanguins ». Le niveau d'expression des productions a été validé par les techniques de Western-Blot et de cytométrie en flux par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, spécifiques des différentes molécules HLA de classe I non classique et non spécifique reconnaissant la B2M. Ces lignées dont l'expression de la molécule d'intérêt était validée, étaient amplifiées puis aliquotées à raison de 10 millions de cellules et stockées à -80°C. Cette phase a nécessité plus d'un an de travail. De manière intéressante, les trois isoformes HLA-G

étaient fortement exprimées à la surface cellulaire avec une intensité relativement similaire. Par contre, HLA-E*01 :03 était plus fortement exprimé que HLA-E*01 :01 mais moins que les isoformes HLA-G, comme l'atteste les résultats de Western-Blot par l'utilisation de l'anticorps anti-B2M.

Le MAIGA est une réelle adaptation du MAIPA commercialisé par la société ApDIA ®. La raison de ce choix est que les molécules HLA sont parfaitement extraites par cette technique à partir de plaquettes. En effet, en routine, dans le contexte de thrombopénie néo-natale, des réactivités du sérum de la mère sont détectées contre les molécules HLA du père. Le principe est de réaliser un test ELISA après immunocapture des molécules HLA. Notre objectif, étant d'avoir un test le plus reproductible possible et indépendant de toute préparation de solution maison, les plaques de capture, le tampon de lyse contenant du triton et le conjugué de la trousse commerciale ApDIA ont été utilisés. Afin de s'assurer un contrôle qualité supplémentaire sur notre adaptation, les mêmes lots des trouses étaient utilisés pour identifier les anticorps anti-glycoprotéines plaquettaires en routine. L'adaptation a consisté à remplacer les anticorps monoclonaux qui se lient aux glycoprotéines plaquettaires ou aux HLA de classe I classique par un anticorps monoclonal qui se lie de manière spécifique aux molécules HLA-G associées à la B2M. Notre choix s'est porté à l'anticorps MEM-G9 qui possède ces propriétés de liaison. Il est utilisé aujourd'hui comme l'anticorps de capture de l'ELISA de la société Biovendor permettant la détection et la quantification des molécules HLA-G solubles. Bien que nous et d'autres, avons montré préalablement dans une autre étude que cet anticorps n'avait pas une spécificité absolue pour les molécules HLA-G (données non publiées), l'utilisation de lignées n'exprimant que les molécules HLA-G limite le risque de contamination par d'autres molécules HLA de classe I classique et non classique. De même, la liaison de l'anticorps avec l'antigène après la lyse diminue le risque de contamination par les formes solubles de HLA classique.

La première étape de la validation fut de démontrer que dans les conditions du kit MAIPA ApDIA, les différentes isoformes HLA-G étaient isolées par un anticorps de capture

reconnaissant la B2M. Aussi, la molécule HLA-G capturée après lyse cellulaire par le tampon ApDIA était détectée par Western-Blot. Dans un second temps, un essai similaire a été réalisé avec le clone MEM-G9. Comme pour le clone B2M, toutes les isoformes HLA-G étaient mises en évidence par Western-Blot. Afin de vérifier la spécificité de la capture par MEM-G9, la molécule HLA-E n'était pas détectée.

Afin de mettre au point la technique MAIGA, il a été nécessaire de rechercher un contrôle positif. En premier lieu, nous avons contacté l'équipe de la fondation Terasaki. Cette demande n'a pas abouti, cette dernière prétextant qu'elle n'avait pas à disposition ce type de contrôle à ce jour et qu'il fallait réaliser une démarche réglementaire pour en obtenir. Aussi, nous avons décidé de dépister un prélèvement possédant des anticorps anti-HLA-G, à partir de différents sérums et plasmas de sujets sains et de contrôles positifs d'anticorps anti-HLA de différents lots de trousse MAIPA ApDIA. A notre grande surprise, nous avons identifié une réactivité positive spécifique contre les différentes isoformes HLA-G chez le contrôle positif « CONTR HLA » du MAIPA ApDIA. Ce sérum est issu d'un seul donneur, selon les informations du fournisseur. La positivité du sérum était très forte, avec une densité optique (DO) > 3 pour l'isoforme HLA-G*01:01. Par contre, la DO était < 0.1 lorsque le MAIGA était réalisé avec la lignée sauvage ou transduite avec HLA-E*01:03, suggérant une spécificité de la réactivité du « CONTR HLA ». De manière intéressante, la réactivité de ce plasma était similaire pour toutes les isoformes HLA-G. Aussi, grâce à ce contrôle positif, nous avons pu valider et optimiser l'ensemble de la technique MAIGA, telle que la quantité de cellules à lyser pour constituer un pool des 3 isoformes et la concentration d'anticorps secondaires (données non montrées). Les contrôles négatifs ont permis de déterminer la dilution optimale des sérums pour limiter le bruit de fond de la réactivité ainsi qu'un seuil de positivité et d'un ratio de la DO du MAIGA entre les cellules transduites et sauvage. Aussi, il a été convenu que les sérums et les plasmas soient dilués à 20% dans du PBS. La moyenne de densité optique en l'absence de réactivité est de 0.07 +/- 0.2 et la moyenne des ratios entre cellules transduites et sauvage est de 1.02. De manière

arbitraire, un résultat positif est une différence de ratio $> 1,5$ pour des DO $> 0,150$ pour les cellules transduites. Aussi, le dépistage d'anticorps anti-HLA-G a été réalisé par la technique MAIGA en mettant en contact chaque sérum ou plasma avec un pool de lignées cellulaires contenant les différentes isoformes HLA-G et la lignée sauvage. Tout résultat positif suivant nos critères était confirmée par une technique MAIGA d'identification, comprenant les 3 lignées transduites, la lignée HLA-E et la lignée sauvage. Quatre-vingt-dix sujets sains ont été testés avec un sex ratio de 0.54 et un âge médian de 42 ans (18 ans – 65 ans). A notre surprise, un seul sujet semble posséder des anticorps anti-HLA-G. Il s'agit d'une femme de 22 ans sans facteur de risque d'allo-immunisation et notamment sans grossesse signalée. La densité optique des MAIGA réalisés à partir des lignées transduites et non transduites était < 0.150 pour l'ensemble des autres sujets sains. Aussi, au contraire de la publication de l'équipe de Ravindranath, la détection des anticorps anti-HLA-G semble rare chez les sujets sains. Il est possible que notre cohorte soit trop petite. Cependant, leur cohorte était composée de 16 donneurs et 5 avaient une réactivité positive contre la molécule HLA-G. Notre technique peut être moins sensible que celle utilisant le luminex. Cependant, nous avons montré préalablement que la détection des allo-anticorps anti-HLA de classe I classique à partir d'une lyse plaquettaire est aussi sensible que par la technique luminex (données non montrées). Les molécules HLA-G fixées sur les billes du luminex peuvent avoir une structure secondaire et tertiaire différentes de celles isolées par la technique MAIGA. Les formes dénaturées des molécules HLA sont fréquentes par le luminex [16]. La technique MAIGA ne détecte que les formes complètes avec très probablement une structure moléculaire similaire à celle existante *in vivo*. Aussi, il est possible que le luminex détecte des anticorps contre des structures qui n'existent pas *in vivo* ou qui sont seulement présentes dans un microenvironnement donné. Il serait intéressant de tester dans notre système un autre clone d'immunocapture, qui reconnaît les formes dénaturées d'HLA-G. Une autre hypothèse de l'absence de réactivité est qu'il existe une compétition de fixation entre le clone MEM-G9 et les anticorps potentiellement présents dans les sérums. Dans

ces conditions, un autre clone monoclonal de capture doit être utilisé. Aussi, aucune réactivité n'était détectée lorsque l'immunocapture a lieu avec un clone B2M pour quelques sérums, confirmant l'absence d'anticorps anti-HLA-G. Cependant, la liaison de B2M étant non covalente avec HLA-G, il est possible que cet anticorps ne se lie pas à chaque fois à la molécule HLA-G, diminuant sa sensibilité de détection aux anticorps anti-HLA-G. Finalement, la production des anticorps anti-HLA-G peut varier en fonction de l'environnement tel que les saisons, les allergies, les fumeurs... et l'origine géographique des individus. Ces derniers critères ne sont pas renseignés. De même, aucune des 16 femmes prélevées après accouchement n'avaient d'anticorps anti-HLA-G détecté. Ce résultat est intéressant puisque les molécules HLA-G sont essentielles dans la tolérance du conflit foeto-maternel. Le biais de cette cohorte est que ces femmes avaient été prélevées dans un contexte de suspicion d'incompatibilité foeto-maternelle plaquettaire. La plupart étaient des primipares et avaient été prélevées précocement (au maximum à 3 jours) après la grossesse. Il est possible que les anticorps anti-HLA-G comme les anticorps anti-HLA de classe I classique se détectent seulement à 1 mois après l'accouchement lors d'une première grossesse et augmentent progressivement en fonction du nombre de grossesse. De même, cette complication des femmes enceintes est très différente sur le plan physiopathologique à la survenue de pré-éclampsie ou de perte fœtale inexplicée du deuxième et du troisième trimestre. Notamment, l'allèle HLA-G*01:06~UTR2 a été impliqué dans les évolutions péjoratives de grossesse impliquant des mécanismes de rupture de tolérance dans différentes populations [41, 42]. L'allèle HLA-G*01:06 est caractérisé par une substitution d'acide aminé au codon 258 (Thr vs Met) dans l'exon 4 qui code pour le domaine extramembranaire alpha3. Les récepteurs ILT-2 et ILT-4, qui sont les principaux vecteurs des propriétés tolérogènes de HLA-G, interagissent avec ce domaine. Des sérums prélevés chez les femmes enceintes lors de la survenue de complications et à distance de l'accouchement seraient souhaitables.

Le sérum pré-greffe (J0), et les sérums post-greffe (allant de J15 à M3) de 35 transplantés pulmonaires ont été étudiés. Nous avons montré précédemment à partir d'une cohorte de 138 patients transplantés que l'haplotype HLA-G*01:06~UTR2 était probablement un facteur prédictif péjoratif de l'évolution de la mucoviscidose et que l'haplotype HLA-G*01:04~UTR3, associé à un niveau faible de production d'HLA-G soluble, étaient corrélés à une augmentation de rejet chronique, à la survenue d'anticorps anti-HLA et à une diminution de survie des patients [15].

Aucun anticorps anti-HLA-G n'a été détecté sur l'ensemble des transplantés. Comme pour deux sujets sains, 12 patients avaient une réactivité non spécifique des lignées transduites HLA-G. Seulement trois patients reproduisaient ces résultats au cours de la transplantation. Les complications aiguës et chroniques dans les transplantations pulmonaires peuvent être liées à la survenue d'une dysrégulation immunitaire induisant une auto-immunité et une allo-immunité humorale et cellulaire. Des travaux récents suggèrent qu'une réaction auto-immune est un élément clé dans la survenue du rejet chronique du greffon [43]. Le développement d'anticorps dirigés contre la Tubuline K- α 1, protéine membranaire exprimée par les cellules épithéliales bronchiques, et contre le collagène type V, protéine de la matrice extracellulaire normalement séquestrée au sein du tissu bronchique, est fortement corrélé à la survenue d'un syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS) après transplantation pulmonaire [44]. De même, une équipe a récemment montré qu'un profil d'auto-réactivité pouvait être associé à la défaillance primaire de fonction du greffon mais aussi à l'évolution de BOS [45]. La production de ces auto-anticorps est secondaire à l'exposition d'antigènes cryptiques du soi liée au remodelage tissulaire après TP, à l'expression de néo-antigènes en contexte inflammatoire et à la stimulation d'une réaction croisée par mimétisme antigénique entre des agents pathogènes et des antigènes du soi [46]. Plus récemment, il a été montré que le relargage d'exosomes du greffon dans un contexte inflammatoire augmentait le risque d'auto-immunité [47].

Ce qui est aussi intrigant est que cette détection fait suite à une capture par le MEM-G9 sans liaison avec HLA-G. Nous avons vérifié que ce ne sont pas des molécules HLA de classe I. Aussi, ceci signifie que malgré des lavages stringents, la liaison de MEM-G9 avec des protéines non spécifiques est possible. Une autre hypothèse est que ces patients possèdent des complexes circulants d'anticorps anti-HLA-G couplé à leur cible et qu'ils soient détectés par la technique MAIGA lors de l'immunoprécipitation. Cependant, l'étape de lavage avant l'immunoprécipitation diminue ce risque. Afin d'éliminer ces anticorps qui pourraient masquer des anticorps anti-HLA-G, des essais d'absorption des anticorps sur les lignées sauvages pourrait être testés. De même, l'identification des anticorps sur cette lignée pourrait avoir un intérêt clinique. Les cibles antigéniques pourraient être identifiées par Western-Blot après immunoprécipitation par MEM-G9 puis après isolement sur gel, par séquençage peptidique. Le Western-Blot pourrait nous indiquer si les réactivités des sérums des différents patients sont liées à un seul antigène ou à des antigènes différents.

En dernier lieu, seulement deux des transplantés possédaient l'haplotype HLA-G*01:04~UTR2. L'haplotype UTR2 est reconnu comme associé à une diminution d'expression d'HLA-G [5]. Une des hypothèses de survenue d'auto-anticorps et/ou d'allo-anticorps anti-HLA-G est l'augmentation d'expression d'HLA-G par le greffon, lors d'un syndrome inflammatoire comme pour HLA-E. De plus, dans notre étude, les allèles HLA-G du greffon, cible de l'allo-immunité, ne sont pas connus et ainsi, l'incompatibilité allélique HLA-G entre l'hôte et le greffon ne pouvait être déterminée afin d'affiner la recherche d'allo-anticorps anti-HLA-G en fonction de l'isoforme HLA-G du donneur. Dans ce contexte, un article récent mettait en exergue que HLA-G*01:03 du donneur était associé à une diminution de risque de mortalité [48].

CONCLUSION/PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons validé une nouvelle technologie adaptée du MAIPA pour détecter les anticorps dirigés contre les différentes isoformes HLA-G. Elle se caractérise par une technique ELISA précédé d'un processus d'immunocapture spécifique de la molécule HLA-G associée avec la B2M exprimée à partir de lignées cellulaires transduites. Seulement deux sérums sur 250 ont été retrouvés réactifs contre les molécules HLA-G, indépendamment des isoformes suggérant la détection d'auto-anticorps plus que d'allo-anticorps anti HLA-G. Ces sérums, notamment le CONTR HLA de la trousse MAIPA ApDIA doivent être explorés de manière complémentaire afin de déterminer le ou les site(s) antigénique(s) de réactivité. Nonobstant les différentes limites de la technique MAIGA, notre étude montre que la production d'anticorps contre les différentes isoformes sauvages d'HLA-G est rare chez les sujets sains voire totalement absente chez les femmes après accouchement et chez les transplantés pulmonaires. Afin de confirmer définitivement à une absence d'anticorps anti-HLA-G chez les sujets sains et les patients, l'immunocapture des différentes isoformes d'HLA-G associée ou non avec la B2M, devrait être réalisée par d'autres clones monoclonaux. Finalement, outre l'augmentation des cohortes de transplantés et de patients atteints de maladies auto-immunes, la recherche d'anticorps anti-HLA-G devra être complétée par ceux dirigés contre les molécules HLA-E et HLA-F.

ANNEXES

Table 4: Résultats (DO) de la cohorte de sujets sains : Femmes

		Do < 0,15					Do > 0,30				
		Essai 1					Essai 2 (Reprise)				
contexte cohorte	noms patients ou sujets sains	Do Moy BLC	Do CTL HLA 20% Pool	Do CTRL Nég 20% Pool	Do WT serum 20%	Do Pool serum 20%	Do Moy BLC	Do CTL HLA 20% Pool	Do CTRL Nég 20% Pool	Do WT serum 20%	Do Pool serum 20%
Femmes Sains	1	0,05	1,51	0,068	NR	0,053					
	2	0,05	1,51	0,068	NR	0,102					
	3	0,05	1,51	0,068	NR	0,067					
	4	0,05	1,51	0,068	NR	0,144	0,06	1,45	0,088	0,131	0,119
	5	0,05	1,51	0,068	NR	0,052					
	6	0,05	1,51	0,068	NR	0,061					
	7	0,05	1,51	0,068	NR	0,102					
	8	0,05	1,51	0,068	NR	0,053					
	9	0,05	1,51	0,068	NR	0,053					
	10	0,05	1,51	0,068	NR	0,102					
	11	0,05	1,51	0,068	NR	0,067					
	12	0,05	1,51	0,068	NR	0,144	0,06	1,45	0,088	0,067	0,057
	13	0,05	1,51	0,068	NR	0,052					
	14	0,05	1,51	0,068	NR	0,061					
	15	0,05	1,51	0,068	NR	0,102					
	16	0,05	1,51	0,068	NR	0,063					
	17	0,05	1,51	0,068	NR	0,064					
	18	0,05	1,51	0,068	NR	0,089					
	19	0,05	1,51	0,068	NR	0,07					
	20	0,05	1,51	0,068	NR	0,063					
	21	0,05	1,51	0,068	NR	0,103					
	22	0,05	1,51	0,068	NR	0,082					
	23	0,05	1,51	0,068	NR	0,088					
	24	0,05	1,51	0,068	NR	0,054					
	25	0,05	1,51	0,068	NR	0,062					
	26	0,05	1,51	0,068	NR	0,054					
	27	0,05	1,51	0,068	NR	0,054					
	28	0,05	1,51	0,068	NR	0,067					
	29	0,05	1,51	0,068	NR	0,062					
	30	0,05	1,51	0,068	NR	0,128					
	31	0,05	1,51	0,068	NR	0,09					
	32	0,05	1,51	0,068	NR	0,081					
	33	0,05	1,51	0,068	NR	0,067					
	34	0,05	1,51	0,068	NR	0,061					
	35	0,05	1,51	0,068	NR	0,064					
	36	0,05	1,51	0,068	NR	0,082					
	37	0,05	1,51	0,068	NR	0,068					
	38	0,05	1,51	0,068	NR	0,065					
	39	0,05	1,51	0,068	NR	0,081					
	40	0,05	2,13	0,077	NR	0,055					
	41	0,05	2,13	0,077	NR	0,055					
	42	0,05	2,13	0,077	NR	0,792					
	43	0,05	2,13	0,077	NR	0,063					
	44	0,05	2,13	0,077	NR	0,055					
	45	0,05	2,13	0,077	NR	0,052					
	46	0,05	2,13	0,077	NR	0,056					
	47	0,05	2,13	0,077	NR	0,08					
	48	0,05	2,13	0,077	NR	0,075					
	49	0,05	2,13	0,077	NR	0,094					

RÉFÉRENCES

1. Carosella, E.D., et al., *HLA-G: from biology to clinical benefits*. Trends Immunol, 2008. **29**(3): p. 125-32.
2. Riteau, B., et al., *HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition*. Int Immunol, 2001. **13**(2): p. 193-201.
3. Gong, F., et al., *Human leukocyte antigen E in human cytomegalovirus infection: friend or foe?* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012. **44**(7): p. 551-4.
4. Naji, A., et al., *CD3+CD4low and CD3+CD8low are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance*. Blood, 2007. **110**(12): p. 3936-48.
5. Di Cristofaro, J., et al., *HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression*. Hum Immunol, 2013. **74**(2): p. 203-6.
6. Rousseau, P., et al., *The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability*. Hum Immunol, 2003. **64**(11): p. 1005-10.
7. Carlini, F., et al., *HLA-G UTR haplotype conservation in the Malian population: association with soluble HLA-G*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82517.
8. Ober, C., et al., *Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A1*. J Reprod Immunol, 1996. **32**(2): p. 111-23.
9. Clements, C.S., et al., *The production, purification and crystallization of a soluble form of the nonclassical MHC HLA-G: the essential role of cobalt*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2006. **62**(Pt 1): p. 70-3.
10. Coupel, S., et al., *Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation*. Blood, 2007. **109**(7): p. 2806-14.
11. Antoun, A., et al., *Ethnic variability in human leukocyte antigen-E haplotypes*. Tissue Antigens, 2009. **73**(1): p. 39-45.
12. Di Cristofaro, J., et al., *Linkage disequilibrium between HLA-G*0104 and HLA-E*0103 alleles in Tswa Pygmies*. Tissue Antigens, 2011. **77**(3): p. 193-200.
13. Sullivan, L.C., et al., *The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity*. Tissue Antigens, 2008. **72**(5): p. 415-24.
14. Di Cristofaro, J., et al., *HLA-E(01:03 Allele in Lung Transplant Recipients Correlates with Higher Chronic Lung Allograft Dysfunction Occurrence*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 1910852.
15. Di Cristofaro, J., et al., *HLA-G*01:04 approximately UTR3 Recipient Correlates With Lower Survival and Higher Frequency of Chronic Rejection After Lung Transplantation*. Am J Transplant, 2015. **15**(9): p. 2413-20.
16. Ravindranath, M.H., et al., *Antibodies to HLA-E in nonalloimmunized males: pattern of HLA-Ia reactivity of anti-HLA-E-positive sera*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1935-48.
17. Goel, R., et al., *Soluble-HLA-E: A follow up biomarker in Takayasu arteritis, independent of HLA-E genotype*. Int J Rheum Dis, 2018. **21**(2): p. 532-540.
18. Courant, M., et al., *The disappointing contribution of anti-human leukocyte antigen donor-specific antibodies characteristics for predicting allograft loss*. Nephrol Dial Transplant, 2018. **33**(10): p. 1872.

19. Pratschke, J., et al., *Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2016. **30**(2): p. 77-84.
20. Patel, R. and P.I. Terasaki, *Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation*. *N Engl J Med*, 1969. **280**(14): p. 735-9.
21. Gebel, H.M., et al., *Conundrums with FlowPRA beads*. *Clin Transplant*, 2002. **16 Suppl 7**: p. 24-9.
22. Bray, R.A., et al., *Evolution of HLA antibody detection: technology emulating biology*. *Immunol Res*, 2004. **29**(1-3): p. 41-54.
23. Lefaucheur, C., et al., *Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation*. *Contrib Nephrol*, 2009. **162**: p. 1-12.
24. Zoet, Y.M., et al., *Challenging the golden standard in defining donor-specific antibodies: does the solid phase assay meet the expectations?* *Tissue Antigens*, 2011. **77**(3): p. 225-8.
25. Hourmant, M., et al., *[The new French rules for the attribution of renal transplants]*. *Nephrol Ther*, 2005. **1**(1): p. 7-13.
26. Claas, F.H., *Clinical relevance of circulating donor-specific HLA antibodies*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2010. **15**(4): p. 462-6.
27. Morales-Buenrostro, L.E., et al., *"Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males*. *Transplantation*, 2008. **86**(8): p. 1111-5.
28. Ravindranath, M.H., et al., *Antibodies to HLA-E may account for the non-donor-specific anti-HLA class-Ia antibodies in renal and liver transplant recipients*. *Int Immunol*, 2012. **24**(1): p. 43-57.
29. Ravindranath, M.H., et al., *Therapeutic preparations of IVIg contain naturally occurring anti-HLA-E antibodies that react with HLA-Ia (HLA-A/-B/-Cw) alleles*. *Blood*, 2013. **121**(11): p. 2013-28.
30. Ravindranath, M.H., et al., *The Monospecificity of Novel Anti-HLA-E Monoclonal Antibodies Enables Reliable Immunodiagnosis, Immunomodulation of HLA-E, and Upregulation of CD8+ T Lymphocytes*. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2015. **34**(3): p. 135-53.
31. Terasaki, P.I., V.D. Mottironi, and E.V. Barnett, *Cytotoxins in disease. Autocytotoxins in lupus*. *N Engl J Med*, 1970. **283**(14): p. 724-8.
32. Rahman, A. and D.A. Isenberg, *Systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(9): p. 929-39.
33. Criswell, L.A., *The genetic contribution to systemic lupus erythematosus*. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2008. **66**(3): p. 176-83.
34. Zhou, B., et al., *Existence of an immunoglobulin G component of naturally occurring HLA class I antibodies that are not directed against self-antigens in human serum*. *Tissue Antigens*, 2008. **72**(2): p. 98-104.
35. Jucaud, V., et al., *Serum antibodies to human leukocyte antigen (HLA)-E, HLA-F and HLA-G in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) during disease flares: Clinical relevance of HLA-F autoantibodies*. *Clin Exp Immunol*, 2016. **183**(3): p. 326-40.
36. Jucaud, V., M.H. Ravindranath, and P.I. Terasaki, *Conformational Variants of the Individual HLA-I Antigens on Luminex Single Antigen Beads Used in Monitoring HLA Antibodies: Problems and Solutions*. *Transplantation*, 2017. **101**(4): p. 764-777.
37. Allan, D.S., et al., *Tetrameric complexes of HLA-E, HLA-F, and HLA-G*. *J Immunol Methods*, 2002. **268**(1): p. 43-50.

38. Tabayoyong, W.B. and N. Zavazava, *Soluble HLA revisited*. Leuk Res, 2007. **31**(2): p. 121-5.
39. Gonzalez, A., et al., *Identification of circulating nonclassic human leukocyte antigen G (HLA-G)-like molecules in exudates*. Clin Chem, 2011. **57**(7): p. 1013-22.
40. Brugiere, O., et al., *Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients*. Am J Transplant, 2009. **9**(6): p. 1427-38.
41. Moreau, P., et al., *HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G*0106 allele with preeclampsia and miscarriage*. Biol Reprod, 2008. **79**(3): p. 459-67.
42. Tan, C.Y., et al., *Paternal contribution of HLA-G*0106 significantly increases risk for pre-eclampsia in multigravid pregnancies*. Mol Hum Reprod, 2008. **14**(5): p. 317-24.
43. Bharat, A., et al., *Antibodies to self-antigens predispose to primary lung allograft dysfunction and chronic rejection*. Ann Thorac Surg, 2010. **90**(4): p. 1094-101.
44. Rao, U., et al., *Prevalence of antibodies to lung self-antigens (Kalpha1 tubulin and collagen V) and donor specific antibodies to HLA in lung transplant recipients and implications for lung transplant outcomes: Single center experience*. Transpl Immunol, 2019. **54**: p. 65-72.
45. Subramanian, V., et al., *Immune response to tissue-restricted self-antigens induces airway inflammation and fibrosis following murine lung transplantation*. Am J Transplant, 2014. **14**(10): p. 2359-66.
46. Dragun, D., R. Catar, and A. Philippe, *Non-HLA antibodies in solid organ transplantation: recent concepts and clinical relevance*. Curr Opin Organ Transplant, 2013. **18**(4): p. 430-5.
47. Ravichandran, R., et al., *The role of donor-derived exosomes in lung allograft rejection*. Hum Immunol, 2019. **80**(8): p. 588-594.
48. Lazarte, J., et al., *Donor human leukocyte antigen-G single nucleotide polymorphisms are associated with post-lung transplant mortality*. Eur Respir J, 2019. **54**(2).

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

**Détection des Anticorps anti-HLA-G chez les transplantés d'organes -
Impact sur la survenue de rejet aigu et chronique**

Audrey Charlier-Tous

25/11/2019

RÉSUMÉ

Après transplantation d'organe, le devenir sur le long terme du patient reste aujourd'hui non maîtrisé, malgré des traitements immunosuppresseurs efficaces. En effet, la transplantation est un acte lourd qui se complique de rejets aigus et de rejets chroniques du greffon menant à une perte totale de sa fonction. Les anticorps anti-HLA classique dirigés contre les greffons (DSA, *Donor Specific Antibody*), qui sont recherchés de manière systématique en routine médicale, sont un des facteurs immunologiques de survenue de ces complications. Récemment, des auteurs ont mis en évidence des anticorps dirigés contre les molécules HLA non classique, HLA-G, -E et -F dans des pathologies auto-immunes. Ces protéines semblent jouer un rôle essentiel dans l'acceptation immunologique du greffon et certaines de leurs isoformes telles que HLA-G*01:04, et -G*01:06 et -E*01:03 sont associées à une évolution péjorative du greffon chez des transplantés pulmonaires. Aussi, il est possible que ces isoformes soient la cible d'anticorps dans les transplantations d'organes, induisant des rejets.

Aussi, l'objectif de mon travail a été de mettre au point une technique de détection d'anticorps anti-HLA-G dans le sérum et/ou plasma de sujets sains et de patients transplantés compliqués ou non, de rejets aigus et/ou chroniques.

Mon travail a principalement porté sur la mise au point d'une adaptation de la technique d'immunocapture enzymatique MAIPA (MAIGA) de la société ApDIA® afin de détecter les anticorps anti-HLA-G. Aussi, il a consisté tout d'abord à construire des lignées transduites exprimant différentes isoformes HLA-G (HLA-G*01:01, HLA-G*01:04, HLA-G*01:06) et HLA-E (HLA-E*01:01 et HLA-E*01:03), à partir de cellules SPI-801. Dans un second temps, l'identification d'un sérum positif et d'un anticorps monoclonal (MEM-G9) se liant aux différentes isoformes HLA-G avec la B₂-microglobuline ont permis de maîtriser les différentes étapes de la technique MAIGA et de déterminer un seuil de positivité. Enfin, 250 sérums ont été explorés sur cette technique en comparant leur réactivité sur les lignées transduites HLA-G avec la lignée sauvage et la lignée transduite HLA-E*01:03.

Parmi les 90 sujets sains, un seul sérum possédait une réactivité spécifique contre les lignées transduites HLA-G. Elle était négative pour tous les autres sérums testés, que ce soit chez 16 femmes venant d'accoucher et chez 35 transplantés pulmonaires avant et après transplantation. Chez 12 transplantés pulmonaires et deux sujets sains, une réactivité non spécifique était mise en évidence avec les lignées transduites et sauvage, suggérant une reconnaissance d'un autoantigène exprimée par la lignée cellulaire SPI-801.

En conclusion, ce travail a permis de mettre au point un outil de détection spécifique des anticorps anti-HLA-G non-dénaturée. Ces derniers semblent peu fréquents, que ce soit chez les sujets sains ou chez les sujets transplantés compliqués. Afin de confirmer ce résultat qui contraste avec celui de certaines publications, des modifications du système de détection doivent être portées au minimum sur le clone d'immunocapture et le tampon de lyse. Finalement, cette étude préliminaire doit être élargie à la recherche de tous les anticorps anti-HLA non classique et aux cohortes de patients atteints de maladie auto-immune ainsi que des transplantés rénaux et cardiaques.

MOTS CLÉS : transplantation d'organe, rejet du greffon, anticorps anti-HLA-G, technique MAIPA, MEM-G9.