UE6- Immunologie

Vendredi 14 mars : 13h30 -14h30

Pr : A. Toubert

Ronéotypeur : Gabriel Keller

Ronéoficheuse : Emilie Murciano

Cours n°4 : IMMUNOLOGIE DES GREFFES

PLAN :

I/DEFINITION ET RAPPEL :

* Rappel HLA
* Sélection thymique
* Répertoire lymphocytaire
* Typage HLA
* Polymorphisme HLA

II/TRANSPANTATION D’ORGANE :

A/Recherche et identification d’anticorps anti-HLA

a/Circonstance d’apparition

b/Bilan pré-transplantation

c/Identification

d/Anticorps anti-HLA / Cas particulier

B/Crossmatch

a/LCT

b/Cytométrie de flux

C/Examen HLA en urgence

III/GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES :

A/HLA et choix de donneur en greffe de CSH

B/Greffe de CSH :

a/GVL

b/GVH

C/Reconstitution immunitaire post-greffe

**I/DEFINITION ET RAPPEL :**

* **Définition :**

-Greffe : Implantation de tissu sans anastomose vasculaire (moelle osseuse, cornée, peau)

-Transplantation : Prélèvement d’un organe sur un donneur et implantation chez le receveur avec rétablissement de la continuité vasculaire

Il existe différent type de greffe suivant le receveur et le donneur :

-Autogreffe : Donneur et receveur son le même individu (ici pas de différence génétique entre donneur et receveur donc pas de réaction immunitaire, pas abordé dans ce cours)

-Greffe Syngénique ou Isogreffe : Individus génétiquement identiques (jumeaux monozygotes) =>non abordé dans ce cours pour les mêmes raisons que l’autogreffe

-Allogreffe : Individus génétiquement différents de la même espèce

-Xénogreffe : Individus d’espèces animales différentes

* **Rappel HLA**

Molécule transmembranaire, 2 types :

-Classe I : Présent a la surface de l’ensemble des cellules de l’organisme

-Classe II : Uniquement présent a la surface des cellules présentatrice d’antigène (Cellule dendritique, Lymphocyte B, macrophage)

Les molécules HLA permettent la présentation de peptides à la surface des cellules grâce a la présence d’une cavité dans les régions les plus externes

Des millions de peptides sont susceptibles d’être présentés :

* Entre 8-10 aa pour les classes I
* Plus de 13 aa pour les classes II
* Les LT8 reconnaissent les classes I
* Les LT4 reconnaissent les classes II
* **Sélection Thymique**

Phénomène se situant dans le thymus permettant la **reconnaissance du soi** conditionnant **l’éducation** des thymocytes à plusieurs niveaux :

-Sélection positive : Garde les cellules T capables de reconnaître le CMH du soi.

-Sélection négative : Elimination les cellules T autoréactifs

-Détermination du phénotype CD4 et CD8

* **Répertoire lymphocytaire et alloréactivité :**

Fréquence d’un clone T naïfs pour un épitope spécifique d’un pathogène : 1/20 000 à 1/100 000.

Fréquence d’un clone spécifique d’un alloantigène : 1/50

**Le système immunitaire reconnaît plus facilement un alloantigène (cellule ayant un HLA diffèrent du donneur) qu’un pathogène exogène.**

**C est ce qui explique la violence de la réaction immunitaire lors d’un rejet de greffe.**

* **Typage HLA :**

Lors d’un bilan pré greffe il est important de caractériser le type HLA du donneur et du receveur pour évaluer leur compatibilité. On utilise 2 types de techniques :

* Par sérologie (utilisation Ac Anti HLA1/2 marqué) caractérise les différents types de HLA exprimés a la surface des cellules: La microlymphocytotoxicité.

**=> Méthode de Basse Résolution.**

* Par biologie moléculaire qui caractérise la séquence nucléotidique HLA permettant de déterminer les différents types et sous-types de HLA exprimés : PCR dot blot reverse/SSO/SSP/Luminex.

**=> Méthode de Haute Résolution.**



Basse Résolution : 2 chiffres (24 ici) correspondant au groupe d’allèle HLA exprimé par la cellule.

Haute Résolution : 4 chiffres (24 02) correspondant à un niveau de précision +++

C’est le typage allélique.

* **Polymorphisme HLA :**

En effet la précision allélique est importante car les gènes codant pour les HLA sont les plus polymorphes : HLA de classe 1 => 7678 allèles différents.

HLA de classe 2 => 2268

Il existe 6 sous types HLA de classe 1 :

A, B, C, E, F, G

Les plus fréquents sont les sous types A, B et C.

Il existe 6 sous types HLA de classe 2 :

DRA, DRB, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1

Les plus fréquents sont DRB, DQB1 et DPB1.

**II/TRANSPLANTATION D’ORGANES : Ex du rein**

Première transplantation rénale en 1956.

Aujourd’hui environ 2000 greffes rénales par an

Lors d’une transplantation d’organe il y a rétablissement de la continuité vasculaire de l’organe greffé, les premières cellules cibles exposées au système immunitaire de l’hôte sont les cellules endothéliales du greffon.

Il y a ici risque de réaction du système immunitaire et de rejet du greffon

**Différents types de rejet :**

* **Rejet suraigu** (qq min-heure)

**-** Thrombose et infarctus du transplant

- Fixation sur l’endothélium d’Ac préformé chez le receveur

- CROSSMATCH

* **Rejet aigu** (à partir de 4 jours)

-Infiltrat cellulaire du greffon : Reconnaissance par LT4 et LT8 du receveur des Ag du donneur + cytokines produites (IFNg, TNFa) + expression des CMH2

- Production d’alloanticorps et lésion tissulaire par activation du complément et ADCC

- URGENCE MÉDICALE (immunosuppresseurs)

* **Rejet chronique** (>2-3ans plus tard)

- Néphropathie chronique du néphron

- Principale cause d’échec (demi-vie du greffon rénal 10 à 11 ans)

**HLA et transplantation rénale : Avant la greffe**

**-** Typage HLA du receveur et inscription a la liste de l’agence de biomédecine.

- **Typage de Basse Résolution ou générique.**

**- Recherche régulière d’Ac anti HLA**

- Sérothèque (constitution d’une banque de sérum du receveur a la recherche d’Ac anti HLA)

**Lors de la greffe :**

**-** On teste la compatibilité du groupe sanguin ABO

- Typage HLA du donneur (Urgence)

- **CROSSMATCH entre sérum du receveur et lymphocyte du donneur**

**=> si positif c est une CONTRE indication a la greffe +++**

A/Recherche et identification d’Ac Anti HLA

1. Circonstances d’apparition :

* Lors de transfusion :

- Apparition en moyenne 4 semaines après

- Evolution variable

- Diminution des transfusions des hémodialysés

- Utilisation de produits déleucocytés

* Lors de grossesse :

- Fréquence des alloimmunisations foeto-maternelle anti HLA :

10% des primipares

20% de plus après 2 grossesses

- Souvent de haut titre de forte affinité

* Lors de transplantation antérieure :

- Prévalence environ chez 70% des patients après une première greffe :

26% d’Ac anti HLA 1 seul

32% d’Ac anti HLA 1 et 2

18% d’Ac anti HLA 2 seul

1. Bilan pré transplantation :

* Informations cliniques concernant les immunisations anti HLA potentielles **(grossesse, transfusion, première transplantation)**
* Recherche d’Ac anti HLA de classe 1 et 2 :

**- Tous les 3 mois en cas d’ATCD d’immunisation**

**- Par une technique sensible**

**- A J15 et J21 de tout évènement immunisant**

**- Toutes les semaines en cas de désensibilisation**

1. Identification d’Ac anti HLA

* Sérum du patient testé contre un panel d’antigènes HLA
* LCT : Lymphocytotoxicité

- Technique Basse Résolution, simple, peu sensible

- Panel de lymphocytes T témoin (LT dont on connaît le type de HLA qu’il exprime)

- Mélange de LT témoin avec le sérum du receveur

- Ajout de complément et de colorant

Les lymphocytes T, qui fixent les Ac, activent le complément et intègrent le colorant, on peut donc les visualiser et les compter.



* 2 Techniques SENSIBLES utilisant des Ag HLA purifiés :

- Techniques de Haute Résolution

- Identification d’Ac anti HLA de classe 1 et 2

* **ELISA** : Ag fixés dans des puits sur des plaques

On rajoute le sérum du receveur

Antiglobuline humaine couplée à une enzyme dans les puits

Si présence d’Ig il y aura une réaction colorimétrique

* **LUMINEX**: Ag fixés sur des billes

On ajoute le sérum du receveur

Puis on rajoute des Ac anti anti HLA marqué à un fluorochrome

Chaque microsphère est caractérisée par une fluorescence interne

spécifique.

=> Analyse en cytométrie de flux.



d. Ac anti HLA/ cas particuliers :

**NON RÉPONDEUR :**

**-** Problème de sensibilité de techniques

**HYPERIMMUNISÉ : +**

- Reconnaissance par les Ac anti HLA de plus de 80% des différents types de HLA

- Priorité nationale pour attribution de greffon

- Détermination des Ag « permis » (rentrant dans les 20% de HLA non reconnu par les Ac)

- Protocole de désensibilisation

B/ CROSSMATCH +++

**Vérification ultime AVANT transplantation :**

=> Recherche d’absence d’Ac lymphocytotoxique chez le receveur contre les cellules du donneur

**=>** **Test : Lymphocytes du donneur contre Sérum du receveur**

=> Techniques :

- Microlymphocytotoxicité/ kappa/ DTT (non décrite)

- Cytofluorométrie de flux



Les lymphocytes du donneur sont mis en présence du sérum du receveur puis on rajoute des Ac anti anti HLA (= anti IgG humaine) + Ac anti CD3 (spécifique des LT) + Ac anti CD19 (spécifique au LB)

=> Analyse au cytomètre de flux

Mise en évidence des Ac anti HLA et de leur spécificité LB ou LT.

C/ Examen HLA en URGENCE

* **Typage générique HLA de classe 1 et 2 (technique de basse résolution) sur le sang en environ 3h**
* **Cross match T et B sur ganglion 3h**

- Ganglion inguinal ou mésentérique du donneur

- Sérum du patient disponible au labo

- Sérum du jour en cas d’événement immunisant

**III/ GREFFES DE CSH**

En France de plus en plus de greffes de CSH allogéniques sont réalisées :

Plus de 1700 greffes en 2012 dont 1000 avec donneurs non apparentés

Les origines du greffon sont également plus variées avec l’utilisation du sang placentaire : 11,5% des greffes en 2012

**=> Conditionnement myéloablatif**

Au cours d’une greffe de CSH allogénique il y a réalisation de radiothérapie ainsi que de chimiothérapie afin de détruire le maximum de cellules malignes et le système immunitaire du receveur pour limiter le rejet.

A/ HLA et choix du donneur en greffe de CSH

* Allogreffe du CSH NON APPARENTÉES :

- **Typages alléliques (à 4 chiffres : 4-digits) 10/10 en HLA-A,B,C et DRB1,DQB1**

**-** Typage DPB1, DRB3,4,5 non systématiques

* Allogreffe du CSH INTRAFAMILIALE :

- Typage de tous les membres de la famille pour reconstituer les haplotypes

- Typages classe 1(A et B) et 2(DRB1 et DQB1)

sérologie ou basse résolution (2-digits)

- Polymorphisme hors HLA éventuels

- 2 Typages du donneur ET receveur impératifs

B/ Greffe de CSH

Contrairement à une transplantation d’organe lors d’une greffe de CSH le greffon est immunocompétent, il va donc se produire 2 réactions immunitaires simultanées :

**=> Le GVL « Graft-Versus-Leukemia »**: effet du greffon sur la maladie que l’on essaye de maximiser.

**=> Le GVH « Graft-Versus-Host »**: effet du greffon contre l’Hôte pouvant être mortel, on essaye de le limiter.

1. **Le GVL :**

Risque **réduit** de rechute de Leucémie chez les receveurs de CSH **allogéniques** par rapport :

- aux transplantations syngéniques

- aux HSCT allogéniques T déplétées (greffon de CSH pour lequel on a supprimé les lymphocytes T pour éliminer la réponse contre l’hôte)

Effet GVL est plus important chez les patients atteints de GVH

En cas de rechute suite à une greffe allogénique :

- Effets bénéfiques des DLI (donor lymphocyte infusion) transfusion de lymphocytes du même donneur. On obtient une nouvelle rémission de la maladie

20 à 80% suivant les pathologies.

Cellules immunes en cause :

- LT4, LT8, cellules NK

=> La greffe de CSH allogénique est une véritable immunothérapie anti- myéloproliférative.



1. **Le GVH :**

Il correspond à l’attaque du greffon contre l’hôte principalement due aux LT identifiant les tissus de l’hôte comme étranger.

- Les principales cibles épithéliales des LT sont : la peau, le tube digestif, le foie, les fibroblastes du receveur.

- Les principales cibles hématopoïétiques des LT sont : les PNN, les CPA, cellules leucémiques et LT du receveur.



**La réaction de GVH peut être divisé en 3 phases**:

* **PHASE 1**: se déroule AVANT la greffe et est causée par la chimio/radiothérapie provoquant une irritation de différents tissus (tube digestif, peau…)

Cette irritation induit une réaction inflammatoire et la libération de cytokines pro-inflammatoires.

* **PHASE 2**: se déroule APRES la greffe. Les cytokines libérées pdt la phase 1 vont activer les cellules immunocompétentes du greffon conduisant à une amplification de la réponse immunitaire.
* **PHASE 3**: Migration des cellules immunocompétentes du greffon vers les sites d’inflammation et destruction des tissus.

C/Reconstitution immunitaire post-greffe

A la suite d’une greffe de CSH , l’un des principaux enjeux est la **reconstitution immunitaire** , en effet le greffon va être capable de reconstituer l’intégralité de l’immunité du receveur.

Le principale problème ici elle **le temps** mis par le greffon pour la reconstituer car sans système immunitaire le receveur est exposer aux **infections opportunistes.**

L’immunité se reconstituant la plus rapidement est l’immunité innée:

- Neutrophile , monocyte , NK => environ 2mois

Puis vient les cellules de l’immunité acquise :

- Lymphocyte B , Lymphocyte T CD8 => environ 6 mois

- Lymphocyte T CD4 => plus de 6 mois

DEDICACE !!!!

-Tout d’abord a Émilie, ma louve, pour être toujours là pour moi et pour avoir rendu ma P2 et D1 encore plus folle ! trouchba va <3

A la ROYAL BICHATTE !!!!!!!!

=>Au Fat défi pré WEI 2012-2013 !!

=>Au before mythique chez nico !!

=>Au Ski de fou, avec imposition de string et du vomi de julia sur les pistes !!

=>Au Week-end à Amsterdam , donc je ne me souviens que très peu ….

=>A la main de Rayan et au Feu qui l’a brulé :)

=>Au Gala 2012-2013, son ambiance et sa salle de folie !!

=>Au WEI 2013-2014 et le gang des couronnes !!!

=>Au assos investies par la royale bichatte !

=>Aux soirées chez Perrin, avec son jardin, son ping pong, sa chienne … (ah non pas sa chienne)

=>A toute les soirée que j’ai oublié mais qui avait leurs places dans cette dédicace !!

A mes co-stagiaires, Gautier, Marina , Anne-C , mes externes de folie et à tout ceux que j’ai pu oublié

FICHE : IMMUNOLOGIE DES GREFFES

I/ DEFINITIONS ET RAPPEL :

* **Définition :**

- Greffe : Implantation de tissu sans anastomose vasculaire (moelle osseuse, cornée, peau)

- Transplantation : Prélèvement d’un organe sur un donneur et implantation chez le receveur avec rétablissement de la continuité vasculaire

Il existe différent type de greffe suivant le receveur et le donneur :

-Autogreffe : Donneur et receveur sont le même individu (pas d’incompatibilité HLA, pas de rejet)

- Greffe Syngénique ou Isogreffe : Individus génétiquement identiques (jumeaux monozygotes)

- Allogreffe : Individus génétiquement différents de la même espèce

- Xénogreffe : Individus d’espèces animales différentes.

* **Rappels HLA :**

**HLA de classe 1 :** ubiquitaire, présente peptides de 8-10 aa, reconnu par LT8

**HLA de classe 2 :** exprimé par CPA, présente peptides >13 aa, reconnu par LT4

* **Sélection Thymique**

Dans le thymus permettant la **reconnaissance du soi** conditionnant **l’éducation** des thymocytes à plusieurs niveaux :

-Sélection + : Garde les LT capables de reconnaître CMH du soi.

-Sélection - : Elimine les LT autoréactifs.

-Détermination du phénotype CD4 et CD8

* **Répertoire lymphocytaire et alloréactivité :**

Le système immunitaire reconnaît plus facilement un alloantigène (cellule ayant un HLA diffèrent du donneur) qu’un pathogène exogène.

* **Typage HLA :**

On utilise 2 techniques :

* Sérologie (utilisation Ac Anti HLA1/2 marqué) cible HLA membranaire :

La microlymphocytotoxicité **=> Méthode BR.**

* Biologie moléculaire qui cible l’ADN codant pr le gène de HLA, détermine les différents types et sous-types de HLA exprimés :

PCR/Luminex **=> Méthode HR.**

* **Polymorphisme HLA :**

Les gènes codant pour les HLA sont les plus polymorphes :

HLA de classe 1 sous types **A,B,C**,E,F,G

HLA de classe 2 sous types **DRA**, DRB, DQA1, **DQB1**, DPA1, **DPB1**

**II/TRANSPLANTATION D’ORGANES : Ex du rein**

**Différents types de rejet :**

* **Rejet suraigu** (qq min-heure)

**-** Thrombose et infarctus du transplant, Fixation sur l’endothélium d’Ac préformé chez le receveur, CROSSMATCH

* **Rejet aigu** (à partir de 4 jours)

-Infiltrat cellulaire du greffon : Reconnaissance par LT4 et LT8 du receveur des Ag du donneur + cytokines produites (IFNg, TNFa) + expression des CMH2

- Production d’alloanticorps et lésion tissulaire par activation du complément et ADCC, c est une URGENCE MÉDICALE (immunosuppresseurs)

* **Rejet chronique** (>2-3ans plus tard)

- Néphropathie chronique du néphron,

- Principale cause d’échec (demi-vie du greffon rénal 10 à 11 ans)

**Avant la greffe**

**-** Typage HLA du receveur et inscription a la liste de l’agence de biomédecine.

- **Typage de Basse Résolution ou générique.**

**- Recherche régulière d’Ac anti HLA**

- Sérothèque (constitution d’une banque de sérum du receveur a la recherche d’Ac anti HLA)

**Lors de la greffe :**

**-** On teste la compatibilité du groupe sanguin ABO

- Typage HLA du donneur (Urgence)

- **CROSSMATCH entre sérum du receveur et lymphocyte du donneur**

**=> si positif c est une CONTRE indication a la greffe +++**

A/Recherche et identification d’Ac Anti HLA

1. Bilan pré transplantation :

* Informations cliniques concernant les immunisations anti HLA potentielles **(grossesse, transfusion, première transplantation)**
* Recherche d’Ac anti HLA de classe 1 et 2 :

**- Tous les 3 mois en cas d’ATCD d’immunisation**

**- Par une technique sensible**

**- A J15 et J21 de tout évènement immunisant**

**- Toutes les semaines en cas de désensibilisation**

b. Identification d’Ac anti HLA

* Sérum du patient testé contre un panel d’antigènes HLA
* LCT : Lymphocytotoxicité

- Technique Basse Résolution, simple, peu sensible

- Les LT, qui fixent les Ac, activent le complément et intègrent le colorant, on peut donc les visualiser et les compter.

* 2 Techniques SENSIBLES utilisant des Ag HLA purifiés :

- Techniques de Haute Résolution, Identification d’Ac anti HLA de classe 1 et 2

* **ELISA** : Ag fixés dans des puits sur des plaques
* **LUMINEX**: Ag fixés sur des billes

=> Analyse en cytométrie de flux.

c. Ac anti HLA/ cas particuliers :

**NON RÉPONDEUR :**

**-** Problème de sensibilité de techniques

**HYPERIMMUNISÉ : +**

- Reconnaissance par les Ac anti HLA de plus de 80% des différents types de HLA

- Priorité nationale pour attribution de greffon

- Détermination des Ag « permis » (rentrant dans les 20% de HLA non reconnu par les Ac)

- Protocole de désensibilisation

B/ CROSSMATCH +++

**Vérification ultime AVANT transplantation :**

* Recherche d’absence d’Ac lymphocytotoxique chez le receveur contre les cellules du donneur
* **Test : Lymphocytes du donneur contre Sérum du receveur**
* 2 Techniques :

- Microlymphocytotoxicité/ kappa/ DTT

- Cytofluorométrie de flux

Les lymphocytes du donneur sont mis en présence du sérum du receveur puis ajout de : Ac anti anti HLA (= anti IgG humaine) + Ac anti CD3 (spé des LT) + Ac anti CD19 (spé des LB) => Analyse au cytomètre de flux

C/ Examen HLA en URGENCE

* **Typage générique HLA de classe 1 et 2 (technique BR) sur le sang en environ 3h**
* **Cross match T et B sur ganglion 3h**

**III/ GREFFES DE CSH**

A/ Choix du donneur en greffe de CSH

* Allogreffe du CSH NON APPARENTÉES :

- **Typages alléliques (à 4 chiffres : 4-digits) 10/10 en HLA-A,B,C et DRB1,DQB1**

* Allogreffe du CSH INTRAFAMILIALE :

- Typage de tous les membres de la famille pour reconstituer les haplotypes

- Typages classe 1(A et B) et 2(DRB1 et DQB1)

sérologie ou basse résolution (2-digits)

- Polymorphisme hors HLA éventuels

- 2 Typages du donneur ET receveur impératifs

B/ Greffe de CSH

Contrairement à une transplantation d’organe lors d’une greffe de CSH le greffon est immunocompétent, il va donc se produire 2 réactions immunitaires simultanées :

**=> Le GVL « Graft-Versus-Leukemia »**: effet du greffon sur la maladie que l’on essaye de maximiser.

* Risque **réduit** de rechute de Leucémie chez les receveurs de CSH **allogéniques** par rapport :

- aux transplantations syngéniques

- aux HSCT allogéniques T déplétées (greffon de CSH pour lequel on a supprimé les LT pour éliminer la réponse contre l’hôte)

* Effet GVL est plus important chez les patients atteints de GVH
* En cas de rechute suite à une greffe allogénique :

- Effets bénéfiques des DLI (donor lymphocyte infusion) transfusion de lymphocytes du même donneur. On obtient une nouvelle rémission de la maladie

20 à 80% suivant les pathologies.

* Cellules immunes en cause :

- LT4, LT8, cellules NK

**=> Le GVH « Graft-Versus-Host »**: effet du greffon contre l’Hôte pouvant être mortel, on essaye de le limiter.

* Les principales cibles épithéliales des LT sont : la peau, le tube digestif, le foie, les fibroblastes du receveur.
* Les principales cibles hématopoïétiques des LT sont : les PNN, les CPA, cellules leucémiques et LT du receveur.

**La réaction de GVH peut être divisé en 3 phases**:

* **PHASE 1**: se déroule AVANT la greffe et est causée par la chimio/radiothérapie provoque une irritation de différents tissus (tube digestif, peau…)

Elle induit une réaction inflammatoire et la libération de cytokines pro-inflammatoires.

* **PHASE 2**: se déroule APRES la greffe. Les cytokines libérées pdt la phase 1 vont activer les cellules immunocompétentes du greffon => amplification de la réponse immunitaire.
* **PHASE 3**: Migration des cellules immunocompétentes du greffon vers les sites d’inflammation + destruction des tissus.

C/Reconstitution immunitaire post-greffe

L’immunité se reconstituant la plus rapidement est l’immunité innée:

- Neutrophiles, monocytes, NK => environ 2mois

Puis vient les cellules de l’immunité acquise :

- Lymphocyte B, Lymphocyte T CD8 => environ 6 mois

- Lymphocyte T CD4 => plus de 6 mois