

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2016

THESE 2016 / TOU3 / 2101

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
obtenu après soutenance du

Mémoire du Diplôme d'Etudes Spécialisées de BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement par

LE GARS CARGOU Marine

Née le 14 novembre 1988 à Rennes (35)

**Anticorps anti-HLA de classe I « dénaturé »
et anti-HLA de classe II DQ :
Effets pathogènes en transplantation**

Le 14 novembre 2016 à Bordeaux

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Jean-Luc TAUPIN

JURY

Président : M. NOEL Thierry, Professeur des Universités
1^{er} assesseur : M. TAUPIN Jean-Luc, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
2^{ème} assesseur : M. COUZI Lionel, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
3^{ème} assesseur : M. VISENTIN Jonathan, Maître de Conférences des Universités,
Praticien Hospitalier

REMERCIEMENTS

Au Professeur Thierry Noël, Professeur des Universités à la faculté de Bordeaux et chercheur au Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité UMR-CNRS 5234.

Pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse et pour m'avoir accueillie avec votre sourire et votre bienveillance à Bordeaux en 6^{ème} année de pharmacie. Veuillez trouver ici, l'expression de ma sincère reconnaissance.

Au Professeur Jean-Luc Taupin, Professeur des Universités à la faculté de Paris Descartes, Praticien Hospitalier dans le service d'Immunologie et d'Histocompatibilité du CHU de Saint-Louis (AP-HP), chercheur au Centre Hayem INSERM UMRS 1160.

Je te remercie chaleureusement Jean-Luc de m'avoir donné le goût de l'immunologie et du HLA au cours mon 3^{ème} semestre d'internat puis en m'accompagnant dans mes années de master recherche niveau 1 et 2. Merci pour ces qualités de disponibilité, de patience, de persévérance, de rigueur et de réflexion qui m'ont guidées tout au long de ce travail. Enfin, je te remercie d'avoir accepté de diriger ce mémoire. Je t'exprime toute ma reconnaissance et mon amitié, ce fut un réel plaisir de collaborer avec toi et je suis heureuse que cette collaboration se poursuive par la réalisation de mon 7^{ème} semestre d'internat dans le laboratoire d'histocompatibilité du CHU de Saint-Louis.

Aux membres du jury :

Au Professeur Lionel Couzi, Professeur des Universités à la faculté de Bordeaux et Praticien Hospitalier dans le service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse du CHU de Bordeaux, chercheur au laboratoire ImmunoConcEpT UMR CNRS 5164.

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail. C'est avec grand plaisir que nous pourrions peut être, continuer à nous croiser le mardi matin lors des « staffs HLA ».

Au Docteur Jonathan Visentin, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux et Praticien Hospitalier dans le service d'Immunologie et d'Immunogénétique du CHU de Bordeaux, chercheur au laboratoire ImmunoConcEpT UMR CNRS 5164.

Je te remercie chaleureusement Jonathan d'avoir accepté avec bienveillance de te prononcer sur l'intérêt de ce travail et d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci aussi pour ta bonne humeur au travail, dans le laboratoire de recherche comme au CHU. Merci pour tes précieux conseils et ta disponibilité à toute heure.

A Laurent,

Pour ton soutien infaillible et ta patience à toute épreuve, tu fais mon bonheur chaque jour. Pour ces moments où tu m'as portée tout au long de ces années de pharmacie. Merci pour toutes ces qualités qui me donnent force et courage et qui m'élèvent, toutes celles qui font de toi mon mari. Je suis fière et heureuse de te dédier cette thèse aujourd'hui.

A mes parents,

Pour votre aide et votre soutien inconditionnel dans tous les domaines depuis 28 ans ! Vous vous êtes beaucoup investis et vous avez tout mis à ma disposition pour contribuer à ma réussite académique et personnelle. Pour votre énergie déployée dans ce nouveau projet de vie, quel pari réussi ! Je suis tellement fière de vous. A ma mère : pour m'avoir transmise le goût du soin, des relations humaines qui m'ont conduit à choisir une discipline médicale pour me réaliser, pour les chansons d'Adèle dans la voiture sur la route de retour de Rungis après le passage si difficile du concours de l'internat et pour le vélo, ce moyen de locomotion si cher à mon cœur, écologique, économique et bon pour la santé, me rappelant les douces journées d'été sur l'île de Ré. A mon père : pour m'avoir transmis des valeurs de travail, de courage, de rigueur et d'exigence qui m'ont fortifiées dans mes études.

A mon frère et à ma sœur,

A mon Gwenole, pour ta bonne humeur, tes blagues, ton mode cool et jamais stressé. Tu as su me divertir quand j'en avais besoin. Je n'oublierai jamais que tu te vantes de faire le seul métier du monde où tu peux venir travailler en tongs ! Merci pour la plongée, la pêche à la canne ou en apnée, les dégustations d'ormeaux et de homards avec Laulau. Merci d'avoir choisi une formidable épouse qui agrandit ce cercle d'amour.

A ma p'tite sœur chérie Morgane, pour ton soutien, pour tous les moments de jeux, de sport et de musique. Quelle chance que tu habites maintenant un petit coin de paradis un peu plus au sud, ça change de Brest (Lol !). Attention nous débarquerons bientôt chez toi pour pratiquer les sports nautiques !

Un grand merci à tous les deux pour cette relation si forte que nous vivons pleinement !

A mes grands parents,

A Papi et Mamie pour ces moments magiques en votre compagnie sur l'île de Ré : à vélo, en bateau, en rollers, à la plage, aux fêtes de village Rhétais. A Papi pour ces croisières sur le Maïté où tu nous as fait rêver, pour la sortie dans les Tas de Pois où nous nous sentions si petits en compagnie des grands voiliers de ce monde clôturant ainsi Brest 2004. A Mamie

pour ce goût de la couture, du vélo et de la vigne, tu m'apporte tellement. Quelle énergie vous habite !

A Papou et Mamitou pour tous les moments de bonheur que nous vivons à Plouplou. Le Finistère nord a tellement de charme et l'eau y est parfois plus chaude qu'à Biscarrosse ! Pour votre phrase fétiche qui me fait toujours sourire « Mais Marine, quand est-ce que tu termines ? » et à laquelle je réponds en riant que ça n'est pas encore pour tout de suite : n'oublions pas qu'il me reste encore 1 an d'étude après cette thèse !

A Pascale, Alain, Sébastien et Cyril,

Pour votre accueil chaleureux dans la famille Cargou où je me sens si bien. Toujours disponibles pour se retrouver autour de bons repas familiaux arrosés ! Seb et Cyril, vous m'épatez par votre cursus et je suis très heureuse que vous agrandissiez la famille avec des conjoints parfaits ! A Claire pour ta brillante réussite au concours de l'ENM, pour ta délicieuse cuisine, ton sourire et ton enthousiasme à toute épreuve !

A Céline, Elise, Guigui, Mat', Armand, PJ, Samimy et Gaël,

Que de moments de bonheur ensemble ! Pour le soutien que vous m'avez donné depuis 12 ans. Pour cette équipe MEJ toujours soudée ! Pour les camps ski, la guitare, les randos en France, au Portugal, en Suisse ou à La Réunion, l'Interrail, Taizé, les soirées... Pour cette journée où vous êtes partis à la plage avec ma famille alors que je n'étais pas là ! Merci pour cette amitié si forte qui nous rend inséparables ! Le cercle continue de s'agrandir : Brenno et Karla c'est un plaisir de mettre une pointe de Brésil et un soupçon de Mexique dans notre équipe bien hétéroclite ! Ce n'est pas parce-que vous êtes à Lyon, Strasbourg, Paris, Rennes, Laval et Toulouse et que je perds la carte 12-27 que je ne viendrais pas passer un WE dans vos villes : je viens d'acheter la carte WE !!

A Aline, Dadou, Benji, Cricri, Raphi, Paupau et Lolo,

Pour les rires, les jeux, la guitare, les chansons, les vacances sur l'île de Ré, les parties de pêche, les pique-niques sur la plage et les préparations au mariage ! Vous êtes top !

A tous les amis,

Aux amis Bordelais, à Seb, Fabiche et Barbiche, pour l'accueil d'une Bretonne dans cette belle ville du Sud-Ouest, toujours les premiers à s'amuser, à organiser des soirées et les week-ends. Merci à la piscine des Conviviales et à vous pour votre bonne humeur et le ukulélé ! A Marine et Julien, pour la course dans le jardin avec palmes et la pêche aux

couteaux avec une coquille Saint-Jacques (on ne nous l'avait jamais faite celle-là !). A Flora et Mathieu pour les gaufres uniques et la « cure des œufs » !

Aux amis Rennais, à Marine et Loïc, Myriam et David parce-que vos mariages étaient un prétexte pour se retrouver après tant d'années, merci pour les week-ends et tous les moments à venir et à partager ! A Estelle et James, pour les goûters, nos rires et nos jeux depuis notre tendre enfance, pour le trou dans la haie que nous empruntions pour accéder d'un jardin à l'autre ! A Céline et Mathilde, parce-que Plouplou c'était beaucoup moins drôle sans vous ! A Fred et Sarah pour votre amitié si précieuse depuis la Nouvelle-Zélande ! Pour les délires, les sourires, le cinéma et la coloration de l'anneau dans le Hobbit ! A Cécile et Clara pour les supers moments insouciantes au Lycée et nos retrouvailles à Bordeaux avec Vincent et Dom ! A Cécile nos souvenirs de maternelle, nos courriers d'enfants, nos week-ends à Paris, St Greg ou Paramé, pour tous les nouveaux moments à venir avec Dev à Bordeaux, à Londres ou en Inde !

A Katerina, aux merveilleux moments partagés sur l'île de Ré, merci pour la voile, le hockey sur glace, pour l'émerveillement de la découverte de la République Tchèque après le concours de P1 ! A Yannick et Damien pour le chocolat, le gruyère, la raclette, les bouquetins, le tas de bois et le contact si froid de la neige Suisse au mois d'août après 1 mois passé au Mali, bref quand est-ce qu'on remet ça ?

A mes cointernes,

A Marie, Julie, Alice, Cécile Marina et Mariya, mes super cointernes de 1^{er} semestre, parce-que quand on débarque à l'hosto on est complètement perdu et on se sert les coudes ! Sans oublier Barni et Yohan même si se sont des mecs ! Merci à vous pour les soirées, la course à pied, le super week-end à Sarlat, les commandes de sushi en garde de bactério !

A Nico pour les bons moments au cellulaire avec Jean-François ! A Pierre pour l'opéra aussi avec Jean-François, pour tes cafards et le week-end passé chez nous...sans nous ! Pour tes « coucou » à coups de klaxon en Z4 même à une cycliste casquée qui ne ressemble à rien sur son vélo ! A Célia, pour ton franc parler, ton rire, ta bonne humeur et ton amitié !

A Catherine, Ines, Charlotte et Paô, pour ce merveilleux M2 dans l'aquarium, plein de rires, d'entraide, de vin « My S-O Local Box » et en terrasse. Merci pour la salade Caesar, la tarte chèvre-épinard et les expressions « j'suis au fond du seau^o » !

A Anne-Sophie, pour ces 3 semestres passés ensemble en bactério, immuno et bioch SA. Pour nos retrouvailles à 10 000 km sur une petite île montagneuse que tu as quittée pour Strasbourg !

A Naël, pour ton merveilleux accueil à La Réunion ! Pour ce stage de bactériologie que tu m'avais survendu et qui a été encore plus éblouissant que je n'imaginais ! Merci pour ton hospitalité, pour les dîners sur la varangue en regardant les marguyas, pour les allers retour en Kia Ceed à Saint-Denis pour le DU en écoutant Saez ! Bonne continuation là-bas !

A Muriel, Edona, Aurélia, Mathilde, Laurent, Chloé, Benoît, Alex, Zakasoa, Laura, Kavish, Mathieu, Gildas, Pierre-Elian, Rémi...à tous les internes avec qui j'ai eu plaisir à partager des moments sérieux et moins sérieux !

Aux techniciens,

A la « Dream Team » des techniciens, à Hervé et Nelly pour le salon des vignerons indépendants et les soirées délirantes ! A Charlène parce que l'immuno c'est plus beau avec des plumes et des fonds d'écran « grenouilles » ! A JCC, Kamal et Mimi pour vos chamailleries uniques au cellulaire ! A Gaël parce que grâce à toi je suis fier de faire la pub de mes pneus Schwalbe® avec lesquels je ne crève plus même en roulant sur le verre devant les Quinconces les lendemains de fêtes ! A Olivier et Thibault pour votre bonne humeur lors de ma reprise de garde après 1 an et demi sans en faire ! A Marylise pour ce beau coussin brodé fabriqué pour nos alliances !

A l'équipe Réunionnaise : Florelle, Magalie, Florence, Laura, Philippe*2 et Fred, pour votre bonne humeur, vos sourires, pour les soirées, les plats créoles, les randos et la course à pied, vous m'avez gâtée ! Parce-que l'effet Péi nous gagne et que nous reviendrons !

A tous les techniciens de qualité que j'ai pu croiser durant mon internat dans les différents laboratoires où je suis passée et qui ont fait de mes stages et de mes gardes, des moments agréables.

Aux biologistes,

A Jean-Luc, Jean-François et Jonathan (quelle chance 2^{ème} fois !), Gwendaline, Anne, Cécile, Patrick, Mamy et Delphine pour la transmission de votre passion, pour votre bonne humeur, votre patience et votre bienveillance.

A Sandrine et Julien, un grand merci pour la confiance que vous m'avez accordée, la patience dans la formation, pour votre accueil si chaleureux par 38°C !

A Gautier parce que la galette-saucisse est toujours meilleure à Rennes et sans champignons !

A Sandrine, merci pour mon initiation à la qualité en Biochimie SA, pour le logiciel Accreditoool® envoyé en Océan Indien !

Un grand merci à tous les biologistes qui m'ont transmis leur savoir durant mon internat et permis d'apprécier mon futur métier.

Remerciements spéciaux :

Au laboratoire ImmunoConcEpT (ex-CIRID) CNRS UMR 5164, à Bordeaux dans lequel tout a été mis à ma disposition pour réaliser mes stages de master recherche niveau 1 et 2. Je remercie sincèrement toute l'équipe pour ces bons moments passés ensemble. J'adresse plus particulièrement mes remerciements à Julie Déchanet-Merville, Vincent Pitard et à Sophie Daburon, de m'avoir encadrée, soutenue, transmis leur savoir et leurs compétences au cours de ces nombreux mois et à Layal pour les conseils et les données.

Un grand merci au Centre de biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, à Orléans, et plus particulièrement à Mme Kieda et Mme Fasani qui nous ont fourni les lignées de cellules endothéliales et les protocoles de culture nécessaire à notre étude.

Au laboratoire de Biogénèse Membranaire UMR CNRS 5200, à Villenave d'Ornon, et plus particulièrement à Mr Moreau qui nous a donné de son temps et de ses compétences pour nous accompagner et nous guider dans l'isolement des radeaux lipidiques de la membrane plasmique des cellules d'intérêt. Je vous remercie très sincèrement.

Un grand merci au Dr. Nuala Mooney chef d'équipe du laboratoire Hématologie, Immunologie Cibles Thérapeutiques UMR INSERM 1160, Paris Diderot qui nous a généreusement fourni en anticorps anti-DR et anti-DQ.

A Mme Larat mon professeur de physique-chimie au lycée qui a cru en moi, merci pour ce TP de fabrication de l'aspirine qui m'a donné l'effervescence des études pharmaceutiques !

A tous mes professeurs de collège, de lycée et de faculté qui m'ont donné le goût de l'apprentissage, de la découverte et du dépassement de soi.

A Colette pour tes poèmes et la chance que tu m'as donné de m'avoir fait rencontrer tes petits-fils : les triplés !

A tous ceux que je n'ai pas cités et qui sont présents aujourd'hui, physiquement et par la pensée, et qui comptent tout autant.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	8
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
1. LISTE DES TABLEAUX	11
2. LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	14
1. LA TRANSPLANTATION D'ORGANES ET LE REJET	14
2. LE SYSTEME HLA	15
2.1 <i>Généralités</i>	15
2.2 <i>Les molécules de classe I « dénaturées » ou « Free HLA Heavy Chain » (FHC)</i>	18
2.3 <i>Expression du HLA de classe II</i>	20
3. LES DSA : ACTIONS ET DETECTION	22
3.1 <i>Focus sur l'activation du complément</i>	22
3.2 <i>Effets pathogènes des DSA</i>	24
3.3 <i>Techniques de détection des DSA</i>	25
3.4 <i>Le crossmatch</i>	28
4. LE ROLE DES LIPIDES MEMBRANAIRES	30
4.1 <i>Preuves de l'existence de microdomaines</i>	30
4.2 <i>Etude des microdomaines</i>	31
5. LES OBJECTIFS.....	34
MATERIELS ET METHODES	36
1. LES REACTIFS	36
2. CELLULES ET CULTURE CELLULAIRE.....	42

2.1	<i>Echantillons sanguins</i>	42
2.2	<i>Lignées de cellules endothéliales</i>	43
2.3	<i>Lignées de cellules en suspension</i>	45
2.4	<i>Congélations cellulaires</i>	45
3.	MARQUAGES CELLULAIRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX	45
3.1	<i>Principe</i>	45
3.2	<i>Mode opératoire du marquage cellulaire</i>	46
3.3	<i>Traitement et analyse des données</i>	47
4.	TRAITEMENTS PAR MBCyD, GM1 ET PIPLC	47
5.	ISOLEMENT DES MICRODOMAINES	48
5.1	<i>Principe</i>	48
5.2	<i>Mode opératoire</i>	49
6.	IMMUNOBLOT	51
6.1	<i>Principe</i>	51
6.2	<i>Mode opératoire</i>	53
	RESULTATS	55
1.	EXPRESSION RELATIVE DES MOLECULES HLA-I ET HLA-II	55
1.1	<i>Les lymphocytes B</i>	55
1.2	<i>Les CE</i>	58
2.	ACTIVATION DU COMPLEMENT PAR UN ANTICORPS ANTI-HLA	60
2.1	<i>Effets sur les LB</i>	60
2.2	<i>Effets sur les CE</i>	61
3.	EFFETS DES REGULATEURS MEMBRANAIRES SUR L'ACTIVATION DU COMPLEMENT PAR LES ANTICORPS ANTI-HLA	63
3.1	<i>Action de la PIPLC et de la MBCyD</i>	63
3.2	<i>Action du GM1</i>	70
4.	ASSOCIATION DES MOLECULES HLA AUX MICRODOMAINES	72

4.1	<i>Mise au point</i>	72
4.2	<i>Etude des HSkMEC</i>	77
4.3	<i>Etude des HUVEC</i>	77
DISCUSSION		82
BIBLIOGRAPHIE		90
SERMENT DE GALIEN		99

Table des illustrations

1. Liste des tableaux

Tableau 1 : Anticorps.....	36
Tableau 2 : Agents chimiques et milieux de culture.....	38

2. Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des molécules HLA.....	17
Figure 2 : Activation de la voie classique du complément..	23
Figure 3 : Mécanismes des effets pathogènes des DSA [10].	25
Figure 4 : Résumé des objectifs..	35
Figure 5 : Schéma des différentes fractions du lysat cellulaire, isolées par ultracentrifugation en gradient de sucrose..	51
Figure 6 : Analyse en CMF des lymphocytes avec l'exemple des filtres déleucocytants.	55
Figure 7 : Expression relative des molécules HLA-I et II et des molécules régulatrices du complément sur les LB en CMF.	56
Figure 8 : Expression relative de DR et DQ sur les LB du sang total en CMF.....	57
Figure 9 : Expression relative des molécules HLA et des molécules régulatrices du complément, sur les CE activées ou non de différentes origines (HUVEC, HLuMEC, HKdMEC, HSkMEC) en CMF.	59
Figure 10 : Marquage C1q sur des LB en CMF.....	60
Figure 11 : Activation du complément par les anticorps anti-HLA sur les LB en CMF..	61
Figure 12 : Activation du complément sur des lignées de CE activées ou non.....	62
Figure 13 : Action de la PIPLC sur l'expression relative des molécules HLA et des molécules régulatrices du complément des LB en CMF.	63
Figure 14 : Expression en CMF des molécules HLA et des molécules régulatrices du complément après incubation des LB issus d'un filtre déleucocytant avec ou sans la PIPLC puis avec ou sans 2 mM de MBCyD 30 minutes à 37°C.....	64

Figure 15 : Expression en CMF des molécules régulatrices du complément après incubation des HUVEC et des HSkMEC avec ou sans la PIPLC.....	65
Figure 16 : Capacité d'activation du complément, en CMF, des molécules HLA après incubation des LB issus d'un filtre déleucocytant avec ou sans la PIPLC puis avec ou sans 2 mM de MBCyD 30 minutes à 37°C..	66
Figure 17 : Activation du complément, en CMF, médiée par des anticorps anti-HLA sur des HUVEC au repos et activées.....	67
Figure 18 : Effet de la PIPLC sur l'activation du complément par les HUVEC et HSkMEC révélé par le marquage C1q en CMF.	68
Figure 19 : Effets de la PIPLC sur l'activation du complément sur les HUVEC et HSkMEC révélé par le marquage C3d.	69
Figure 20 : Expression en CMF des molécules HLA et régulatrices du complément après incubation de CE au repos ou activées avec ou sans GM1.	70
Figure 21 : Effet du GM1 sur l'activation du complément sur les HUVEC révélé par des marquages C1q et C3d.	71
Figure 22 : Effet du GM1 sur l'activation du complément sur les HSkMEC, révélé par un marquage C1q.	72
Figure 23 : Expression de FHC et DR sur des lysats de lignées cellulaires en immunoblot.....	75
Figure 24 : Expression FHC et DR sur les fractions membranaires isolées à partir de l'ultracentrifugation en gradient de sucrose de lysat de Jurkat au repos.....	76
Figure 25 : Présence de FHC dans les lysats de HSkMEC activées ou non.....	78
Figure 26 : Présence de DR dans les lysats de HSkMEC activées ou non.	79
Figure 27 : Présence de FHC dans les lysats de HUVEC activées ou non.	80
Figure 28 : Présence de DR dans les lysats de HUVEC activées ou non.	81

Liste des abréviations

ADCC :	Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity
APC :	AlloPhycoCyanin
CM :	Crossmatch
CMF :	CytoMétrie en Flux
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DAPI :	4,6 Diamidino-2-phénylindole, dihydrochloride
DRM:	Detergent Resistant Membrane
DSA :	Donor Specific Antibodies
FHC :	Free HLA Heavy Chains
FITC :	Fluorescein IsoThioCyanate
FSC :	Forward SCattered light
GAMPE :	Goat F(ab) ₂ fragment Anti-Mouse IgG (H+L) PhycoErythrine
GM1 :	Ganglioside Monosialilé 1 ou monosialotetrahexosylganglioside
GPI :	GlycosylPhosphatidyInositol
IFN γ :	InterFéroN gamma
HKdMEC :	Human Kidney Microvascular Endothelial Cell
HLuMEC :	Human Lung Microvascular Endothelial Cell
HLA :	Human Leucocyte Antigen
HMEC-1 :	Human Microvascular Endothelial Cell
HSkMEC :	Human Skin Microvascular Endothelial Cell
HUVEC :	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
KIR :	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
LB :	Lymphocyte B
LT :	Lymphocyte T
MBCyD :	Méthyl- β -CycloDextrine
NK :	Natural Killer
PE:	PhycoErythrine
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cells
SAFB :	Single Antigen Flow Beads Assay®
SAPF :	Streptavidine-PhycoErythrine
SSC :	Side Scattered light
TNF α :	Tumor Necrosis Factor alpha

Introduction

1. La transplantation d'organes et le rejet

La transplantation d'organes est un atout thérapeutique majeur, elle demeure l'alternative la plus efficace pour remplacer la fonction d'un organe défectueux. Elle offre une « seconde vie » aux patients.

Tout d'abord, une notion importante distingue la greffe de la transplantation. Le terme greffe est employé pour définir une implantation de tissu sans anastomose vasculaire comme la moelle osseuse, la cornée ou la peau. La transplantation nécessite le rétablissement d'une continuité vasculaire, elle concerne donc tous les organes (les reins, les poumons, le foie et le cœur). Dans notre propos nous évoquerons uniquement la transplantation d'organes mais nous ne distinguerons pas les deux termes. Nous utiliserons le terme greffe comme le terme transplantation.

L'activité de greffe à l'échelle nationale peut être résumée en quelques chiffres. Quatorze mille cinq cents patients étaient inscrits sur la liste nationale d'attente d'une greffe d'organe au 1^{er} janvier 2016 (source : Agence de la biomédecine, Rapport annuel 2015). Le plan greffe 2012-2016 fixant l'objectif de 5 700 greffes d'organes a été atteint et dépassé avec un an d'avance. Au cours de l'année 2015, 5 746 transplantations d'organes ont été effectuées. Plus précisément, 3 486 reins ont été transplantés, dont 547 à partir de donneurs vivants soit 10,7% des transplantations rénales. De même, 824 transplantations thoraciques (cœur, cœur-poumons, poumons) et 1 355 transplantations hépatiques dont 15 à partir de donneurs vivants ont été réalisées. De plus, la durée et la qualité de vie des greffés est en nette progression. Près de 2/3 des greffons rénaux, transplantés entre 1993 et 2005, sont toujours fonctionnels après 10 ans. La qualité de vie des patients greffés approche celle de la population générale, notamment celle des greffés rénaux par rapport à celle des patients dialysés.

L'amélioration constante de la prise en charge des patients greffés par des thérapeutiques immunosuppressives a considérablement diminué le nombre de rejets de greffes. Malgré ces avancées, les échecs en transplantation sont encore trop nombreux. De plus, ils sont associés à une morbi-mortalité et des coûts élevés. Des études ont démontré que 60% des rejets d'organes sont de causes immunologiques. Ils mettent principalement en

jeu le système HLA (Human Leukocyte Antigen) car il est, le plus souvent, au moins partiellement différent entre donneur et receveur [1]. En effet, c'est le polymorphisme génétique existant entre le donneur et le receveur qui est responsable des conflits immunitaires après transplantation allogénique. L'alloréactivité se définit quand le donneur et le receveur appartiennent à la même espèce. Lors d'une transplantation syngénique, c'est-à-dire entre des jumeaux monozygotes, aucune réaction immunitaire n'apparaît.

Trois types de rejets sont actuellement décrits : le rejet hyperaigu, aigu et chronique. Le rejet hyperaigu est immédiat. L'élément déclencheur est la présence d'anticorps spécifiques du donneur, les DSA pour *Donor Specific Antibodies*, préexistants avant la transplantation, à taux élevés dans le sérum du receveur. Ces anticorps, fixés sur les cellules endothéliales du donneur, sont responsables de la perte du greffon. Ils activent notamment la cascade du complément et celle de la coagulation au niveau de l'endothélium du greffon entraînant alors une ischémie du greffon responsable de la nécrose tissulaire. Ces mécanismes sont expliqués par le contact direct entre la cellule endothéliale du greffon avec le sang du receveur, et donc avec les anticorps circulants, dès le moment où la continuité vasculaire est rétablie. Compte-tenu des avancées scientifiques et de la compréhension des mécanismes de rejet, le rejet hyperaigu est aujourd'hui exceptionnel. Actuellement, c'est le rejet aigu qui est la principale forme d'échec en transplantation. Il est précoce ou décalé, d'évolution rapide, de mécanisme cellulaire, humoral ou mixte. Enfin, le rejet chronique est d'apparition tardive, de mécanisme humoral, cellulaire ou mixte et conduit à une dégradation lente et progressive de la fonction du greffon.

2. Le système HLA

2.1 Généralités

Décrit pour la première fois en 1958 par l'hématologue Jean Dausset, le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) appelé système HLA chez l'Homme, présente un rôle clé en transplantation [2]. Ce système est principalement responsable de l'immunité cellulaire et humorale se développant après transplantation et conduisant au rejet du greffon [3].

Le système HLA est un ensemble de gènes situés sur le bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3). Cette région HLA s'étend sur une distance d'environ 4 000 kilo-bases soit

1/1 000 du génome humain. Elle comporte plus de 220 gènes possédant diverses fonctions. Par ailleurs, ces gènes ont la particularité d'être extrêmement polymorphiques. Ce polymorphisme très important du système HLA s'explique d'une part par la présence de nombreux gènes multialléliques. La généralisation de l'emploi de la biologie moléculaire permet actuellement de décrire et de dénombrer ces variations géniques. En septembre 2016 plus de 13 000 allèles HLA sont décrits. Ils codent pour plus de 5 000 protéines différentes (d'après la source <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html> le 28 septembre 2016). Le polymorphisme s'explique d'autre part, par l'expression co-dominante des molécules HLA car les allèles hérités des deux parents s'expriment. De plus, ces gènes sont transmis en « bloc » sous forme d'haplotypes. Chaque individu hérite d'un haplotype (A, B, C, DR, DQ, DP) de son père et d'un haplotype de sa mère. Enfin, il existe des déséquilibres de liaison entre certains loci. Cela signifie que la fréquence observée de l'association des loci est supérieure à celle attendue (celle correspondant au produit des fréquences de chaque gène).

Les molécules HLA, ou antigènes HLA, sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques appartenant à deux classes (Fig. 1). D'une part, le HLA de classe I (HLA-I) est représenté par trois gènes principaux. Ils codent pour les molécules A, B et C présentes à la surface des cellules nucléées de l'organisme. Ces molécules sont composées de l'association non covalente d'une chaîne lourde α (~45 KDa), constituée d'une région extramembranaire ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), d'une région transmembranaire et d'une région intracytoplasmique (très courte), avec la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) (12 KDa). La $\beta 2m$ est codée par un gène porté par le chromosome 15 et n'est constituée que d'un seul domaine extramembranaire invariant. D'autre part, le HLA de classe II (HLA-II) comprend entre autres plusieurs paires de gènes principaux. Ils codent pour les molécules DR, DQ et DP. Ces molécules sont constituées de l'association non covalente d'une chaîne α codée par les gènes DRA1, DQA1 et DPA1 avec une chaîne β codée par les gènes DRB1, DQB1, DPB1. Chacune des chaînes α et β sont elles-mêmes constituées de 3 régions (extramembranaire, intramembranaire et intracytoplasmique). La région extramembranaire est elle-même constituée des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ pour la chaîne α et des domaines $\beta 1$ et $\beta 2$ pour la chaîne β (Fig. 1). Les gènes A1 et B1 sont polymorphiques à l'exception de DR pour lequel le gène DRA1 est monomorphe. Ce polymorphisme génétique induit un polymorphisme protéique. Pourtant il existe des homologies de séquences nucléotidiques très nombreuses partagées par les allèles. Elles se traduisent par des séquences d'acides aminés communes à plusieurs produits d'allèles, encore nommés épitopes publics. Les épitopes privés, quant à eux, sont spécifiques d'une molécule HLA. Par ailleurs, le polymorphisme de DR est

particulier puisqu'en plus du gène DRB1, un gène surnuméraire peut exister selon les haplotypes. Il s'agit des gènes B3, B4 ou B5 codant pour les molécules surnuméraires DR52, DR53 et DR51 respectivement. Enfin, les molécules HLA-II sont essentiellement localisées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles telles que les lymphocytes B (LB) ou les cellules dendritiques (DC). Cependant, elles peuvent être exprimées par d'autres types cellulaires dans certaines conditions et notamment après « activation » comme les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et par une proportion variable de lymphocytes T (LT).

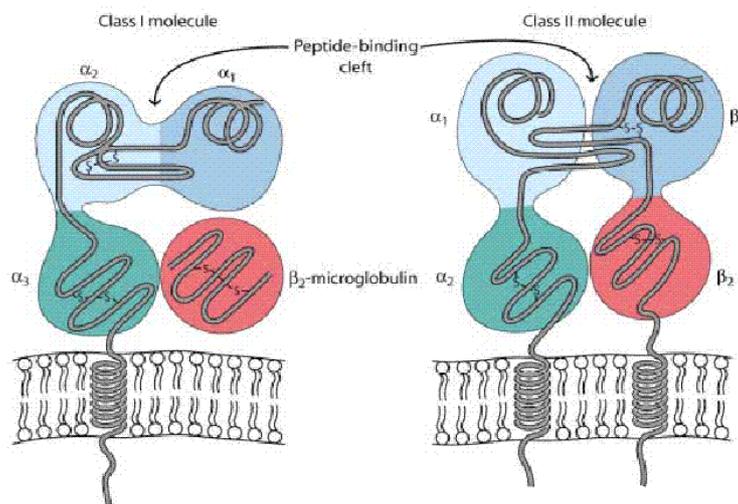


Figure 1 : Représentation schématique des molécules HLA. Les molécules de classe I (à gauche) et II (à droite), tirée du livre « Immunologie, Le cours de Janis Kuby avec questions de révision », 6ème édition, 2008.

Les molécules HLA possèdent 4 fonctions principales : la présentation d'antigènes peptidiques aux LT, l'activation des LT, l'engagement des KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor) et le choix du partenaire sexuel. Le rôle essentiel est celui de la présentation d'antigènes peptidiques aux LT. Ces peptides sont fixés de façon non covalente dans un sillon d'ancrage formé par les domaines α_1 et α_2 des molécules HLA-I et par les domaines α_1 et β_1 des molécules HLA-II (Fig. 1). Cette fonction de présentation permet la reconnaissance du « Soi » et du « non-Soi » immunologique. Plus précisément, dans ce but, les molécules HLA-I présentent des peptides dérivés de protéines intracellulaires, issues du « Soi » ou produites par un agent pathogène intracellulaire tel qu'un virus, aux LT-CD8 et les molécules HLA-II présentent des peptides dérivés de protéines extracellulaires, capturées par la cellule, aux LT-CD4.

L'alloimmunisation HLA correspond à la production d'anticorps dirigés contre les molécules HLA n'appartenant pas au « Soi ». Elle s'opère dans 3 situations particulières : la grossesse, la transfusion sanguine ou de culots plaquettaires et la transplantation d'organe. La présence d'un antigène HLA étranger active de façon T-dépendante les clones de LB spécifiques de cet antigène. Les LB internalisent et dégradent la protéine HLA en peptides et en présentent certains via les molécules HLA-II aux LT-CD4. Il s'agit de la présentation indirecte. Dans un premier temps, les LB prolifèrent et se différencient en LB mémoires et en plasmocytes à courte durée de vie producteurs d'IgM de faible affinité. Dans un deuxième temps, la coopération entre les LB et les LT-CD4 entraîne la prolifération, la différenciation et la maturation des LB dans le centre germinatif, en LB mémoires et en plasmocytes producteurs d'anticorps anti-HLA d'isotype IgG de haute affinité [4].

2.2 Les molécules de classe I « dénaturées » ou « Free HLA Heavy Chain » (FHC)

Récemment, il a été mis en évidence que des anticorps qui ne sont pas dirigés contre la molécule HLA de classe I « normale » (celle dont la conformation spatiale est capable d'assurer la fonction de présentation du peptide au LT) sont aussi détectés par les tests *in vitro* de détection des anticorps anti-HLA. Ils sont à la fois présents dans le sérum d'individus sans antécédent d'événement allogénique (transplantation, grossesse, transfusion) [5] mais aussi chez les patients immunisés HLA.

Les cibles de ces anticorps sont des antigènes HLA dits « dénaturés » ou FHC. Le terme « dénaturé » est employé pour illustrer l'altération conformationnelle de ces antigènes HLA. Ce changement majeur de conformation est probablement expliqué par le processus de purification de l'antigène à partir de la cellule productrice et/ou des conditions de fixation aux billes de ces tests. En utilisant des billes recouvertes d'antigènes HLA non traitées et traitées à l'acide, on peut identifier par déduction les anticorps anti-HLA « natifs », capables de reconnaître la molécule HLA sur la bille non traitée seulement ; et « dénaturés », capables de reconnaître la molécule HLA aussi sur la bille traitée. C'est la perte du peptide et/ou de la $\beta 2m$ qui est (sont) responsable(s) des changements majeurs de conformation de la molécule HLA-I. En effet, la perte du peptide s'accompagne le plus souvent de la dissociation de la $\beta 2m$ et conduit à l'ouverture des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la chaîne lourde HLA, de manière réversible ou irréversible. Cette altération de la conformation protéique entraîne la perte de la fonction de présentation antigénique par ces molécules HLA [6], la

perte d'épitopes conformationnels spécifiques d'allèles ou de groupes d'allèles et démasque des épitopes polymorphiques susceptibles d'être reconnus par des anticorps.

Les fonctions et l'expression cellulaire de ces molécules « dénaturées » sont encore peu connues. Il existe physiologiquement, un niveau d'expression basal de ces molécules à la surface cellulaire. Leur expression est augmentée en présence d'un stimulus inflammatoire. Ces molécules FHC correspondraient à des antigènes de stress cellulaire ou de danger (e.g. HLA-B27) [7], [8]. En effet, elles stimulent une réponse immunitaire indépendante du LT classique (à TCR $\alpha\beta$) via les Lymphocytes *Natural Killer* (NK) [7]–[9] et les récepteurs de la famille NKR ou via les LT à TCR $\gamma\delta$ lesquels fonctionnent indépendamment du CMH pour la reconnaissance de l'antigène (R. Marlin et J. Déchanet-Merville, travaux non publiés du laboratoire).

Des réactions croisées entre les molécules HLA et des antigènes de l'environnement seraient responsables de la production de ces anticorps anti-HLA « dénaturés », au cours des immunisations que développe l'individu durant sa vie. Ces anticorps sont fréquents. Ils reconnaissent un ou plusieurs antigènes HLA différents mais ne sont pas autoréactifs. Ils peuvent être présents en aussi grande quantité dans le sérum humain que les anticorps anti-HLA allogéniques. Une étude récente a montré que 50% de patients naïfs (dépourvus d'antécédent d'événement immunisant) et inscrits sur la liste d'attente de greffon rénal étaient porteurs d'anticorps anti-HLA et parmi eux 39% possédaient des anti-FHC [10]. Il existe ainsi, une forte prévalence de ces anti-FHC et ils couvrent un large éventail d'allèles/antigènes [10].

Il est très important de noter d'une part que ces anticorps anti-FHC ne sont pas détectés dans un test de crossmatch en cytométrie en flux (voir paragraphe 3.4), signifiant qu'ils sont incapables d'interagir avec le HLA cellulaire [10]. Ils ne semblent donc pas délétères en situation de transplantation [11]. Une étude récente a montré notamment que les patients en attente de greffe rénale possédant des anticorps anti-FHC préformés dans leurs sérums ne développaient pas de rejet aigu humoral à un an et la survie des greffons à 5 ans était de 100% [12]. Contrairement au cas précédent, les patients porteurs de DSA anti-HLA-I natifs développaient pour 24% d'entre eux un rejet aigu humoral à un an et la survie des greffons à 5 ans n'était que de 76% [12]; mais la littérature est très pauvre sur ce sujet. Si tel est bien le cas, les antigènes contre lesquels ils sont dirigés ne devraient pas être interdits à la greffe. Or, plus le nombre d'antigènes interdits est élevé et moins le patient aura de donneurs compatibles et plus il sera difficilement transplantable. Cette situation

défavorable prolonge la durée d'attente et donc la période de dialyse du patient quand il s'agit de la greffe rénale, avec les risques non négligeables attenants à la dialyse sur la survie des patients.

Cette immunisation « parasite » est difficile à distinguer de l'immunisation allogénique HLA réelle. Dans les sérums des patients, un mélange complexe d'anticorps anti-HLA natif et anti-FHC reconnaissant les mêmes allèles peuvent être détectés [13]. Leur distinction n'est pas réalisée en routine compte-tenu du surcoût induit. De plus, le traitement en milieu acide des billes altère la totalité des antigènes HLA qui y sont fixés. A ce jour, rien ne prouve que la (les) forme(s) générée(s) par le traitement à l'acide soit(ent) identique(s) à la (aux) forme(s) existant naturellement. Cette immunisation complique donc l'accès à la greffe des patients par une surestimation du nombre d'antigènes HLA à interdire.

Enfin, il existerait des antigènes HLA-II « dénaturés », très peu connus et non considérés dans nos travaux, mais suspectés sur la base d'immunisations anti-HLA-II en l'absence d'événements immunisants. Ils ne peuvent pas être étudiés de la même façon que les FHC, compte-tenu des différences de composition et de structure des antigènes HLA-II [14].

2.3 Expression du HLA de classe II

Les antigènes HLA-II sont présents naturellement sur les LB et les DC mais aussi sur d'autres types cellulaires après « activation ». Cette « activation » se définit principalement par l'action d'un stimulus inflammatoire, via l'Interféron-gamma (IFN γ) et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α). C'est le cas pour les cellules endothéliales de rein humain [15], ainsi que pour les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) et pour les HMGEC (Human Microvascular Glomerular Endothelial Cell).

DR est sélectivement et constitutivement présent *in vivo* sur les cellules endothéliales microvasculaires rénales. Son rôle potentiel serait de favoriser la tolérance du greffon via l'anergie des LT-CD4 résultant de l'absence de molécules de co-stimulation du LT sur les cellules rénales [16]. Ainsi, les cellules endothéliales possèdent des fonctions effectrices constitutives ou inductibles. Ces fonctions jouent un rôle central dans le rejet de greffe dirigé contre les antigènes HLA ou non HLA ou spécifiques d'organes.

Des activateurs cellulaires comme l'IFN γ et le TNF α , présents dans le sang du receveur augmentent l'expression des antigènes HLA-I et II sur les cellules endothéliales.

Ces cellules deviennent alors la cible d'anticorps ou d'effecteurs cellulaires cytotoxiques conduisant à la destruction du greffon [17]. LB et CE constituent les modèles d'étude *in vitro* de la situation de la greffe allogénique. D'une part les LB sont utilisés pour la réalisation du test de compatibilité pré-greffe ultime entre donneur et receveur : le crossmatch (voir paragraphe 3.4). D'autre part, les CE, originaires du greffon constituent la clé de voute de la réponse immunitaire dirigée contre le donneur. Ces cellules sont en contact permanent avec le sang circulant du receveur et donc avec ses potentiels DSA et les cellules immunitaires. La réponse inflammatoire du rejet et le stress de l'ischémie pré-greffe peuvent être expliqués par des mécanismes mis en jeu entre les cellules endothéliales et le système immunitaire du receveur.

Dans la littérature, l'étude de l'expression du HLA-II est évaluée par celle de DR dans la très grande majorité des cas. L'explication principale est celle de l'importance de la densité membranaire de DR par rapport à celle du DQ. DR est donc très facilement détectable sur les surfaces cellulaires. Néanmoins, des études récentes montrent que DQ est la molécule HLA la plus fréquemment mise en cause dans la production de DSA *de novo*, et donc dans le rejet médié par les anticorps. Parmi les DSA *de novo* anti-HLA-II, 70% à 90% sont des anti-DQ selon les études [18]–[25]. Ils sont très souvent les premiers à apparaître au cours d'une allo-immunisation [18], [21], [24], [26]. De plus, ils sont fortement associés à une perte du greffon puisqu'ils sont présents dans 50% à 66% des patients même si les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore connus [21]–[23], [25] et ce quelque soit l'organe transplanté [27]–[29]. Par ailleurs, le polymorphisme de DRB1 est plus important que celui de DQB1 (2 135 allèles versus 940 allèles, le 28 septembre 2016 d'après la source <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>) mais celui de DRA1 est nettement inférieur à celui de DQA1 (7 allèles versus 73 allèles). L'hétérodimère DQ, assemblé en cis et en trans, offre alors jusqu'à 4 molécules différentes à la surface de la cellule, quand la combinaison est productive, à l'échelle interindividuelle. Malgré tout, selon l'algorithme prédictif « HLA Matchmaker », le nombre d'épitopes DR, c'est-à-dire le nombre de variation de séquence d'acides aminés susceptibles de conduire à une réponse immunitaire, est similaire à celui de DQ [30], [31]. Par ailleurs, il existe d'importantes variations du niveau d'expression des molécules DQ en fonction des allèles. Le promoteur du gène DQB1 possède 10 régions polymorphiques contre 4 pour celui de DRB1 [32]. Ainsi, DQ a été assimilé à DR, sans considérer qu'ils puissent avoir des comportements et des propriétés différents. Pour DP, les données disponibles sont encore plus rares.

Au cours de travaux réalisés au laboratoire en 2013 et 2014, une étudiante en master 2 (L. Massara) a comparé l'expression, la régulation et la capacité à activer le complément des molécules DR, DQ et DP exprimées sur des cellules endothéliales activées, les HUVEC. Elle a montré que DR possède une expression membranaire 10 fois supérieure à celle de DQ ou de DP. En étudiant les éluats de biopsie de greffons pulmonaires de patients en cours de rejet, elle a aussi retrouvé des DSA anti-DQ du donneur au sein du greffon, confirmant sur cet organe les résultats d'une étude publiée peu de temps avant par le laboratoire sur une cohorte de greffés rénaux [33]. Tout porte donc à croire que les molécules DQ peuvent être la cible de mécanismes pathogènes en transplantation.

3. Les DSA : actions et détection

3.1 Focus sur l'activation du complément

Les anticorps dirigés contre les antigènes HLA exprimés par le donneur, les DSA, diminuent la survie du greffon en mettant en jeu plusieurs mécanismes, notamment en activant la voie classique du complément.

Le complément est un système de défense de l'organisme appartenant à l'immunité innée. Il élimine les agents infectieux, épure les complexes immuns et module la réponse immune. Il représente l'interface entre l'immunité acquise et l'immunité innée de l'organisme. Il est composé de 3 voies : classique, alterne et des lectines. La voie classique est activée par des anticorps, elle est donc un marqueur de réponse allogénique médiée par les anticorps. Elle démarre par la liaison du facteur C1 (complexe des protéines C1q, C1r et C1s) au fragment Fc des IgG et des IgM. Deux facteurs, C4 puis C3, ont la propriété de fournir des fragments d'activation (C4b et C3b) capables de liaison covalente avec la cible et à demi-vie longue après clivage en C4d et C3d (Fig. 3).

Les conséquences de l'activation de cette cascade de protéases sont multiples. Des pores membranaires se forment, lysant les cellules du greffon, des anaphylatoxines (C5a et C3a) sont libérées et conduisent au recrutement des cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles, monocytes, lymphocytes T, B, NK). Les dépôts de C3b et C4b engendrés sur des surfaces acceptrices (e.g. membranes cellulaires) favorisent l'opsonisation des composants sur lesquels ils sont fixés en recrutant les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles. La résultante de cette cascade est l'activation des CE et des

plaquettes responsable du recrutement de LT-CD4 et de la formation de thrombi. Ainsi, un dépôt de C4d, lorsqu'il est détecté dans les capillaires sanguins des biopsies de tissus greffés, est un marqueur diagnostique d'une réaction humorale dirigée contre le donneur [34].

Dans nos expériences nous étudierons la capacité des anticorps anti-HLA à promouvoir une réponse humorale par la détection de la fixation du C1q. En effet, 60% des DSA préformés fixent le C1q et sont responsables d'une diminution de la survie de greffon à court terme [3], [31]. Cependant, une étude récente affirme l'effet pathogène à long terme des DSA ne fixant pas le C1q [35]. Les anticorps anti-HLA fixant le C1q n'enclenchent pas forcément la cascade d'activation du complément et ne vont pas toujours au stade de la constitution de la C3 convertase formée des fragments C4bC2a pour la voie classique. C'est pourquoi, nous étudierons aussi la capacité des anticorps anti-HLA à fixer le C3d. Le C3d est un produit de dégradation du C3b, fixé de façon covalente et stable sur des surfaces acceptrices telles que les membranes cellulaires. Sa demie-vie longue permet une détection plus aisée. Il est démontré que les anticorps anti-HLA fixant le C3d sont responsables d'un risque de perte du greffon supérieur à ceux fixant le C1q [36].

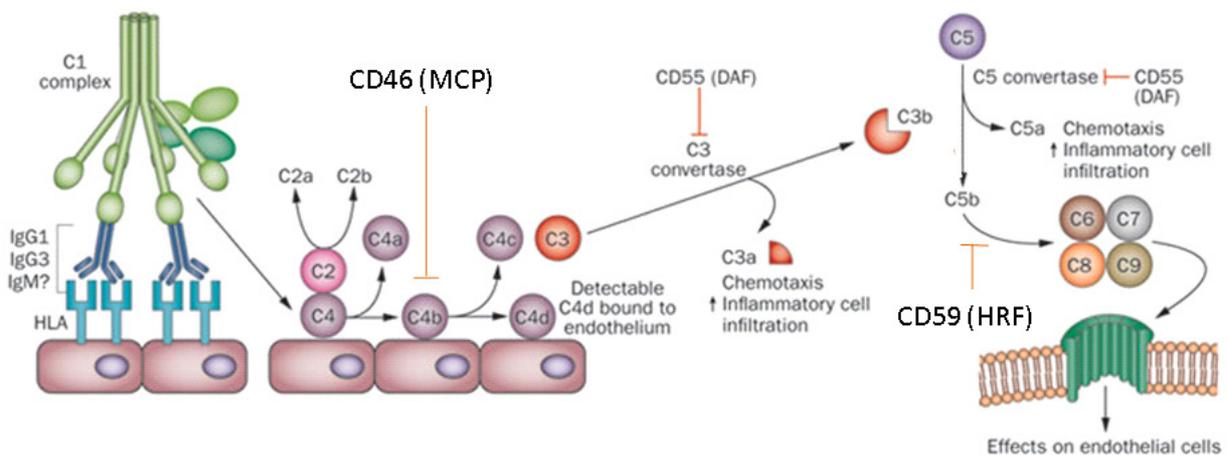


Figure 2 : Activation de la voie classique du complément. Activation de la voie classique du complément par les DSA (Anticorps IgG1, IgG3 et IgM sur le schéma) et rôles des inhibiteurs du complément à ancre GPI (CD55, CD59) ou non (CD46), adaptée Stegall et al [37].

Le système du complément est régulé par des inhibiteurs. Certains sont membranaires, liés à la bicouche lipidique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) et sont exprimés par la plupart des types cellulaires. Ce sont 1) CD46 ou MCP (Membrane Cofactor Protein) qui agit comme cofacteur pour le clivage protéolytique de C3b et de C4b par le facteur I, 2) CD55 ou DAF (Decay Accelerating Factor) qui empêche la formation des

C3 et C5 convertases et 3) CD59 ou HRF (Homologous Restriction Factor) qui inhibe la polymérisation du C9 en empêchant la liaison des complexes C5b-8 à la membrane (Fig. 3). Les travaux de L. Massara ont montré que malgré une expression de DQ bien plus faible à la surface cellulaire par rapport à DR, les deux étaient capables de lier la même quantité de C1q purifié exogène. Cependant, aucun marquage C3d n'était détectable en présence de sérum humain sur LB et HUVEC activées, sans doute suite à l'inhibition de l'activation du complément par les régulateurs membranaires.

3.2 Effets pathogènes des DSA

Dans le paragraphe précédent nous avons vu que les DSA, diminuent la survie du greffon en activant la voie classique du complément. Pourtant, la toxicité des DSA ne se manifeste pas seulement par ce mécanisme. Pour preuve, les IgG4 qui n'activent pas le complément sont aussi responsables de la perte du greffon à plus ou moins long terme même si le mécanisme n'est pas à ce jour encore élucidé [38]. De plus, les DSA sont à l'origine de la transduction d'un signal pro-inflammatoire et de prolifération au sein des cellules endothéliales du greffon et des cellules immunitaires [39], [40]. Les DSA possèdent d'autres fonctions effectrices par leur fragment Fc (fragment cristallisable) des immunoglobulines. Fixés sur les FcR (Fc Receptors) cellulaires ils entraînent l'ADCC (*Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity*) responsable de phagocytose, d'activation cellulaire, de production de cytokines pro-inflammatoires et donc de recrutement de cellules immunitaires [40], [41]. Il existe un polymorphisme très important des gènes codant les FcR à l'origine de variations inter-individuelles majeures dans les réponses cellulaires. L'ensemble de ces mécanismes entretient une inflammation chronique et un état d'hypercoagulabilité à l'origine des accidents ischémiques responsables de la nécrose tissulaire. Ils sont brièvement résumés sur la figure 3.

La toxicité des DSA dépend de plusieurs facteurs. Elle dépend de l'isotype du DSA. Seules les IgM (pentamériques) et le pontage d'au moins 2 IgG1 ou 2 IgG3 activent pleinement la voie classique du complément. Les IgG2 peuvent l'activer faiblement *in vivo* mais les IgG4 en sont incapables. Cette activation est mesurable par la détection des dépôts de C1q et de C3d à la surface cellulaire. Il faut garder à l'esprit que ce qui est observé *in vitro* n'est pas toujours le reflet de ce qui se passe *in vivo*. Par exemple les IgG2 peuvent activer fortement le complément de lapin *in vitro* lors des tests de compatibilité donneur/receveur par microlymphocytotoxicité (Crossmatch-LCT, voir paragraphe 3.4). Cependant, *in vivo* ces IgG2 n'activent que très faiblement le complément humain. Le

second facteur est celui de son « taux » plasmatique, actuellement non mesurable. Le troisième est celui de la « force » d'interaction entre le DSA et l'antigène (affinité et avidité). La capacité de reconnaissance de l'anticorps pour son épitope est fonction de son niveau et de son type de glycosylation, de la flexibilité de sa structure et de l'accès à l'épitope (encombrement spatial). Le quatrième facteur est le niveau d'expression des molécules HLA cibles sur les différents types cellulaires [42].

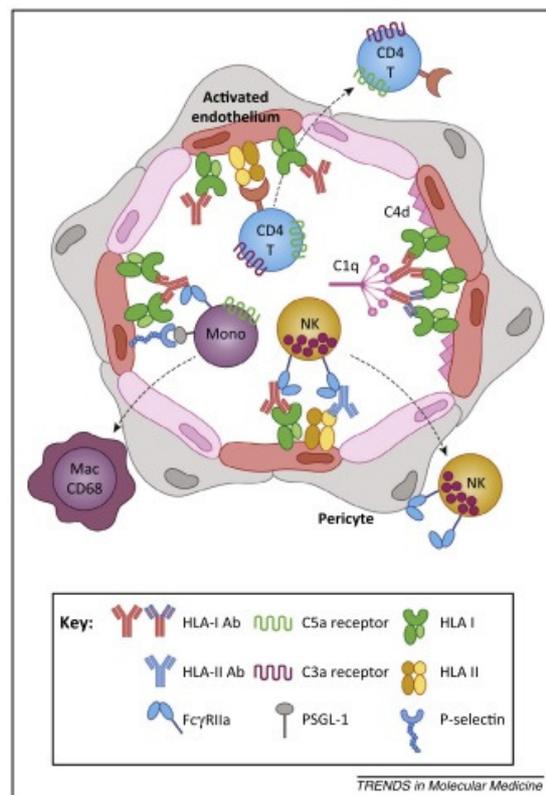


Figure 3 : Mécanismes des effets pathogènes des DSA [40]. Les DSA sont responsables de dysfonctions du greffon par différents mécanismes. L'activation des cellules endothéliales favorise le recrutement des leucocytes (via la production de C3a, C5a et la liaison à la p-selectine), la différenciation des monocytes en macrophages (CD68+), l'activation des LT-CD4+ qui vont favoriser en retour la prolifération des cellules endothéliales. De plus, les DSA vont recruter les monocytes, les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes NK via leur FcR (Fc Receptor) et vont ainsi promouvoir l'ADCC (Antibodies Dependant Cell-mediated Cytotoxicity) responsable de la phagocytose, de l'activation cellulaire (e.g. dégranulation des lymphocytes NK), de la production de cytokines pro-inflammatoire et donc du recrutement des cellules immunitaires.

3.3 Techniques de détection des DSA

Depuis la découverte que l'existence avant la greffe de DSA anti-HLA conduit au rejet quelque soit l'organe transplanté [43]–[46], l'évaluation de la réponse immunitaire allogénique contre un greffon passe par leur détection. Celle-ci est essentielle en pré-greffe, au moment de la greffe et en post-greffe. Elle permet d'évaluer le risque immunologique de

rejet. Ainsi, les patients inscrits sur la liste d'attente d'un greffon et les patients greffés bénéficient d'un suivi rapproché.

Les anticorps anti-HLA sont détectés au laboratoire dans le sérum des patients à l'aide de techniques cellulaires et acellulaires. La technique historique est une technique cellulaire, la microlymphocytotoxicité (LCT). Elle détecte des anticorps anti-HLA (IgG ou IgM) éventuellement présents dans les sérums des patients receveurs et permet de quantifier le risque immunologique. Le principe de la technique repose sur la toxicité dépendante du complément. Les sérums du receveur, sélectionnés par le biologiste, sont incubés avec des panels de lymphocytes de phénotypes HLA connus, du complément de lapin et un colorant vital. Une réaction cytotoxique correspond à l'activation de la voie classique du complément par les complexes antigènes/anticorps à la surface de la cellule. Cette activation est responsable de la lyse cellulaire, visualisée en microscopie. Cette méthode ne détecte que la présence d'anticorps anti-lymphocytes du donneur (HLA ou non) cytotoxiques (IgM, IgG1 et IgG3 et un peu IgG2). Les anti-HLA-I sont détectés par une réaction visible sur les LT et les LB à la différence des anti-HLA-II qui ne sont détectés que sur les LB. Le résultat rendu est qualitatif (positif ou négatif) pour chaque puits et pour l'ensemble des puits (score PRA : Panel Reactive Antibody). Compte-tenu des nombreuses limites de cette technique, des méthodes acellulaires de mise en évidence des anticorps ont été développées. Elles sont plus sensibles que l'œil humain et permettent de quantifier objectivement la « force » de la réactivité anticorps/antigène. Plus précisément, les molécules HLA solubilisées sont fixées sur une matrice solide. La révélation se fait à l'aide d'un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou en CMF à l'aide de la technologie Luminex® (LABScreen® PRA, Single Antigen Flow Beads Assay® (SAFB), One Lambda). Actuellement, cette dernière est la méthode la plus utilisée. Le test SAFB est un test multiplex de CMF qui associe une centaine de populations de billes fluorescentes, chacune de couleur différente et recouverte par le produit d'un allèle HLA différent (antigènes HLA recombinants). C'est l'interprétation de la MFI pour *Mean Fluorescence Intensity*, pour chaque anticorps reconnaissant un antigène HLA qui définit la « force » de l'anticorps.

Cette MFI est la résultante de nombreux paramètres :

- La concentration sérique de l'anticorps ;
- L'affinité de l'anticorps pour l'épitope de l'antigène cible ;
- Les mécanismes de compétitions (dépendant de l'épitope) :
 - Entre les IgM et les IgG. Les IgM peuvent empêcher la fixation des IgG, masquant leur détection ;

- Entre les sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) responsables d'activations plus ou moins fortes du système du complément, masquant la détection de certaines réactivités ;
- La quantité d'épitope présent sur la(les) bille(s) du test :
Il n'est pas certain que cette quantité soit identique sur toutes les billes portant chacune des spécificités différentes. Le W6/32, un anticorps pan-anti-HLA-I, reconnaît le même épitope sur toutes les molécules HLA-I et pourtant il ne donne pas les mêmes valeurs de MFI sur toutes les billes HLA-I ;
- La « qualité » de l'épitope :
 - Le ratio anticorps/épitope est très important. Si l'anticorps reconnaît un épitope public, il se fixe sur l'ensemble des billes portant les molécules HLA partageant cet épitope. L'anticorps est alors dilué par répartition sur les billes du SAFB. De plus, la reconnaissance des épitopes peut aussi varier en fonction de la quantité de sérum disponible ;
 - L'immunogénicité intrinsèque de l'antigène est un facteur à prendre en considération.

La principale limite du test SAFB est une interférence majeure, décrite récemment [13] et indépendante de l'épitope. En effet, la fixation des anticorps sur les billes SAFB portant des molécules HLA purifiées recombinantes active la cascade du complément présent dans le sérum du patient. La fixation de C1q sur le fragment Fc des DSA s'accompagne du dépôt de C3d. L'encombrement stérique produit par ces dépôts de C1q et de C3d provoque l'inhibition de la fixation du conjugué et donc la sous-estimation voir l'absence de détection des anticorps anti-HLA. L'absence de détection des anticorps peut être complète dans 1 à 2% des cas et la diminution de la réactivité est observée dans 11 à 16% des cas (données non publiées du laboratoire). Pour preuve, après des échanges plasmatiques, certains patients décrits comme peu immunisés apparaissent fortement immunisés, contrairement à ce qui était attendu, faisant suspecter alors une interférence. Le traitement des sérums des receveurs par un agent chélatant les ions calcium (Ca^{2+}) : l'EDTA (Ethylenediaminetétraacetic acide) est indispensable à la bonne interprétation des résultats. La chélation du Ca^{2+} inhibe la formation du complexe C1q, C1r, C1s et bloque ainsi la production de dépôts de C1q et de C3d. Ces interférences ont des conséquences cliniques importantes sans qu'il y ait beaucoup d'indices pour les suspecter. Il est donc recommandé que tous les sérums des patients suivis et inscrits sur la liste d'attente de greffe soient traités systématiquement par des techniques permettant de s'affranchir de ces problèmes (e.g.

EDTA) tout en conservant la spécificité des billes SAFB, les paramètres de validation technique et en diluant le moins possible les sérums.

Enfin, il est démontré que plus la MFI d'un anticorps anti-HLA, obtenue par test SAFB est forte, plus le risque de rejet d'organe à court terme est grand [45], [47], [48].

Les anticorps identifiés par le laboratoire sont saisis dans la base de données de l'agence de la biomédecine (Cristal®). Les antigènes pour lesquels les anticorps spécifiques possèdent une MFI < 500 sont considérés comme permis et ceux ayant une MFI supérieur à un seuil défini localement par le biologiste sont considérés comme interdits. Une « zone grise » peut être renseignée, elle contient les antigènes ni permis ni interdits. Le test SAFB très sensible et très résolutif (près de 100 allèles en classe I et autant en classe II). Il permet donc de définir avec précision les antigènes HLA interdits et permis à la greffe. Cette identification précise des spécificités HLA reconnues par ces anticorps est idéale afin de prédire au mieux le résultat attendu du crossmatch et donc d'anticiper le choix du donneur selon l'approche du crossmatch virtuel.

3.4 Le crossmatch

Devant l'effet cytotoxique perpétré à plus ou moins long terme par les DSA, il est essentiel d'effectuer un test ultime de compatibilité donneur/receveur, appelé crossmatch. Il est effectué dans le meilleur des cas avant la greffe (prospectif) ou après la greffe (rétrospectif). Depuis 1969 [43], ce test est très fortement recommandé avant la transplantation. Le principe général repose sur la mise en présence des lymphocytes du donneur avec des sérums du receveur. Les sérums du receveur utilisés sont des sérums historiques significatifs, c'est-à-dire des sérums d'intérêt, sélectionnés par le biologiste au cours du suivi pré-greffe du patient inscrit sur la liste d'attente.

La méthode de référence est le crossmatch en microlymphocytotoxicité ou crossmatch-LCT (CM-LCT). Les LT (exprimant la classe I) et les LB (exprimant les classes I et II) du donneur sont séparés et incubés avec le sérum du receveur (traité et non traité par le dithiothréitol (DTT), un agent réducteur détruisant le pentamère d'IgM en monomères) dans différents puits. Le complément apporté par le sérum de lapin est ensuite ajouté. En présence de DSA, la voie classique du complément s'active et entraîne la lyse des lymphocytes du donneur. Le pourcentage de cellules mortes sur le nombre de cellules vivantes est déterminé en microscopie à l'aide d'un colorant vital, exprimé sous forme de

score de 1 (toutes les cellules sont vivantes, <10% de cellules mortes) à 8 (>80% de cellules mortes). Ce score a été conçu en accord avec les protocoles du NIH (*National Institute of Health* des Etats-Unis). Le test est peu sensible. Il ne détecte que les anticorps dirigés contre les antigènes HLA du donneur activant la voie classique du complément (anticorps dits « cytotoxiques »), Enfin, ce test est dépendant de la viabilité cellulaire et ne peut être interprété facilement que si cette viabilité excède 90%.

Actuellement le crossmatch en CMF (CM-CMF) est le plus utilisé. Moins complexe que le CM-LCT, automatisable, plus rapide et plus sensible, le CM-CMF s'est imposé comme une technique de choix. Il n'est pas nécessaire de séparer préalablement les LT des LB. Un marquage multi couleurs utilisant des anticorps monoclonaux reconnaissant des marqueurs membranaires de LT (CD3) et de LB (CD19) distingue ces deux types cellulaires. Cette technique repose sur la reconnaissance des anticorps indépendamment de l'activation du complément. Elle détecte donc tous les DSA (IgG ou IgM) mais ne permet pas de juger de la cytotoxicité des anticorps dépendante du complément [49]. Une réaction positive, au laboratoire d'histocompatibilité de Bordeaux, correspond à une MFI 1,5 fois supérieure au seuil défini par la MFI d'un témoin négatif (constitué d'un pool de sérums de donneurs de sang de sexe masculin, non immunisés de groupe sanguin AB) pour les LT et 2 fois supérieure à ce seuil pour les LB. Ces seuils ont été définis en accord avec les équipes de transplantations locales.

Devant les limites du CM cellulaire, des méthodes acellulaire de mise en évidence des anticorps ont été développées, tel que le test SAFB. D'une part pour éviter de faire des CM inutilement, en pré-sélectionnant le(s) patient(s) de la liste ne reconnaissant pas le donneur, et d'autre part pour en augmenter la spécificité. Ces méthodes permettent d'anticiper le choix du donneur en essayant de prédire au mieux le résultat attendu du CM. Il consiste à comparer les DSA du receveur et le groupage HLA du donneur. A la différence du CM-LCT ou du CM-CMF qui explorent tous les DSA (anti-HLA et non anti-HLA), le CM virtuel ne statue que sur les DSA anti-HLA, c'est pourquoi cette technique est utilisée en association avec le CM-LCT et/ou le CM-CMF.

4. Le rôle des lipides membranaires

4.1 Preuves de l'existence de microdomaines

Le TCR reconnaît un complexe peptide-HLA-II. Environ 10^5 à 10^6 molécules HLA-II sont exprimées par les CPA (ce nombre varie en fonction du type cellulaire, du stade de différenciation et du stade d'activation). Entre 10 et 200 complexes peptide-HLA-II sont nécessaires pour activer un LT-CD4 spécifique de ce complexe [50], [51], [52]. Cela signifie que sur l'ensemble des molécules HLA-II exprimées à la surface d'une CPA, entre 0,001% et 0,2% de complexes peptides-HLA-II de même spécificité sont nécessaires à l'activation d'un LT-CD4 [51]. La faible proportion de chaque complexe peptides/HLA-II à la surface de la membrane plasmique apparaît comme une limite à l'activation des LT-CD4. Une hypothèse avancée permettant d'expliquer le potentiel activateur des CPA serait l'organisation particulière des complexes peptide/HLA-II, en clusters, à la surface des CPA. Cette organisation offre deux avantages, celle d'augmenter leur probabilité d'être reconnus par un TCR et celle de diminuer quantité de peptides nécessaire à l'activation cellulaire, le tout dans le but de permettre une activation rapide et efficace des LT. Cette organisation permet d'augmenter la concentration locale des complexes peptide-HLA-II dans la synapse immunologique [53], [54].

La membrane plasmique est discontinue et possède une organisation complexe. Elle est composée de domaines enrichis en cholestérol, sphingolipides et glycosphingolipides nommés radeaux lipidiques ou microdomaines mesurant de 4 à 200 nm de diamètre. Ce sont des structures dynamiques dont la demi-vie est brève, de l'ordre de la minute [55]. Ils sont de composition très variable [56] contenant notamment les protéines à ancre GPI (dont CD55 et CD59, régulateurs du complément) et possèdent des propriétés fonctionnelles différentes. Ce sont des plateformes hétérogènes de signalisation [57]. Les signaux sont intégrés et modulés avant d'être relayés à l'intérieur de la cellule [58]. De nombreux rôles ont été mis en lumière, comme celui de stabiliser un signal émis à travers un récepteur membranaire afin qu'il soit plus durable et plus efficace, celui de relocaliser des molécules éloignées sur la membrane pour les rapprocher de kinases, de molécules adaptatrices, de co-récepteurs, tout en les éloignant des éléments de régulation négative (phosphatases), autorisant ainsi la transduction du signal [56] ou encore celui permettant l'adhésion cellulaire, l'endocytose ou le transport vésiculaire [59]. Deux à trois microdomaines peuvent s'associer en domaines plus larges pour augmenter l'efficacité de la transduction du signal. D'autres

microdomaines existent. D'une part les domaines appelés TEM pour *Tetraspanin Microdomains* qui contiennent des protéines à 4 domaines transmembranaires comme le CD9, CD81, CD82, CD37 et d'autre part, des domaines cavéolaires. Ces microdomaines sont aussi enrichis en cholestérol et participent aux différentes fonctions cellulaires comme la transduction des signaux d'endocytose, du transport du cholestérol libre et de la fusion membranaire. Ce sont des plateformes de concentration des molécules [60]. Cependant selon d'autres auteurs, les radeaux lipidiques et les TEM ne feraient qu'un [61].

Les CPA régulent la distribution membranaire des HLA-II pour former la synapse immunologique. Ainsi, dans les LB, la moitié des molécules de surface HLA-II seraient concentrées, constitutivement, dans les radeaux lipidiques, facilitant l'activation des LT avec de faibles densités de complexes peptide/HLA [62]. Le potentiel d'activation des LT est déterminé par l'organisation spatiale des membranes et non par le nombre de ligands sur la CPA [63]. De même, les TCR sont organisés sous forme de nanoclusters préexistants avant l'activation, augmentant l'avidité (affinité fonctionnelle) du LT pour le complexe peptide/HLA et palliant ainsi la faible affinité de l'interaction TCR/peptide/HLA [64]. Enfin, le potentiel d'activation des LT par les CPA est aussi favorisé par la colocalisation des molécules de costimulation avec les molécules HLA-II [65], [66]. A noter que l'organisation en clusters des molécules HLA-II est effective dès les premières étapes de l'apprêtement de l'antigène dans l'appareil de Golgi [51]. La taille de ces clusters est optimisée afin de permettre une transduction maximale du signal [58]. De plus, l'augmentation du niveau d'expression de DR à la surface des DC matures n'est pas le reflet de l'augmentation de DR dans les radeaux lipidiques. Ceci est probablement expliqué par des phénomènes cellulaires limitant la quantité de DR concentrés dans les microdomaines à un moment donné. Cependant, les DR retrouvés dans ces microdomaines, stabilisés par des peptides différents de ceux retrouvés ailleurs sur la membrane des DC, conduiraient à délivrer des signaux transmembranaires différents expliquant les propriétés distinctes des DC matures et des DC immatures [67].

4.2 Etude des microdomaines

4.2.1 Isolement

L'étude de ces microdomaines est difficile compte-tenu de leur petite taille (de l'ordre du nanomètre) et de leur dynamisme. Cependant, l'utilisation d'agents biochimiques et de techniques optiques permet de caractériser les associations de protéines aux radeaux lipidiques, l'organisation de ces protéines, la quantification de la taille des clusters protéiques

et de déterminer leur abondance dans la cellule. L'isolement de ces microdomaines repose sur une propriété originale. Ils sont capables de résister à l'action solubilisante de détergents forts non ioniques, tels que le Triton X-100, à basse température. De cette propriété ils tirent leurs noms, celui de *Detergent Resistant Membrane* (DRM). Ils sont ensuite isolés par ultracentrifugation en gradient discontinu de sucrose. La création d'un gradient de densité va moduler la vitesse de sédimentation des composants cellulaires. Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera. Plus la différence de densité est grande, plus la sédimentation est rapide. S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération. Si la particule est moins dense que celle du milieu, celle-ci s'élèvera dans le tube jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne ou, le cas échéant, jusqu'à flotter à la surface. Un gradient est dit « discontinu » quand les solutions juxtaposées sont de densités significativement différentes.

L'isolement des microdomaines dépend de plusieurs facteurs. Il est fonction du détergent utilisé [68], [69], de la température d'incubation, du ratio protéines/détergent dans le lysat cellulaire et de la quantité de sérum présent dans la culture cellulaire [70]. C'est pourquoi, en fonction du protocole utilisé l'observation des molécules HLA-II peut être plus ou moins délicate. Le protocole que nous avons retenu est celui du Dr Legembre mis au point en 2006 [56].

4.2.2 Les études fonctionnelles

a. La Méthyl- β -cyclodextrine (MBCyD)

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques, issus de la dégradation naturelle de l'amidon, ayant des propriétés lipophiles à l'intérieur et hydrophiles à l'extérieur leur permettant d'interagir avec de nombreuses molécules. Les CD naturelles α , β , γ , diffèrent entre elles par la taille de leur anneau et leur solubilité. Elles ont fait l'objet de modifications chimiques donnant naissance aux CD hémi-synthétiques, notamment méthylées permettant d'augmenter leur solubilité en milieu aqueux [71] comme pour la MBCyD. La dualité de leur polarité leur permet d'augmenter la solubilité aqueuse de certains composés en formant des complexes d'inclusion [72]. Les CD modulent la quantité de cholestérol membranaire de manière dépendante de la dose et dans ce contexte la MBCyD est la plus efficace. Elle sert d'« accepteur » de cholestérol à forte concentration et de « donneur » de cholestérol à faible concentration. La formation et la destruction de ces radeaux lipidiques dépendent de leur densité en cholestérol [73]. Ainsi, la MBCyD déstabilise

les radeaux lipidiques en éliminant le cholestérol membranaire à travers le pore constitué au sein de la molécule cyclique [72]–[74]. Elle perturbe l'intégrité des microdomaines empêchant l'expression des fonctions cellulaires portées par les protéines qui les constituent. A noter que cet agent chimique enlève $32 \pm 4\%$ du cholestérol de la membrane plasmique sans provoquer ni la mort des DC ni de modification du niveau d'expression des molécules HLA-II [75]. L'utilisation de la MBCyD permet l'étude de la distribution membranaire des molécules HLA en analysant la réponse fonctionnelle d'activation du complément (dépôt de C3d ou de C1q) par les anticorps anti-HLA.

b. Le ganglioside GM1

Les gangliosides sont une association entre des glycosphingolipides et des acides sialiques, ils appartiennent au glycocalyx recouvrant la surface des cellules eucaryotes. Ils sont principalement concentrés dans les radeaux lipidiques et participent à leur formation. Ils peuvent interagir avec de nombreuses molécules solubles ou membranaires. Ils représentent aussi des récepteurs ou co-récepteurs de virus, bactéries et toxines microbiennes. Plus précisément, le GM1 est le récepteur de la toxine cholérique. L'ajout de GM1 exogène dans le surnageant de cultures cellulaires donne 3 fractions : la première s'associe en micelles dans le surnageant, la seconde interagit avec les protéines cellulaires par des liaisons réversibles et la troisième est insérée dans la membrane plasmique [76]. Après fixation ou insertion dans la membrane plasmique, ces gangliosides sont responsables de leur endocytose et de l'internalisation sélective de certaines protéines des microdomaines (e.g. CD28). Le niveau d'expression des protéines n'appartenant pas à ces radeaux lipidiques, telle que la molécule Fas/CD95 (utilisée comme contrôle), ne sont pas affectées par ce traitement [56]. De plus, étant un composant majeur des microdomaines, le GM1 peut servir de contrôle positif dans les expériences. C'est pourquoi son utilisation nous permet d'évaluer la composition protéique de ces microdomaines.

c. La PhosphatidylinositolPhosphoLipase C (PIPLC)

La PIPLC est une lécithinase intracellulaire qui clive sélectivement les protéines à ancre GPI. Son utilisation nous permet d'éliminer de la surface les molécules régulatrices du complément à ancre GPI telles que CD55 et CD59. L'objectif est de déterminer si l'élimination de ces molécules régulatrices a des conséquences fonctionnelles sur la cascade d'activation du complément et plus concrètement sur le dépôt de C3d à la surface des membranes cellulaires.

4.2.3 Les techniques optiques

D'autres méthodes sont utilisées pour visualiser les radeaux lipidiques et notamment les méthodes optiques. Les études microscopiques (microscopie confocale, électromicroscopie) prouvent que les molécules HLA-II sur les CPA, ne sont pas réparties uniformément à la surface cellulaire mais organisées en petits groupes moléculaires [60] qui colocalisent avec la toxine cholérique liant le GM1 [53], [77] et que 60% des molécules HLA-II sont regroupées en clusters de diamètre < 200 nm [78].

5. Les objectifs

L'objectif principal du projet est de mesurer en CMF l'expression relative des HLA-I natifs et « dénaturés » à l'aide des anticorps monoclonaux W6/32 et HC10 respectivement et celle des 3 types de molécules HLA-II, sur les LB et sur des CE de différentes origines, activées ou non. Dans ce modèle, l'activation reproduit le stress représenté par la période d'ischémie pré-transplantation.

Les objectifs secondaires sont d'étudier :

1) Leur association aux microdomaines, en CMF, via l'utilisation d'agents déstabilisant ces structures. L'organisation membranaire particulière de DQ pourrait expliquer l'immunogénicité plus importante de celui-ci, malgré une densité membranaire supposée beaucoup plus faible que celle de DR. Elle pourrait alors expliquer le lien entre les quantités de molécules, faibles pour DQ par rapport à DR, et la toxicité du DSA (capacité à activer le complément). L'étude de l'association de ces molécules aux radeaux lipidiques sera réalisée à l'aide des cellules endothéliales dont la membrane sera déstabilisée par la MBCyD. Les différentes fractions de la membrane seront séparées en gradient de sucrose avant et après déstabilisation, par centrifugation puis analyse en SDS-PAGE suivi d'un immunoblot afin de savoir si les molécules DQ colocalisent bien avec le cholestérol et les sphingolipides, et si la distribution est différente pour DR.

2) Leur capacité à activer le complément après action d'un anticorps spécifique de chaque forme (HLA-I natif et « dénaturé ») ou de chaque locus en classe II. Nous comparerons l'action de l'anticorps anti-FHC (HC10) à celle de l'anticorps anti-HLA natif (W6/32) et celle de l'action de l'anti-DR à l'anti-DQ. L'activation directe du complément sera visualisée par CMF en présence de C1q recombinant ou avec les sérums humains dont les

facteurs du complément (C1q, C4, C3, C2, C5) sont éliminés de façon à analyser chaque étape de la cascade séparément et afin de comparer précisément les potentialités de chaque antigène cible. Nous utiliserons la PIPLC pour éliminer de la surface les molécules régulatrices du complément en clivant l'ancre GPI de CD55 et de CD59, permettant ainsi de mesurer le rôle de ces régulateurs membranaires dans l'effet des anticorps anti-HLA. Ces inhibiteurs étant localisés dans les radeaux lipidiques, la confrontation de ces résultats avec la localisation physiologique des molécules HLA qui nous intéressent pourra expliquer les phénomènes mis en évidence et montrer d'éventuelles différences entre DR et DQ.

3) La pertinence du crossmatch sur LB comme modèle d'anticipation de la réponse des CE à l'action d'anticorps anti-HLA-II, en fonction des différences que nous observerons entre ces types cellulaires pour l'objectif principal et les objectifs secondaires précédents.

Le résumé des objectifs est présenté figure 4.

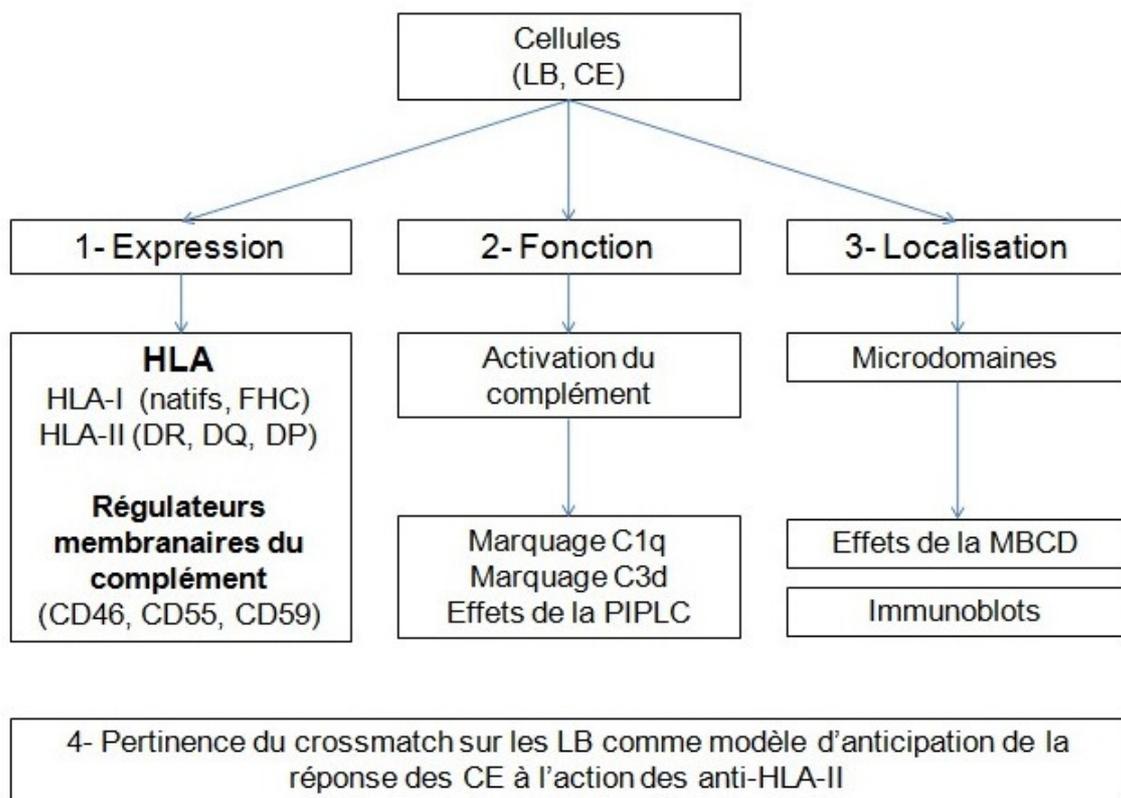


Figure 4 : Résumé des objectifs. A partir de cellules (LB ou CE), l'objectif principal, noté 1, est l'étude du niveau d'expression des molécules HLA-I et -II et des régulateurs du complément en CMF sur les LB et CE. Les objectifs secondaires, notés de 2 à 4, sont l'étude de la capacité des anticorps anti-HLA-I et -II à activer le complément, en CMF, l'étude de la localisation des molécules HLA-I et -II au sein des microdomaines en CMF via l'étude de l'action de la MBCD et en immunoblot, et enfin l'analyse de la pertinence du crossmatch sur les LB comme modèle d'anticipation de la réponse des CE à l'action des anticorps anti-HLA-II.

Matériels et méthodes

1. Les réactifs

Les anticorps destinés aux marquages cellulaires et aux tests fonctionnels sont décrits dans le *Tableau 1*, et les autres réactifs (agents chimiques, milieux de culture, tampons, etc.) dans le *Tableau 2*.

Tableau 1 : Anticorps

Anticorps	Spécificité	Hôte / Isotype	Couleur	Fournisseur	Concentration finale utilisée	Référence
W6/32	Pan HLA-ABC	Souris / IgG2a	Non conjugué	Thermo Fisher Scientific	10 µg/mL	MAI 70111 MAI 19027
HC10	Pan FHC	Souris / IgG2a	Non conjugué	Dr Lee, One Lambda, CA	20 µg/mL	-
Anti-DR	Pan HLA-DR	Souris / IgG2a, k clone G46-6	Non conjugué	BD Pharmigen	20 µg/mL	555810
Anti-DR	Anti HLA-DR α	Souris Clone A6.147	Non conjugué	Dr Mooney, INSERM UMRS 1160, Paris	1/500	-
Anti-DQ	Pan HLA-DQ	Souris / IgG2a, k	Non conjugué	BD Pharmigen	20 µg/mL	555562
L2	Pan HLA-DQ	Ascite de souris	Non conjugué	Dr Mooney, INSERM UMRS 1160, Paris	1/2000	-
Anti-DP	Pan HLA-DP	Souris / IgG3	Non conjugué	Abcam	4 µg/mL	Ab20897
Anti-C3d	Pan C3d complexe	Souris / IgG1	Biotinylé	Quidel	20 µg/mL	909496

Anticorps	Spécificité	Hôte / Isotype	Couleur	Fournisseur	Concentration finale utilisée	Référence
Anti-C1q	Pan C1 complexe	Souris / IgG1	Biotinylé	Quidel	30 µg/mL	026541
Anti-CD19	Anti-CD19	Souris / IgG1, k	APC	BD Pharmigen	1/5	555415
Anti-CD55	Anti-CD55	Souris / IgG2a, k	FITC	BD Pharmigen	1/3	555693
Anti-CD59	Anti-CD59	Souris / IgG2a, k	FITC	BD Pharmigen	1/3	555763
Anti-CD59	Anti-CD59-	Lapin / IgG	Non conjugué	Thermo Fischer Scientific	2 µg/mL	PA5-34513
Anti-CD46	Anti-CD46	Souris / IgG2a, k	FITC	BD Pharmigen	1/3	555949
Anti-CD4	Anti-V1 du Domaine Ig-like	Souris / IgG	FITC	Beckman Coulter	1/3	A 07750
Anti-CD3	Anti-CD3ε	Souris / IgG1,k	FITC	BD Pharmigen	1/3	555332
Anti-CD69	Contre Ag précoce d'activation	Souris / IgG1,k	PE	BD Pharmigen	2 µg/mL	341652
OKT3	Anti-CD3	Souris / IgG 2a	Non conjugué	Sigma Aldrich	10 µg/mL	SAB4700040
Iso FITC	-	Souris / IgG2a	FITC	Beckman Coulter	1/3	A 12689
Iso APC	-	Souris / gamma 1	APC	BD Pharmigen	1/3	945818
GAMPE	Chaînes lourdes des Ig de souris	Chèvre/Polyclonal	PE	Beckman Coulter	1/200	PN IM 0855
SAPE	Biotine	<i>Streptomyces avidinii</i>	PE	Beckman Coulter	1/500	PN IM 0557
Anti-β-actine	Anti-β-actine humaine	Lapin	Non conjugué	Cell Signaling Technology	1/4000	49705

Anticorps	Spécificité	Hôte / Isotype	Couleur	Fournisseur	Concentration finale utilisée	Référence
Anti-Lck	p56Lck	Souris / IgG 2a	Non-conjugué	BD Transduction Laboratories	1/5000	610097
GAM 800	IRDye 800CW	IgG chèvre anti-souris(H+L)	Vert	LI-COR Biosciences	1/100000	926-32210
GAM 680	IRDye 680DR	IgG chèvre anti-souris(H+L)	Rouge	LI-COR Biosciences	1/100000	926-68070
GAR 800	IRDye 800CW	IgG chèvre anti-lapin (H+L)	Vert	LI-COR Biosciences	1/100000	926-32211
GAR 680	IRDye 680DR	IgG chèvre anti-lapin (H+L)	Rouge	LI-COR Biosciences	1/100000	926-68071

Tableau 2 : Agents chimiques et milieux de culture

Nom	Spécificité	Hôte / Isotype	Fournisseur	Concentration ou volume final utilisé	Référence
Promocell MV2	Milieu de culture (HUVEC)	-	BioWhittaker, Walkersville, MD	500 mL	C-22022
MCDB131	Milieu de culture (HMEC-1)	-	Gibco	500 mL	10372019
OptiMEM 1 GlutaMAX	Milieu de culture (HMEC-1, HSkMEC, HKdMEC, HLuMEC)	-	Gibco	500 mL	11564506
RPMI	Milieu de culture (cellules en suspension)	-	Gibco	500 mL	31870-025
SVF	Sérum de veau fœtal	Bovin	PAA laboratories GmbH, Austria	2 à 50 mL	A15-102
L-Glutamine	Acide aminé	-	Sigma-Aldrich	2 mM	G-8540

Nom	Spécificité	Hôte / Isotype	Fournisseur	Concentration ou volume final utilisé	Référence
IFNγ	Cytokine activatrice recombinante humaine	<i>Escherichia. coli</i>	PeproTech	200 ng/mL	300-02
Gentamycine	Antibactérien	<i>Micromonospora purpurea</i>	Gibco	40 μ g/mL	15710-049
Amphotéricine B	Antifongique	-	Gibco	0,5 μ g/mL	15290-018
Pénicilline / Streptomycine	Antibactériens	<i>Penicillium / Streptomyces griseus</i>	Gibco	1 X	15140-122
Ficoll	FICOLL 400™ Trademark of GE healthcare	-	Eurobio Courtaboeuf France	12 mL pour 35 mL de sang dilué au demi	GAUFIC00-62
Trypsine/EDTA	Enzyme/ Chélateur d'ion divalent	-	Gibco	0.05% Trypsine-5 mM EDTA	25300-054
EDTA disodique	Chélateur d'ion divalent	-	Prolabo	10 mM, pH=7.4	20-302-180
Méthanol	Méthanol analaR Normapur	-	VWR Prolabo	Pur	20847.307
BSA	Albumine	Bovin	Sigma Aldrich	500 g	A9647
PIPLC	Lécithinase	<i>Bacillus cereus</i>	Sigma Aldrich	20 μ L = 1 U	P8804
MBCyD	Chélate cholestérol	Agent chimique	Sigma Aldrich	2 mM	C4555
GM1	Monosialoganglioside-GM1	Bovin	Sigma-Aldrich	120 μ g/mL-	G7641
C1q	C1q protein (hexamer)	Humain recombinant	Quidel	10 μ g/mL	A400

Nom	Spécificité	Hôte / Isotype	Fournisseur	Concentration ou volume final utilisé	Référence
Sérum humain	Source de complément	Humain	Donneur sain	25 µL, 30 min à 37°C	-
Billes CD3+	Microbilles magnétiques	Humain	MACS Miltenyi biotec	20 µL pour 10 ⁷ cellules	130-050-201
Billes CD14+	Microbilles magnétiques	Humain	MACS Miltenyi biotec	20 µL pour 10 ⁷ cellules	130-050-101
Inhibiteurs de protéases	AESBF, Aprotinine, Bestatine, E-64, Leupeptine, Pepstatine A-	-	Sigma Aldrich	1/200	P8340 cocktail 1
Inhibiteurs de phosphatases	Sodium orthovanadate, Sodium molybdate, Sodium tartrate, Imidazole	-	Sigma Aldrich	1/200	P5726 cocktail 2
Sucrose	Saccharose	-	Sigma Aldrich	Solutions à 5%, 30%, 75%	S0389
Dosage BCA	Acide bichromique	-	Thermo Fischer Pierce	-	23225
HEPES	Zwitterion acide stable à pH 6,8-8,2	-	Sigma Aldrich	25 mM	H3375
NaCl	Chlorure de sodium	-	Sigma Aldrich	150 mM	S6543
NaF	Fluorure de sodium	-	Sigma Aldrich	1 mM	S7920

Nom	Spécificité	Hôte / Isotype	Fournisseur	Concentration ou volume final utilisé	Référence
Na3VO4	Orthovanadate de sodium	-	Sigma Aldrich	1 mM	S6508
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthylether)-N,N,N',N'-tétraacétique	-	Sigma Aldrich	2 mM	S0396
DMSO	Diméthyl sulfoxyde	-	Sigma Aldrich	10%	D8418
Gels d'électrophorèses	Mini Protean TGX	-	BioRAD	-	456-1104
Tris base	Amino peptidase substrat	-	Sigma Aldrich	0,25 M	11814273001
SDS	Sodium dodécyl sulfate Détergent anionique	-	Sigma Aldrich	1%	L3771
Glycine	Acide aminé	-	Sigma Aldrich	1,9 M	G8898
Glycérol	Alcool	-	Sigma Aldrich	60 %	G2025
Bétamercapto-éthanol	Agent réducteur	-	Sigma Aldrich	5 %	M3148
Bleu de Bromophénol	Agent adsorbant colorant	-	Sigma Aldrich	0,025 %	32712
Tween 20	Détergent non ionique	-	Sigma Aldrich	0,05 %	P1379
Ethanol	Éthanol absolu AnalaR NORMAPUR®	-	VWR Prolabo	Pur	20821.330

Nom	Spécificité	Hôte / Isotype	Fournisseur	Concentration ou volume final utilisé	Référence
Trans-Blot® Turbo Transfer System RTA Midi nitrocellulose	Kit de transfert rapide	-	BioRAD	40 blots	170-4271
Odyssey Blocking Buffer	Tampon de saturation des sites non spécifiques	-	LI-COR Biosciences	1 L	927-40003
Triton X100	Détergent non-ionic	-	Sigma Aldrich	1 %	X100
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate	-	Sigma Aldrich	25 ng/mL	P8139
Ionomycine	Calcium ionophore	-	Sigma Aldrich	1 µg/mL	I0634

2. Cellules et culture cellulaire

2.1 Echantillons sanguins

2.1.1 Modèle des lymphocytes B : intérêts

L'expression et le polymorphisme des molécules HLA sur les lymphocytes sont utilisés *in vitro* pour étudier la compatibilité entre le donneur et le receveur. Les LT et LB séparés du donneur sont mis en présence du sérum du receveur contenant éventuellement un ou plusieurs DSA. La toxicité est alors appréhendée à l'aide du complément de lapin en microlymphocytotoxicité (CM-LCT) ou par un marquage cellulaire (CM-CMF).

2.1.2 Obtention et entretien

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC pour *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) ont été obtenues de donneurs de sang de l'Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin (EFSAL) (convention CPIS 0840 signée entre l'EFSAL et l'UMR 5164), sous la forme de poches de sang de patients atteints d'hémochromatose ou de filtres déleucocytants prélevés à partir de donneurs de sang. Les PBMC ont été isolées par séparation en gradient de densité ou Ficoll. Elles sont conservées dans 50 mL de RPMI à entre 2 et 8°C jusqu'à une semaine à la concentration de $4 \cdot 10^6$ cellules/mL, afin de réaliser les expériences de marquage cellulaire sur cellules fraîches ou congelées.

Les échantillons de sang total proviennent de patients du CHU de Bordeaux adressés pour groupage HLA en vue d'un don ou de la possibilité d'une greffe. Deux aliquotes d'1 mL de sang ont été directement congelés. Après décongélation et lavage en PBS, le reliquat de globules rouges non détruit par la décongélation est lysé avec 2 mL de la solution BD FACS Lysing solution® pendant 10 min à température ambiante, à l'obscurité. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 150 µl de PBS. Dans certaines expériences, les LB ont été enrichis à partir des PBMC par tri cellulaire négatif séquentiel à l'aide de billes Miltenyi Biotec® CD14+ et CD3+.

2.2 Lignées de cellules endothéliales

2.2.1 Origine

Nous avons utilisé 5 types de CE humaines : les 2 modèles de laboratoire classiques HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) et HMEC-1 (*Human Microvascular Endothelial Cell*), et 3 lignées tissulaires microvasculaires obtenues à partir de peau (HSkMEC pour *Human Skin Microvascular Endothelial Cell*), de poumon (HLuMEC pour *Human Lung Microvascular Endothelial Cell*) et de rein (HKdMEC pour *Human Kidney Microvascular Endothelial Cell*), mais jamais analysées dans cette application.

Les HUVEC ont été générées et cultivées au laboratoire, et congelées aux passages 5 à 8. Elles sont de phénotype HLA : A2,24 ; B44,57 ; DR4,7 ; DQ7,9.

Les HMEC-1 sont des cellules dérivées de cellules endothéliales microvasculaires de derme qui ont été immortalisées. Elles proviennent de l'ATCC et ont été congelées aux passages 4 et 5. Leur phénotype HLA est : A1,68 ; B35,58 ; Cw4,6 ; DR12,18 ; DQ4,5 ; DP1,18.

Les 3 autres lignées ont été obtenues au laboratoire du Pr. Claudine Kieda (CNRS-UPR 4301, Orléans, France). Elles ont été isolées puis immortalisées selon une méthode originale [21]. Les HSkMEC sont les cellules les plus étudiées au cours de ce travail compte tenu de leur niveau d'expression des molécules HLA, c'est pourquoi seul leur phénotypage HLA été réalisé : A2,31 ; B51,60 ; DR1,11 ; DQ7,5.

2.2.2 Entretien

Les cellules sont adhérentes et nécessitent des milieux de culture particuliers :

- HUVEC : milieu PROMOCCELL MV2 additionné d'un mélange de facteurs de croissance (hEGF, hVEGF, hFGF-B, R3-IGF-1), de glutamine (2 mM) et d'un mélange d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine) (1% v/v).

- HMEC-1 : milieu MCDB131 (Gibco), additionné de SVF (10% v/v), de glutamine (2 mM), d'hydrocortisone (1 µg/mL), de hEGF (10 ng/mL) et d'un mélange pénicilline/streptomycine (1% v/v).

- HLuMEC, HSkMEC et HKdMEC : milieu OptiMEM additionné de 10 mL SVF (2%, v/v), de gentamicine (10 mg/mL) et d'amphotéricine B (250 µg/mL). Elles sont congelées aux passages 14 à 20 (HLuMEC), 24 à 30 (HSkMEC), 18 à 24 (HKdMEC).

Les CE sont cultivées dans 4 mL en flasque de 25 cm² ou 12 mL en flasque de 75 cm², à raison de 4.10⁴ cellules/cm², à l'étuve à 37°C sous 5% de CO₂. A partir du 17^{ème} repiquage environ les HUVEC et HMEC-1 commencent à se différencier morphologiquement et ne sont donc plus utilisables. Pour les repiquages, les cellules sont décollées avec 2 à 4 mL d'un mélange de trypsine/EDTA pendant 2 min à température ambiante ou à 37°C (HUVEC, HMEC-1).

2.2.3 Activation

Les CE sont activées en ajoutant au milieu de culture l'IFN γ humain recombinant (200 ng/mL pour environ 3.10⁵ cellules) pour une durée de 4 jours.

2.3 Lignées de cellules en suspension

La mise au point des différentes expériences a nécessité l'utilisation de lignées cellulaires. Dans un premier temps l'expression des molécules HLA-I, FHC et HLA-II a été étudiée sur les lignées tumorales humaines de type lymphocytaire B (positives pour la classe I et la classe II) : JY, Dabin, SKW6.4 et de type monocytaire : THP-1. L'intérêt des expériences réalisées avec des lignées B a été d'une part de me familiariser avec la culture cellulaire et aussi de se placer dans les conditions du test de crossmatch. D'autres lignées lymphocytaires transformées ou de cellules cancéreuses ont été utilisées. Les Jurkat et JRT3 sont issues de LT, les « Boissel » proviennent de LB d'un patient, les K562 et K562-HLA-B35 sont des cellules blastiques de leucémie myéloïde chronique (LMC), les HT29 sont des cellules cancéreuses d'un cancer colorectal d'un patient caucasien.

2.4 Congélations cellulaires

Les LB et les CE, lavées, sont remises en suspension dans un mélange SVF (50% v/v), milieu de culture (40%, v/v) et DMSO (10%, v/v), à raison de $8 \cdot 10^6$ (LB) ou 0.7 à $1 \cdot 10^6$ (CE) par ampoule dans 1 mL. Après congélation lente à -80°C pendant 24 à 48h, les ampoules sont transférées dans l'azote liquide pour une conservation longue.

3. Marquages cellulaires par cytométrie en flux

3.1 Principe

La CMF mesure sur une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites, billes, etc.), les caractéristiques individuelles de chaque particule telles que la taille, la forme et n'importe quel marqueur ou fonction qui puisse être détecté par un composé fluorescent. Les particules passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser(s), des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule et des photo-multiplicateurs les transforment en signaux électriques. Les signaux mesurés sont :

- La lumière diffusée aux petits angles (*Forward Scatter*, FSC) renseignant sur la taille des particules
- La lumière diffusée à 90 degrés (*Side Scatter*, SSC) renseignant sur la forme, la structure interne et la granularité des particules

- Les signaux de fluorescence
 - L'autofluorescence : fluorescence émise par la cellule elle-même.
 - La fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome se liant spécifiquement à la cellule.

Les données ainsi recueillies se présentent sous forme de graphiques ou d'histogrammes.

3.2 Mode opératoire du marquage cellulaire

Les cellules d'intérêt sont marquées avec le (simple marquage) ou les (double marquage) anticorps d'intérêt, répertoriés dans le *Tableau 1*. Les marquages peuvent être directs (l'anticorps d'intérêt est fluorescent) ou indirects (un anti-sérum ou conjugué fluorescent spécifique de l'isotype de l'anticorps primaire est ajouté). Les anticorps sont dilués à la concentration voulue dans du PBS (Phosphate Buffered Saline).

Les cellules (25 μ l de PBS contenant de 10^5 à 3.10^5 cellules) sont incubées en présence de l'anticorps primaire (25 μ l d'anticorps dilué dans du PBS au double de la concentration choisie) en plaque 96 puits à fonds ronds. Après 15 min à +4 °C, les cellules sont lavées pour éliminer l'excès d'anticorps non fixé, deux fois comme suit : 1) ajout de 200 μ l de PBS-BSA (1%), puis 2) centrifugation 2500 tour par min, 1 min, puis 3) le surnageant est éliminé par retournement vif, et enfin 4) le culot cellulaire est remis en suspension par une agitation brève au vortex. Puis 50 μ l d'anticorps secondaire conjugué est ajouté si l'anticorps primaire n'est pas couplé directement à un fluorochrome. L'incubation et les lavages sont réalisés comme décrit ci-dessus. Les cellules sont enfin remises en suspension dans 200 μ l de PBS-BSA (1%) puis analysées au cytomètre BD FACS CANTO II équipé du logiciel DIVA Software (BD Biosciences, San Jose, USA).

Différentes variantes de ce mode opératoire ont été employées, en fonction de l'objectif :

a) Pour les PBMC après un marquage indirect, une troisième étape est nécessaire. L'identification des LB (CD19+) est réalisée par l'ajout d'un anticorps anti-CD19 fluorescent dans un canal différent (50 μ l après l'étape de lavage, suivi d'un lavage supplémentaire avant lecture).

b) L'étude de la fixation de C1q nécessite dans l'ordre le marquage des cellules par un anticorps anti-HLA (anticorps primaire non conjugué), puis l'ajout de C1q humain

recombinant (30 µg/mL, 30 min à 37°C), puis après centrifugation, élimination du surnageant par aspiration et ajout d'un anti-C1q biotinylé, suivi d'un lavage et enfin de la révélation en CMF à l'aide de streptavidine conjuguée à la phycoérythrine (SAPE).

c) L'étude de la fixation de C3d est réalisée comme pour C1q à ceci près que le complément est fourni sous la forme de sérum humain de donneur sain. L'étape d'incubation des cellules avec les anticorps anti-HLA d'intérêt est suivie, après lavage, d'une étape d'incubation des cellules avec le sérum humain pendant 30 min à 37°C. Ensuite, après une étape de lavage, un anticorps anti-C3d biotinylé est incubé avec les cellules. Pour finir, la révélation est effectuée en CMF à l'aide de SAPE.

Pour les marquages HLA, de façon à pouvoir comparer les résultats obtenus avec des anticorps différents, les expériences ont été réalisées en utilisant l'anticorps primaire à concentration saturante (résultats non montrés) et en marquage indirect avec le même conjugué et le même fluorochrome. De plus, les marquages HLA-I et II ont été réalisés en même temps pour chaque expérience.

3.3 Traitement et analyse des données

Les données sont exploitées par 3 logiciels :

- Excel® : les moyennes et médianes de MFI sont saisies pour tous les paramètres, puis présentées sous forme d'histogrammes.
- GraphPad® : ce logiciel de traitement graphique est plus performant qu'Excel® pour exploiter les données sous forme de graphiques et de statistiques.
- FlowJo® : ce logiciel exploite les données sous forme de courbes, cette représentation est parfois plus adaptée pour distinguer les différences d'expression des molécules.

4. Traitements par MBCyD, GM1 et PIPLC

La MBCyD est une poudre hydrosoluble dissoute à 40 mM dans du RPMI. Elle est utilisée entre 1,5 et 6 mM avec 10^6 cellules dans 1 mL de milieu de culture cellulaire sans sérum de veau, à 37°C, pour 10 à 30 min, en tube, en agitant régulièrement. L'absence de toxicité des concentrations choisies a été appréhendée sur les LB et les CE. La CMF a été

employée pour les LB avec une révélation à l'aide d'un colorant vital, le DAPI (4,6-Diamidino-2-phénylindole, dihydrochloride) se fixant fortement à l'ADN, après 10, 20 et 30 min d'incubation (mortalité négligeable de l'ordre de 8%, données non montrées). Pour les HUVEC, une observation du décollement des cellules au microscope toutes les 10 min de 0 à 2h a été réalisée. La mortalité cellulaire sur les LB est négligeable, et sur les HUVEC elle augmente en fonction du temps et de la concentration. Au bout de 2h il ne reste plus que 50% de cellules adhérentes à la plus forte concentration (données non montrées).

Le GM1 est une poudre liposoluble dissoute dans du méthanol à 80 fois la concentration d'utilisation. Les cellules (10^6 dans 1 mL) sont incubées en tube avec le GM1 à 120 µg/mL pendant 1 h à 37°C, en agitant régulièrement le tube.

La PIPLC (0,05 U/µL) est en solution en glycérol, utilisée à raison de 20 µl pour 10^6 cellules dans 300 µL pour 1 h à 37°C, en agitant régulièrement.

Un contrôle dépourvu de l'agent à tester est effectué dans les mêmes conditions. Ces traitements cellulaires sont suivis de marquages en cytométrie en flux pour étudier la variation d'expression des molécules HLA ou de leur capacité à activer le complément.

5. Isolement des microdomaines

5.1 Principe

Le principe de l'isolement des microdomaines ou radeaux lipidiques repose sur la propriété originale de ces composants membranaires à résister à l'action d'un détergent non ionique tel que le Triton X100.

Les détergents sont des molécules amphiphiles constitués d'une tête polaire et d'une chaîne hydrophobe (queue). Cette organisation leur confère la propriété de former spontanément des structures micellaires sphériques en solution aqueuse. Ils solubilisent ainsi les protéines membranaires en se substituant à leur environnement lipidique. L'action du Triton X100 repose sur sa capacité à casser les ponts lipide-lipide tout en conservant l'intégrité de la structure tertiaire des protéines qu'il solubilise. La résistance aux détergents se caractérise par l'impossibilité de solubiliser complètement des fragments de membranes sous forme de micelles et ce quelque soit la concentration de détergent utilisé et la température [79]. C'est le cas des microdomaines. Puis ces fragments membranaires de

faible densité sont isolés à l'aide d'une méthode de fractionnement consistant en une ultracentrifugation en gradient de sucrose.

5.2 Mode opératoire

5.2.1 Préparation des solutions tampon

Le tampon de lyse HEPES (25 mM) contenant NaCl (150 mM), NaF (1 mM), NaVO₄ (1 mM), EGTA (2 mM) à pH 7,4 est préparé, filtré et stocké entre 2 et 8°C.

Le tampon de lyse complet contenant du tampon HEPES (1X) et du Triton X100 à 1% est préparé et stocké entre 2 et 8°C. Au moment de son utilisation, il sera rajouté extemporanément un mélange d'inhibiteurs de protéases et un mélange d'inhibiteurs de phosphatases, dilués à 1/200.

Les solutions de saccharose à 85% (p/p), 30% (p/p) et 15% (p/p) sont préparées à partir de tampon HEPES et de saccharose. La dissolution complète du saccharose dans une fraction du tampon HEPES est effectuée à l'étuve à 37°C en agitant régulièrement pour homogénéiser le mélange. Après dissolution complète, la solution d'HEPES est ajoutée qsp 50 mL, homogénéisée puis refroidie immédiatement dans la glace.

5.2.2 Protocole d'isolement des radeaux lipidiques en gradient de sucrose

Pour les HSkMEC et les HUVEC activées ou non, les étapes suivantes sont réalisées au laboratoire de Biogénèse Membranaire du Dr. Patrick Moreau UMR 5200 CNRS, Université Bordeaux Segalen, Bâtiment A3, INRA Bordeaux Aquitaine BP81, 71 Avenue Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon.

Pour cette expérience, il est nécessaire qu'un grand nombre de cellules soit récupéré. Le protocole a été initialement établi au laboratoire par le Dr. Legembre en 2006 à partir de 100×10^6 Jurkat. Nous avons pu l'adapter à des quantités de cellules plus faibles : 70×10^6 HSkMEC activées ou non, 30×10^6 Boissel. Cependant l'obtention de moins de 20×10^6 d'HUVEC au repos ou activées n'est pas suffisant pour la réalisation des expériences.

Les cellules adhérentes doivent être décollées par 3 mL d'une solution d'EDTA à 10 mM dans du PBS pendant 5 à 10 min à température ambiante. Le décollement des cellules est optimal à l'aide de l'introduction de 7 mL de PBS 1X avec des mouvements de refoulement-réaspiration et des frottements doux de la pipette dans la flasque. Enfin, la suspension cellulaire est introduite dans un tube conique de 50 mL.

La lyse cellulaire s'effectue en différentes étapes. Après une centrifugation de la suspension cellulaire à 1500 rpm (620g) 5 min, le surnageant est éliminé par retournement vif, le culot est lavé 2 fois dans 20 mL de PBS 1X froid pour figer les cellules. Le culot est alors repris dans 0,5 à 1 mL de tampon de lyse complet contenant le Triton X100 selon la densité du culot dans un tube conique de 15 mL. L'incubation dure 30 min dans la glace en agitant régulièrement la suspension par retournement. Après une centrifugation de 10 min à 4°C à 11 000 g, le surnageant est récupéré dans un tube eppendorff propre et conservé à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Le fractionnement des composants des membranes cellulaires nécessite la réalisation d'un gradient de sucrose suivi d'une centrifugation. Pour cela, le lysat cellulaire est repris par 1,2 mL de solution de saccharose à 75% en deux fractions de 600 µL chacune pour permettre une bonne homogénéisation de ce culot très dense. Cette suspension est ensuite introduite dans un tube spécial de 4 mL (ref 75000481, Thermo Fischer Scientific) pour la centrifugeuse et le rotor TH-660. Puis, 1,2 mL de solution de saccharose à 30% sont délicatement déposés suivi du dépôt de 500 µL de solution de saccharose à 5%. Les tubes sont pesés pour les équilibrer au milligramme près en ajoutant de la solution de saccharose à 5%. Enfin, les tubes sont introduits dans les logettes du rotor TH-660 froid puis centrifugés à 39 000 rpm (300 000 g), 16h, à 4°C dans la centrifugeuse TH-660.

Le lendemain, les 7 fractions de 500 µL chacune sont récupérées dans des tubes eppendorff propres de 1 mL et transportées dans la glace. La fraction n°1 correspond à la fraction la plus légère et la n°7 à celle la plus dense (Fig. 5). Les nuages floconneux blancs observés dans les fractions 2 et 3 des Jurkat, 2 à 4 des HSkMEC au repos ou activées, correspondent aux microdomaines. Ils sont situés entre les couches de saccharose à 5% et à 30%. Cependant ils ne sont pas visibles pour les HUVEC activées et non activées.

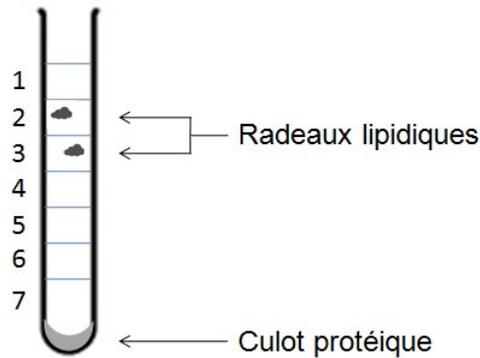


Figure 5 : Schéma des différentes fractions du lysat cellulaire, isolées par ultracentrifugation en gradient de sucrose. Les radeaux lipidiques sont visualisés sous forme de nuages floconneux dans les fractions n° 2 et 3 des Jurkat et n° 2 à 4 des HSkMEC au repos et activées. Ils n'ont pas été visualisés pour les HUVEC au repos et activées. Un culot protéique dense est observé pour toutes les lignées cellulaires sauf pour l'ensemble des HUVEC.

5.2.3 Dosage protéique des fractions par test BCA

Les protéines sont dosées pour chaque fraction membranaire. L'objectif du dosage est de déposer la même quantité de protéines dans chacun des puits du gel.

Le kit de dosage protéique utilisé est celui de Thermo Scientific Pierce BCA. C'est une méthode mise au point en 1985 par Paul Smith [80]. Le principe du dosage repose sur la capacité des protéines à réduire le cuivre cuivrique (Cu(II)) en cuivre cuivreux (Cu(I)) en milieu alcalin. L'acide bicinchonique forme alors un complexe pourpre avec le cuivre cuivreux Cu(I) ayant une absorption maximale à 562 nm. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de BSA dosée à 2 mg/mL. Elle s'étend de 0 µg à 50 µg. L'échantillon à doser est effectué en double à 2 volumes différents 1 µL et 5 µL.

6. Immunoblot

6.1 Principe

L'objectif est de révéler la présence des molécules HLA-I (natives et « dénaturées ») et HLA-II (DR et DQ) dans différentes fractions membranaires de cellules endothéliales activées ou non. Il s'agira de conclure à leur appartenance ou non aux microdomaines de la membrane plasmique. Pour cela les protéines des fractions membranaires sont soumises à

une électrophorèse puis à un transfert sur une membrane de nitrocellulose. Enfin la détection des protéines d'intérêt est réalisée par des anticorps marqués.

La technique est divisée en trois étapes. L'électrophorèse des protéines permet la séparation des protéines, en gel de polyacrylamide, selon leur poids moléculaire en conditions dénaturantes ou non sous l'influence d'un champ électrique. La dénaturation est nécessaire pour casser la structure tridimensionnelle de la protéine (linéarisation), facilitant de ce fait sa migration dans le gel. Les protéines sont toutes chargées négativement à l'aide de l'agent anionique SDS (Sodium Dodécyl-Sulfate) leur permettant de migrer, lors de l'application d'un champ électrique, toutes dans le même sens (de la cathode vers l'anode). En parallèle, un marqueur de poids moléculaire coloré migre aussi permettant d'identifier, à la fin de l'électrophorèse, les protéines d'intérêt.

Puis le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est nécessaire pour rendre accessible les protéines à la fixation par les anticorps révélateurs. Un courant électrique est appliqué pour fixer les protéines sur la membrane (migration de la cathode vers l'anode). Cette fixation est non spécifique. La membrane lie toutes les protéines présentes dans l'échantillon par des interactions hydrophobes ou ioniques. Les sites d'interaction non spécifiques restés libres sont bloqués à l'aide d'un tampon de blocage (i.e. Odyssey Blocking Buffer® dans nos expériences). Les protéines d'intérêt sont révélées à l'aide d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome infrarouge. La membrane est incubée avec des anticorps primaires de souris anti-humains (W6/32, HC10, anti-DR, anti-DQ) puis avec des anticorps secondaires de chèvre anti-murin marqués. L'analyse complète de l'expérience permet d'évaluer la taille des protéines d'intérêt présentes dans chaque fraction protéique et de conclure à leur présence ou leur absence.

Enfin les différences d'expression protéique pour chacun des échantillons ne peuvent pas être appréciées après normalisation de la quantité de protéines déposées avec une quantité de protéine connue (actine, tubuline). En effet, selon une étude de 2003 [67], l'actine n'est pas présente dans les radeaux lipidiques des DC immatures mais présente dans ceux des DC matures. De plus, elle est relocalisée en grande quantité au niveau de la synapse immunologique. De même la tubuline est exclue de ces radeaux lipidiques dans les lymphocytes alors qu'elle est présente dans les neurones [67]. Ainsi, selon les types cellulaires et les conditions d'activation de ces cellules, l'actine et la tubuline sont réparties différemment. C'est pourquoi, ne sachant pas comment ces protéines se comportent à la

surface de nos cellules endothéliales dans nos différentes conditions, nous ne pouvons pas utiliser ces protéines pour normaliser notre expérience.

6.2 Mode opératoire

Le tampon de migration et de transfert est un tampon Laemmli 10X préparé à l'aide de Tris base (0,25 mM) Glycine (1,9 mM) SDS (1%) sous un volume final d'1L, filtré et stocké entre 2 et 8°C.

Le tampon de charge 5X est composé de Tris pH 6,8 (30 mM), Glycérol (60%), SDS (1%), β -mercaptoéthanol (5%) (absent en conditions non-dénaturantes) et de Bleu de Bromophénol (0,025 mM) sous un volume final de 50 μ L et stocké à température ambiante.

L'électrophorèse des protéines est effectuée à l'aide de gels pré-coulés BioRAD (Mini Protean TGX, ref 456-1104). Après installation du gel dans son support dans la cuve d'électrophorèse, la cuve interne est totalement remplie de tampon de migration et la cuve externe l'est jusqu'au trait de niveau. Dans le premier puits, 4 μ L de marqueur de poids moléculaire (PM) sont déposés. Le dépôt des échantillons contenant 2 à 5 μ g de protéines et le tampon de charge 1X est réalisé sous un volume final de 40 μ L dans les puits. Les protéines migrent alors selon leur PM environ 1h à 130V. Lorsque le front de solvant passe sous le niveau du tampon, la migration est arrêtée en éteignant l'appareil.

Le transfert des protéines est effectué en milieu semi-sec Trans-Blot® Turbo BioRAD avec un kit de transfert Trans-Blot® Turbo Transfer System RTA Midi nitrocellulose (Tableau 1.). Pour cela, le gel de concentration est éliminé afin de ne récupérer que le gel de séparation. Le gel est placé dans un « sandwich » comme suit : un jeu de papier buvard, le gel, la membrane de nitrocellulose, un jeu de papier buvard ; le tout est imbibé dans du tampon de transfert. Les bulles d'air contenues dans les différentes couches sont éliminées à l'aide d'un rouleau. Ce « sandwich » ainsi formé est introduit dans une cassette entre une anode et une cathode. Le transfert est réalisé sur l'appareil Trans-Blot® Turbo à l'aide du programme « standard gel manuel 30 min ». A la fin du transfert, la membrane de nitrocellulose est récupérée à l'aide d'une pince et introduite dans une boîte noire Li-COR® adaptée à sa taille.

Le marquage des protéines d'intérêt sur la membrane de nitrocellulose, nécessite l'utilisation d'anticorps monoclonaux non conjugués révélés par des anticorps monoclonaux de souris conjugués à un fluorochrome. Pour cela, la membrane est d'abord rincée avec 10

mL d'une solution de PBS 1X, 10 min, sous agitation. Les sites non spécifiques sont ensuite saturés à l'aide de 10 mL de tampon Odyssey Blocking Buffer® sous agitation à température ambiante. Après cette étape, 3 lavages sont effectués avec 10 mL d'une solution de PBS 1X-Tween 0,05% sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite incubée avec 10 mL d'une solution d'anticorps primaire dosé à 2 µg/mL dans une solution d'Odyssey Blocking Buffer®, 12h entre 2 et 8°C. L'anticorps anti-β-actine est utilisé dilué à 1/4 000 dans 10 mL d'Odyssey Blocking Buffer® pendant 2h à température ambiante sous agitation. Après cette phase d'incubation, la membrane est lavée 3 fois avec 10 mL d'une solution de PBS 1X-Tween 20® 0,05% sous agitation à température ambiante. Une dernière incubation de la membrane est nécessaire pour révéler la présence des protéines d'intérêt avec une solution contenant l'anticorps secondaire IRDye Secondary Antibodies conjugué à un fluorochrome émettant dans l'infrarouge (Tableau 1, LI-COR Biosciences) dilué au 1/10 000 dans le tampon Odyssey Blocking Buffer® pour 1h à température ambiante sous agitation constante et à l'obscurité (dans la boîte noire LI-COR). Avant l'étape de lecture, la membrane est lavée 3 fois avec 10 mL d'une solution de PBS 1X-Tween 0,05% sous agitation à température ambiante à l'obscurité. Puis 2 fois par du PBS 1X de 5 min. Enfin, la révélation du marquage protéique s'effectue à l'aide du révélateur infrarouge Odyssey Fc® Imaging System et du logiciel Image Studio Software 5.0 (LI-COR, Biosciences). L'acquisition dure 10 min.

Résultats

1. Expression relative des molécules HLA-I et HLA-II

1.1 Les lymphocytes B

Les LB sont identifiés en cytométrie en flux par la morphologie de petits lymphocytes et par l'expression du marqueur spécifique CD19 (Fig. 6).

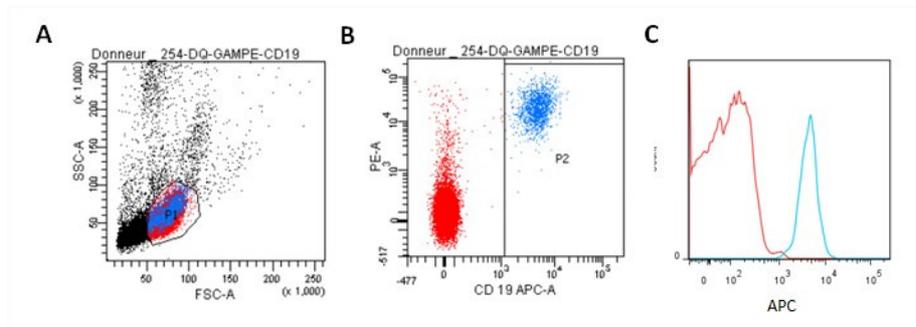


Figure 6 : Analyse en CMF des lymphocytes avec l'exemple des filtres déleucocytants. Panel A : morphologie cellulaire. **Panel B :** double marquage CD19 (marquage APC) et HLA-DQ (marquage indirect PE). Les cellules CD19- (rouge) correspondent principalement aux LT et lymphocytes NK. **Panel C :** LB (CD19+, bleu) et contrôle isotypique (rouge) de la population totale des lymphocytes.

Les LB expriment les molécules HLA (Fig. 7A, 7B, 7C) et les molécules régulatrices du complément, (Fig. 7D, 7E), dans des proportions comparables qu'ils proviennent de poches d'hémochromatose (Fig. 7A, 7D), de filtres déleucocytants (Fig. 7B, 7E) ou de sang total (Fig. 7C). La molécule DR est en moyenne 10 fois plus exprimée que DQ ou DP et possède une densité presque équivalente à celle des molécules HLA-I natives reconnues par le W6/32. Les formes HLA-I dénaturées reconnues par l'anticorps HC10 ne sont pas présentes à la surface des LB. L'expression de CD55 tend à être légèrement plus forte que celle de CD59, et CD46 est faiblement exprimé (Fig. 7D et 7E).

Le grand nombre d'échantillons sanguins analysés (n=50) nous a permis d'étudier les éventuelles différences de niveau d'expression de DR et DQ en fonction du groupage HLA des patients (Fig. 8). En Luminex®, les anticorps anti-DR et anti-DQ reconnaissent tous les

antigènes de leur locus (Fig. 8A et 8B) mais pas ceux des autres loci (résultats non montrés obtenus au laboratoire du CHU de Bordeaux par le Dr. Visentin).

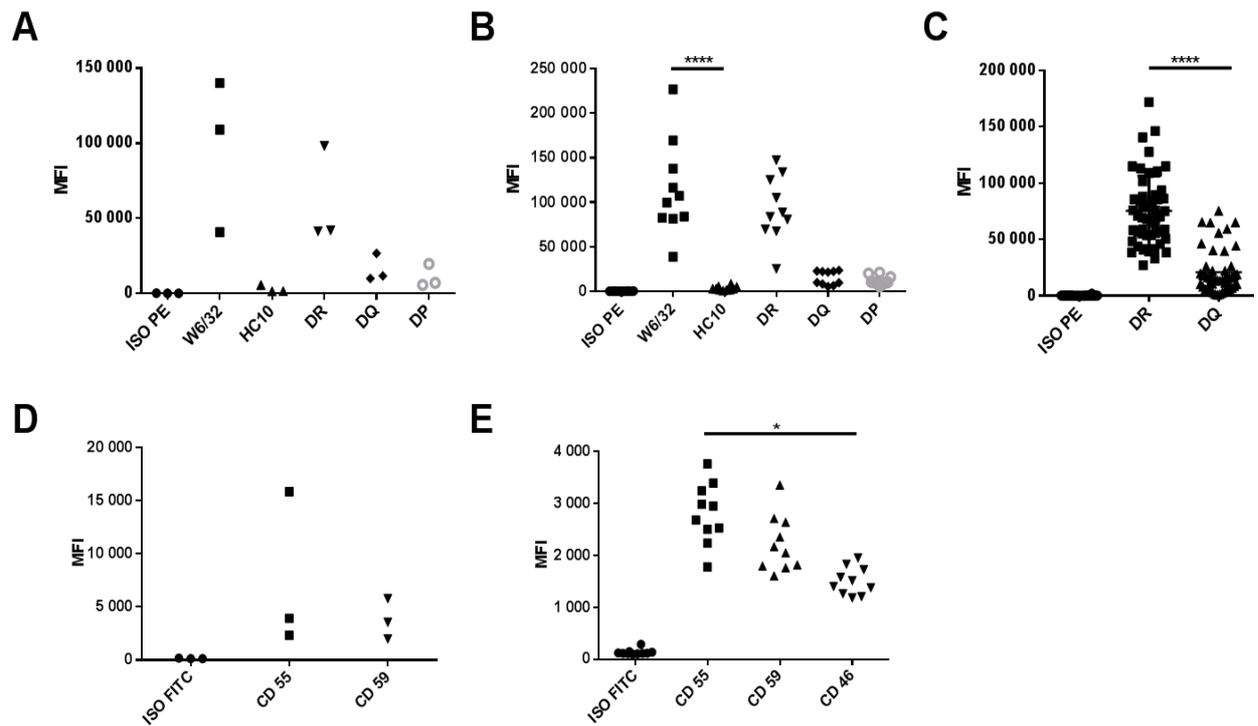


Figure 7 : Expression relative des molécules HLA-I et II et des molécules régulatrices du complément sur les LB en CMF. Expression relative à la surface des LB issus de poches d'hémochromatose (Panels A et D, n=3), filtres déleucocytants (Panels B et E, n=14) ou sang total de patients (Panel C, n=50). Nous avons analysé l'expression des molécules des molécules HLA-I natives (W6/32) et dénaturées (HC-10) et des molécules HLA-II (DR, DQ, +/-DP), et des molécules régulatrices du complément à ancre GPI (CD55, CD59) ou non (CD46) (*= $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$).

Le signal obtenu en Luminex® est proche pour tous les antigènes dans chaque locus (Fig. 8). L'étude de DP n'a pas été faite car le groupage DP est loin d'être systématique.

La présence chez un patient des antigènes DR1 (n=4) ou DR8 (n=4) s'accompagne d'un signal plus faible (Fig. 8C), suggérant une densité membranaire plus faible. Ceci ne dépend pas de l'identité de l'antigène exprimé par le second haplotype, et seuls 2 patients étaient homozygotes pour DR1. Pour DQ, il n'existe pas de différence flagrante de MFI en fonction de l'antigène (DQ4 et DQ9 semblent un peu plus faibles) mais une grande hétérogénéité d'intensité de marquage (Fig. 8D).

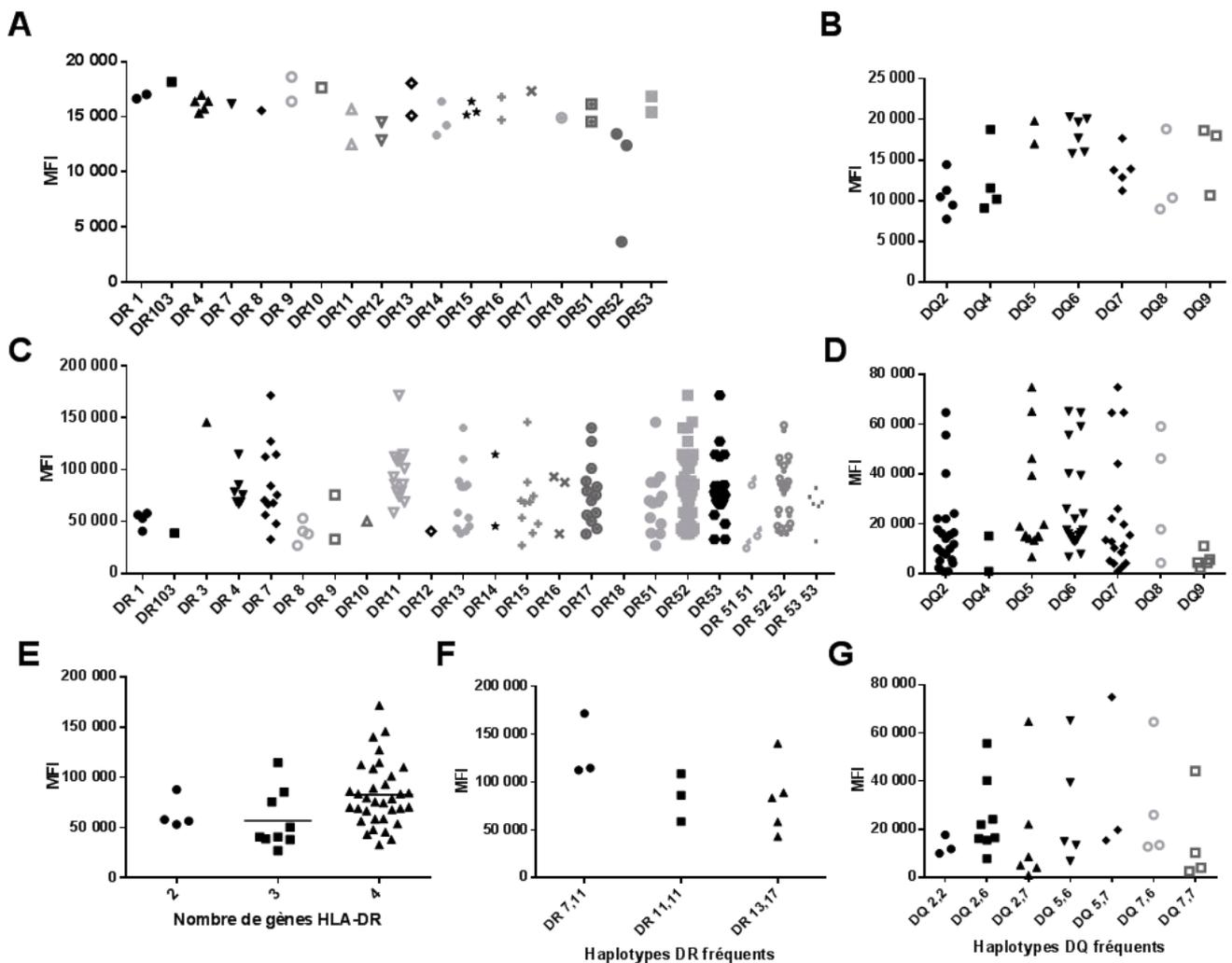


Figure 8 : Expression relative de DR et DQ sur les LB du sang total en CMF. *Panels A et B : profils respectifs de reconnaissance des antigènes DR et DQ par les anticorps monoclonaux utilisés pour les marquages en CMF (le test Luminex® analyse un ou plusieurs variants alléliques de chaque antigène) (n=50). Panels C et D : niveau d'expression par antigène exprimé DR (l'antigène indiqué est présent, le ou les antigènes du second haplotype peut être n'importe lequel des antigènes possibles, et il peut exister un second antigène sur chaque haplotype) et DQ (n=50). Panel E : niveau d'expression en fonction du nombre de gènes DR présents chez les patients (n=50). Panels F et G : comparaison des combinaisons DR (n=11) et DQ (n=33) les plus fréquentes respectivement.*

Les patients peuvent exprimer jusqu'à 2 molécules DR surnuméraires (DR51 et/ou DR52 et/ou DR53) selon les haplotypes DR. Pour rappel, le nombre de gènes codants pour les chaînes β du DR varie de 2 à 4 selon les haplotypes (2 gènes DRB1 et jusqu'à 2 autres gènes (B3, B4 ou B5)). Le nombre de molécules DR exprimé n'a pas d'incidence significative sur le niveau global d'expression des molécules DR. Cependant, une légère tendance à une expression plus élevée est visible en présence de 4 gènes, par rapport aux patients en possédant 2 ou 3 (Fig. 8E). Cette observation ne s'explique pas sur la base de l'intensité des

MFI des molécules surnuméraires DR51/52/53 qui reste homogène à celle des autres DR (Fig. 8C). Les homozygotes DR52 semblent avoir une expression légèrement supérieure aux homozygotes DR51 ou DR53. Certains phénotypes DR et DQ fréquents (Fig. 8F et 8G respectivement) ont pu être étudiés séparément. Les phénotypes DR fréquents sont beaucoup plus exprimés que les phénotypes DQ (~2,5 fois). Parmi les phénotypes DQ fréquents, l'homozygote DQ2, semble donner un signal plus faible.

1.2 Les CE

L'expression des molécules HLA-I et II sur les CE est décrite dans la figure 9.

Les HLuMEC et HKdMEC expriment les molécules HLA-I et DQ au repos. Cependant, elles n'expriment ni DR ni DP, et l'activation ne modifie pas ce résultat (Fig. 9A). Les HUVEC et les HSkMEC non activées n'expriment pas HLA-II, qui apparaît seulement après activation, DR étant plus exprimé que DP et lui-même plus que DQ.

Sur les HUVEC au repos et activées, un marquage par HC10 est observé. Il met en évidence une expression de FHC plus importante sur les cellules activées. Au moins 3 mécanismes peuvent expliquer que le stress cellulaire, représenté par l'activation, entraîne une augmentation du niveau d'expression de FHC. Ce stress cellulaire peut mettre en jeu soit un mécanisme de synthèse plus importante des molécules HLA-I dont certaines seraient des molécules HLA-I « dénaturés », soit un mécanisme de dénaturation plus importante des HLA-I déjà présentes à la surface cellulaire, soit les deux mécanismes à la fois (Fig. 9A). A noter que l'intensité du marquage HC10 n'a pas pu être étudiée sur les HSkMEC compte-tenu de la rupture de stock d'anticorps. Quelle que soit la CE, l'activation ne modifie pas ou peu l'expression des molécules régulatrices du complément. Les HLuMEC et HKdMEC possèdent le même niveau d'expression pour CD55 et CD59. En revanche, les HUVEC et HSkMEC expriment nettement plus de CD59 que de CD55 ou de CD46 (Fig. 9B). A noter que les HUVEC ont l'air d'exprimer 4 à 5 fois plus de molécules régulatrices du complément que les HSkMEC.

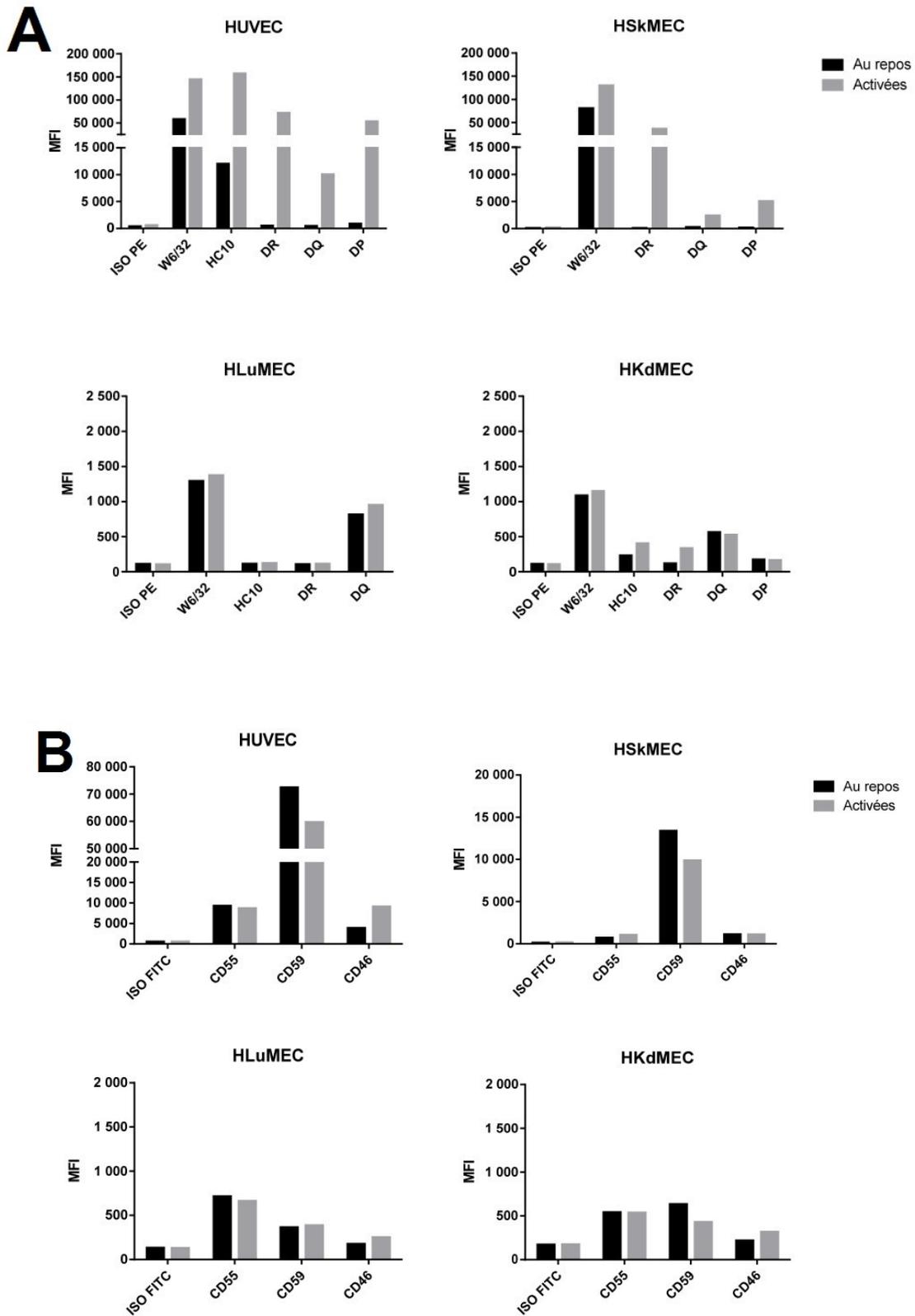


Figure 9 : Expression relative des molécules HLA et des molécules régulatrices du complément, sur les CE activées ou non de différentes origines (HUVEC, HLuMEC, HKdMEC, HSkMEC) en CMF. Panel A : Profil de reconnaissance des antigènes HLA. Panel B : Profil de reconnaissance molécules régulatrices du complément (n=6).

2. Activation du complément par un anticorps anti-HLA

2.1 Effets sur les LB

L'activation du complément par le W6/32 et l'anti-DR, révélée par le marquage C1q, est détectable sur les LB de filtres déleucocytants (n=4). L'intensité du marquage C1q apparaît plus forte pour W6/32 que pour DR (Fig. 11A). En revanche, aucun marquage C1q n'est observé à l'aide des anticorps anti-DQ, -DP, et HC10 (Fig. 10 et 11).

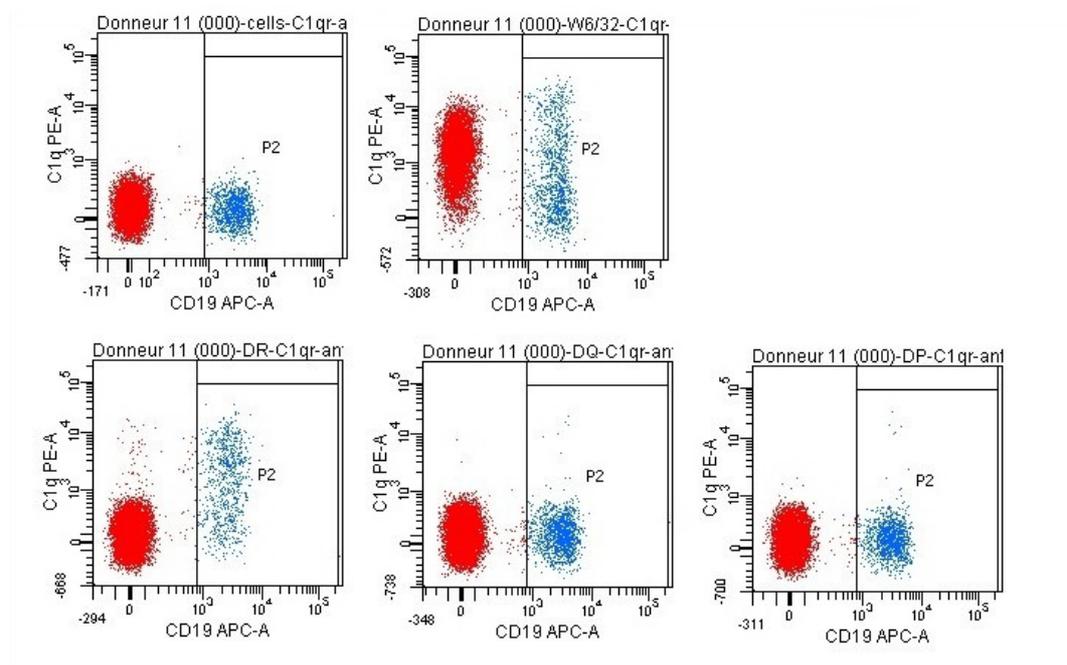


Figure 10 : Marquage C1q sur des LB en CMF. Etude de la fixation du C1q, révélé par le conjugué anti-C1q couplé à la PE sur les LB du donneur n°11 en CMF. En rouge l'ensemble des lymphocytes non CD19+ (LT et NK), en bleu les lymphocytes CD19+ (LB). En haut à gauche représentation de l'isotype et à droite représentation de la fixation du C1q sur les anticorps anti-HLA-I natifs (W6/32) ; en bas de gauche à droite, représentation de la fixation du C1q sur les anticorps anti-HLA-DR, -DQ et -DP.

L'activation du complément révélée par le marquage C3d, à l'aide du W6/32, de l'anti-DR et de l'anti-DP est positive sur les LB. Aucun marquage C3d n'est observé à l'aide des anticorps anti-DQ et HC10 (Fig. 11B). L'intensité du marquage apparaît plus forte pour W6/32 que pour DR et DP.

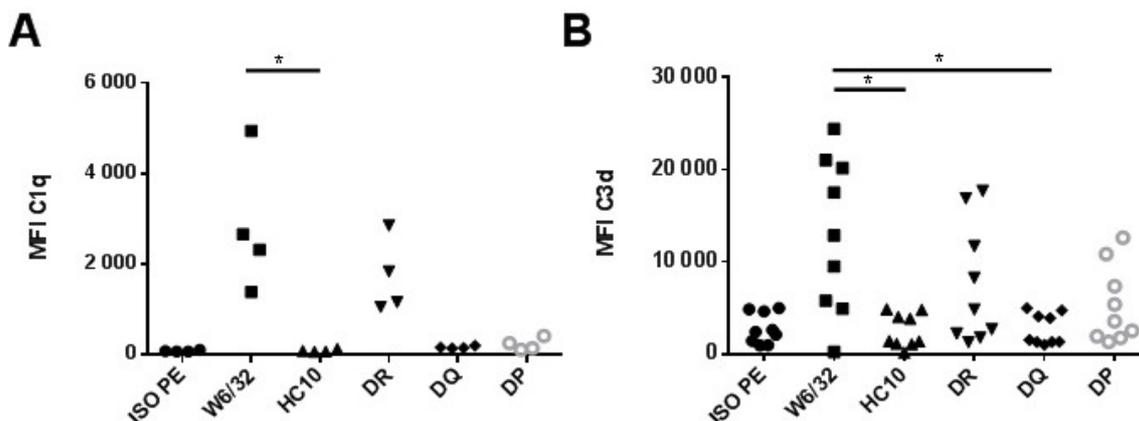


Figure 11 : Activation du complément par les anticorps anti-HLA sur les LB en CMF. Révélation par un anticorps anti-C1q (Panel A, $n=4$), ou anti-C3d (Panel B, $n=9$), sur des LB issus de filtres déleucocytants ($*=p < 0,05$).

2.2 Effets sur les CE

L'activation du complément sur des HUVEC non activées, révélée par le marquage C1q, est observée avec W6/32 seulement. Aucun marquage C1q n'est observé avec les anticorps anti-DR, -DQ, -DP, ni avec HC10. Ceci s'explique par une expression des molécules FHC faible (HC10) voire nulle pour les molécules HLA-II (DR, DQ, DP). En revanche, après activation des HUVEC, le marquage C1q est positif avec les anti-HLA-I ou II (Fig. 12A). De plus, l'intensité du marquage C1q apparaît plus forte pour W6/32 que pour les anticorps anti-DR, -DQ, -DP ou HC10. La tendance est exactement la même pour les HSkMEC aux différences près que l'intensité du marquage est 10 fois plus faible et que la fixation médiée par l'anti-DP n'a pas été étudié pour cette lignée cellulaire (Fig. 12A). En revanche aucun marquage n'est observé pour les HLuMEC et les HKdMEC (Fig. 12A). C'est pourquoi, à ce stade de notre étude, nous décidons de focaliser notre attention uniquement sur les HUVEC et HSkMEC.

L'activation du complément révélée par le marquage C3d, sur des HUVEC et HSkMEC non activées est uniquement positif à l'aide du W6/32, alors que sur les HUVEC et HSkMEC activées il est positif avec les anticorps anti-HLA-I ou II (Fig. 12B). D'une manière générale, le W6/32 donne un marquage beaucoup plus fort que l'anti-DR, -DQ et -DP. De plus, le marquage C3d est plus important que le marquage C1q sur les HUVEC activées mais ce n'est pas le cas pour les HSkMEC activées. Pourtant ces dernières possèdent

moins de molécules régulatrices du complément que les HUVEC activées (Fig. 9B). Le comportement des HUVEC et HSkMEC est donc différent.

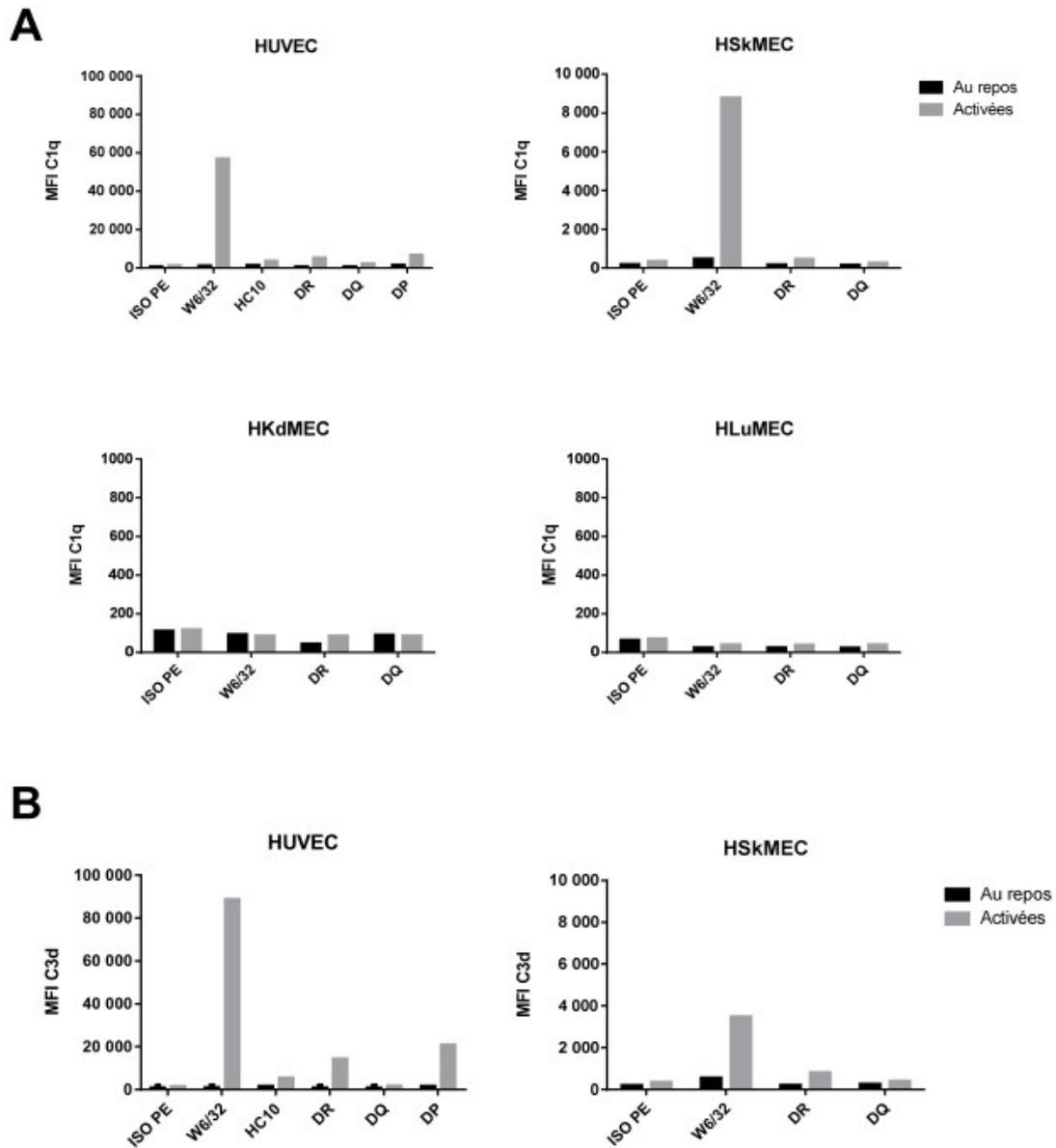


Figure 12 : Activation du complément sur des lignées de CE activées ou non. Révélation par un double marquage en CMF via un anticorps monoclonal anti-C1q biotinylé (Panel A) sur des HUVEC et HSkMEC (n=2) et sur des HLuMEC et HKdMEC (n=1) et un anti-C3d biotinylé (Panel B) sur des HUVEC et HSkMEC au repos ou activées (n=2).

3. Effets des régulateurs membranaires sur l'activation du complément par les anticorps anti-HLA

3.1 Action de la PIPLC et de la MBCyD

3.1.1 Effets sur l'expression par les LB

L'action de la PIPLC seule sur les LB ne modifie pas l'expression des molécules HLA (Fig. 13A) mais diminue fortement la densité membranaire des molécules à ancre GPI (CD55 et CD59) (Fig. 13B). La molécule CD46, molécule transmembranaire donc sans ancre GPI, sert de contrôle négatif et son niveau n'est pas altéré comme attendu.

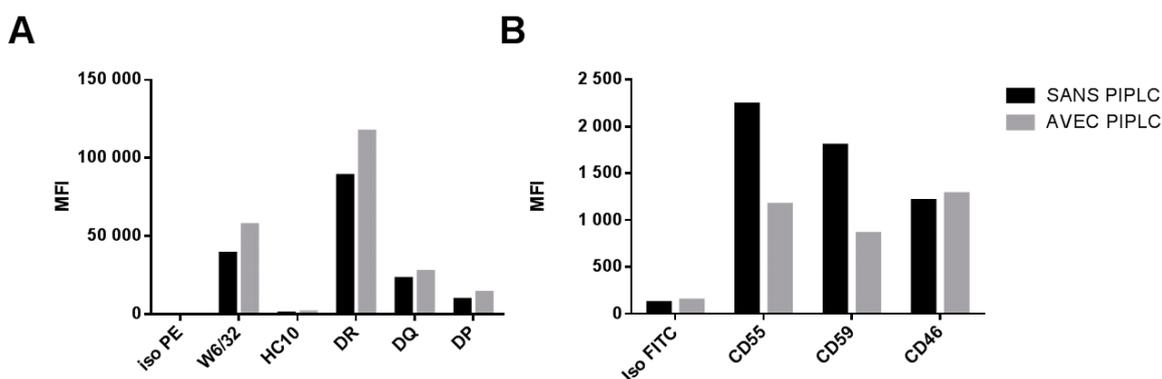


Figure 13 : Action de la PIPLC sur l'expression relative des molécules HLA et des molécules régulatrices du complément sur des LB en CMF. Expression des molécules HLA-I natives (W6/32) et dénaturés (HC10), HLA-II (DR, DQ, DP) (Panel A) et des molécules régulatrices du complément (Panel B), après incubation des LB issus d'un filtre déleucocytant avec ou sans la PIPLC (n=1).

La MBCyD seule à 2, 3 et 4 mM ne modifie pas le niveau d'expression des molécules HLA-I et II, mais diminue le niveau d'expression de CD59 sans influence sur CD46 (données non montrées, réalisées au laboratoire CIRID UMR5164 par moi-même). Cette expérience n'a pas été réalisée pour CD55. L'action combinée de PIPLC et MBCyD ne modifie pas l'expression des molécules HLA (Fig. 14A) mais semble augmenter l'expression de CD55 contrairement à ce que l'on s'attendait. Nous n'observons pas de diminution plus importante de l'expression de CD59 par rapport aux molécules utilisées seules (Fig. 14B). Enfin, CD46

n'est pas détectable dans les deux premières conditions (PIPLC+MBCyD et PIPLC seule) sans que l'on puisse y apporter une explication. L'expérience devra être refaite pour compléter ces résultats.

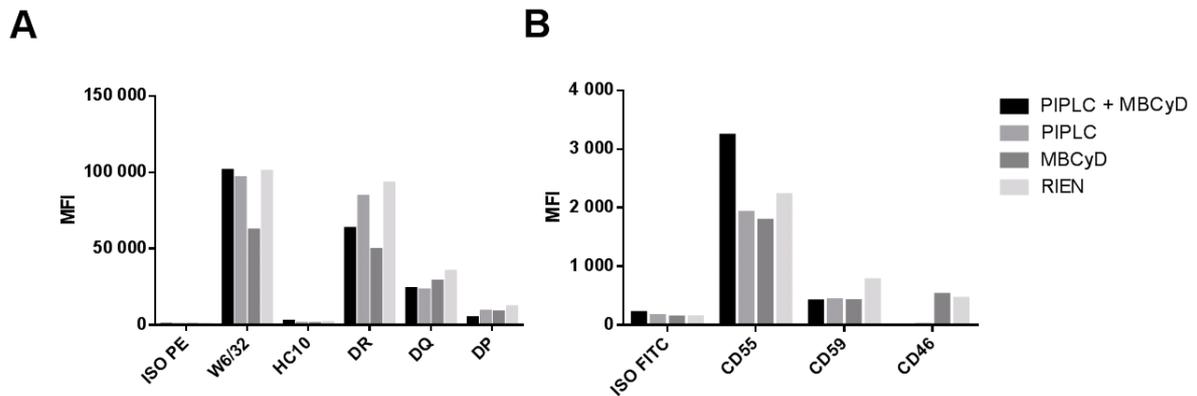


Figure 14 : Expression en CMF des molécules HLA et des molécules régulatrices du complément après incubation des LB issus d'un filtre déleucocytant avec ou sans la PIPLC puis avec ou sans 2 mM de MBCyD 30 minutes à 37°C. Expression des molécules HLA-I natives (W6/32) et dénaturées (HC10), HLA-II (DR, DQ, DP) (Panel A) et des molécules régulatrices du complément (Panel B) (n=1).

3.1.2 Effets sur l'expression par les CE

Sur les lignées de cellules endothéliales, l'effet de la PIPLC est redoutable. Les molécules de CD55 et CD59 sont abaissées de 90% que les cellules soient au repos ou activées (Fig. 15). A noter que sur les HUVEC et HSkMEC activées, le niveau d'expression de CD59 apparaît plus faible que sur les cellules au repos (Fig. 9B et 15B). L'expression de CD46 reste quant à elle inchangée (Fig. 15) comme on s'y attendait. L'expression des molécules HLA sur ces deux lignées de cellules endothéliales en présence ou non de PIPLC n'a pas été étudiée compte-tenu des résultats (inchangés) observés sur les LB.

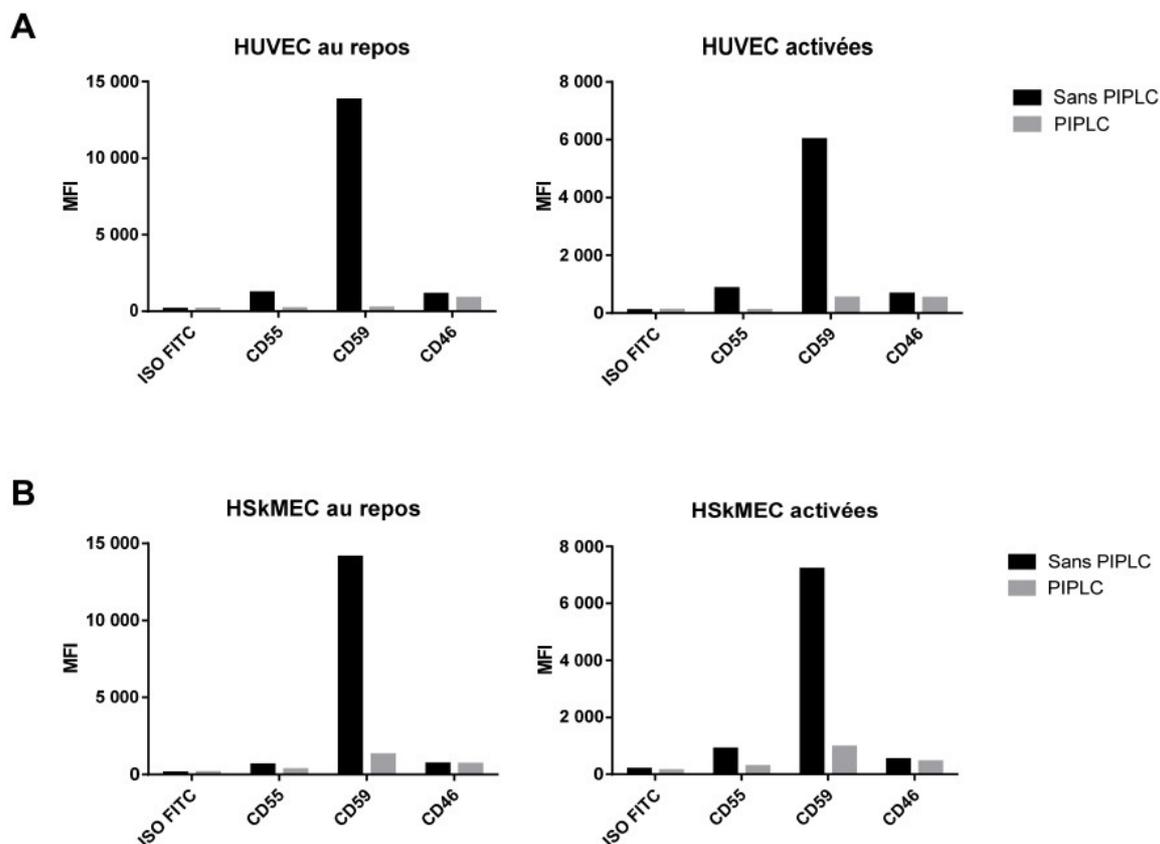


Figure 15 : Expression en CMF des molécules régulatrices du complément après incubation des HUVEC et des HSkMEC avec ou sans la PIPLC. Expression relative des molécules régulatrices du complément sur les HUVEC au repos et activées (Panel A) et sur les HSkMEC au repos et activées (Panel B) (n=1).

3.1.3 Effets sur l'activation du complément par les LB

La PIPLC et la MBCyD utilisées seules sur les LB ne modifient pas le marquage C3d et donc n'ont pas d'impact sur l'activation du complément. Cependant, l'action combinée de la PIPLC et de la MBCyD augmente fortement le marquage C3d médié par le W6/32 et réduit celui de l'anti-DR sur les LB (Fig. 16), sans que l'on puisse y apporter une explication.

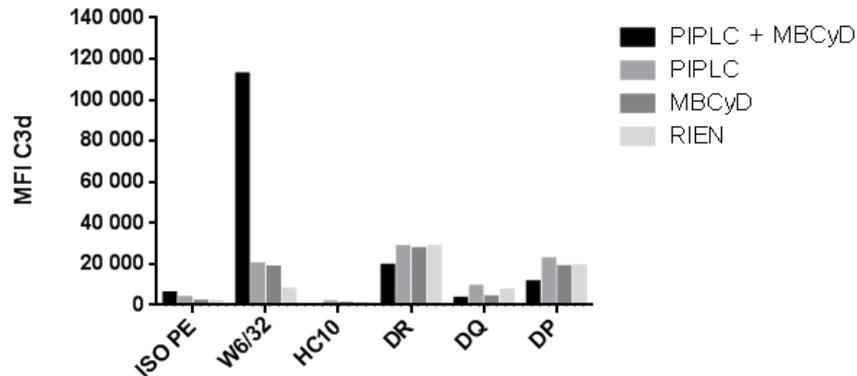


Figure 16 : Capacité d'activation du complément, en CMF, des anticorps anti-HLA après incubation des LB issus d'un filtre déleucocytant avec ou sans la PIPLC puis avec ou sans 2 mM de MBCyD 30 minutes à 37°C. Capacité d'activation du complément, en CMF, des molécules HLA-I natives (W6/32) et dénaturées (HC10) et HLA-II (DR, DQ, DP), révélée par un anticorps anti-C3d biotinylé (n=1).

3.1.4 Effets sur l'activation du complément par les CE

a. Action de la MBCyD

Sur les HUVEC au repos, quelle que soit la concentration de MBCyD (1 ou 2 mM), nous n'observons pas d'activation du complément par le W6/32 ou l'anti-DR, en marquage C1q ou C3d (Fig. 17A et 17C), à la différence des HUVEC activées pour lesquelles les marquages C1q et C3d sont positifs pour le W6/32 et l'anti-DR (Fig. 17B et 17D). L'intensité du marquage C1q semble un peu plus forte pour W6/32 que pour l'anti-DR. A l'inverse, le marquage C3d, pour 2 mM de MBCyD, apparaît beaucoup plus fort pour l'anti-DR que pour le W6/32 (Fig. 17, n=1).

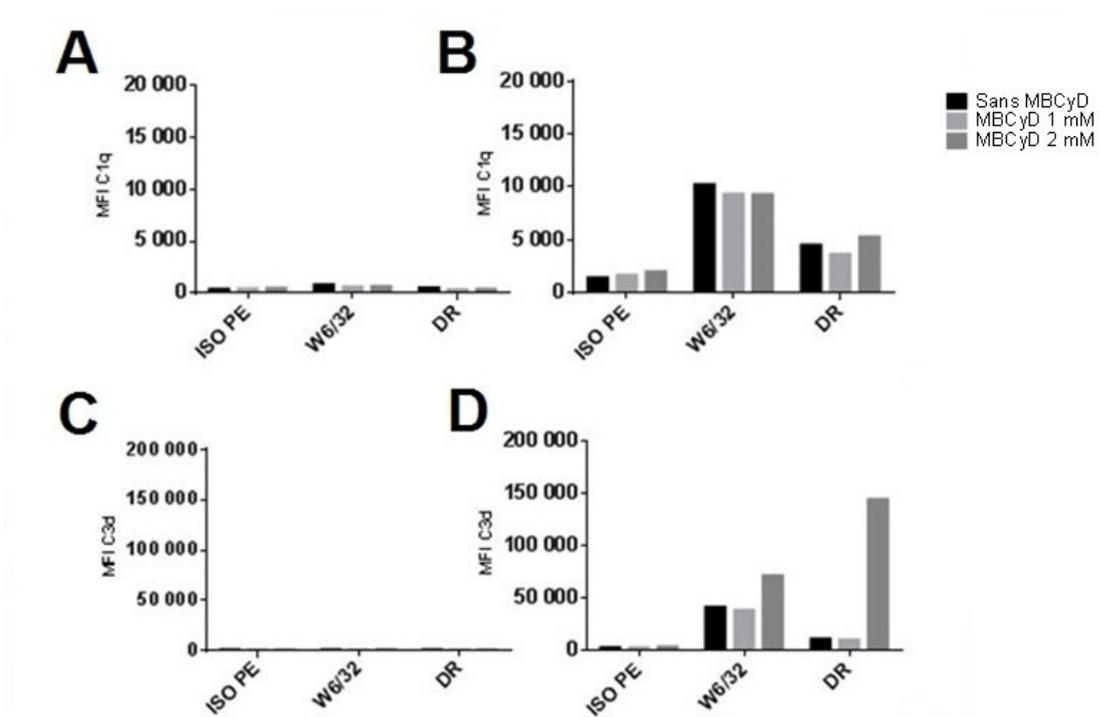


Figure 17 : Activation du complément, en CMF, médiée par des anticorps anti-HLA sur des HUVEC au repos et activées. Activation du complément médiée par des anticorps anti-HLA-I et anti-DR révélée par un anti-C1q (Panel A et B) ou un anti-C3d (Panel C et D) sur des HUVEC au repos (Panels A et C) et activées (Panels B et D) en présence ou non de MBCyD 1 ou 2 mM (n=1).

b. Action de la PIPLC

Sur les HUVEC au repos aucun marquage C1q n'est révélé par le W6/32 (Fig. 18) confirmant le résultat observé figure 12. Ainsi nous n'observons aucun changement en présence ou non de PIPLC.

Le rôle de la PIPLC est mis en évidence en comparant les intensités de marquage des dépôts de C1q et de C3d. D'une part, l'action de la PIPLC se manifeste tardivement dans la cascade d'activation du complément. Elle inhibe l'action des molécules régulatrices du complément CD55 et CD59. Elle ne doit donc avoir aucun impact sur la fixation du C1q sur les anticorps anti-HLA. Sur les HSkMEC au repos, le marquage C1q sur W6/32 est stable en présence ou non de PIPLC, conformément au résultat attendu (Fig. 16B). En revanche, sur les HSkMEC activées cette intensité de marquage du C1q médiée par le W6/32 apparaît légèrement plus importante en présence de PIPLC sans que nous puissions y apporter une explication (Fig. 18B). Ce résultat est à pondérer avec celui observé figure 12 pour laquelle le marquage C1q sur les HSkMEC activées atteignait une MFI à 9000.

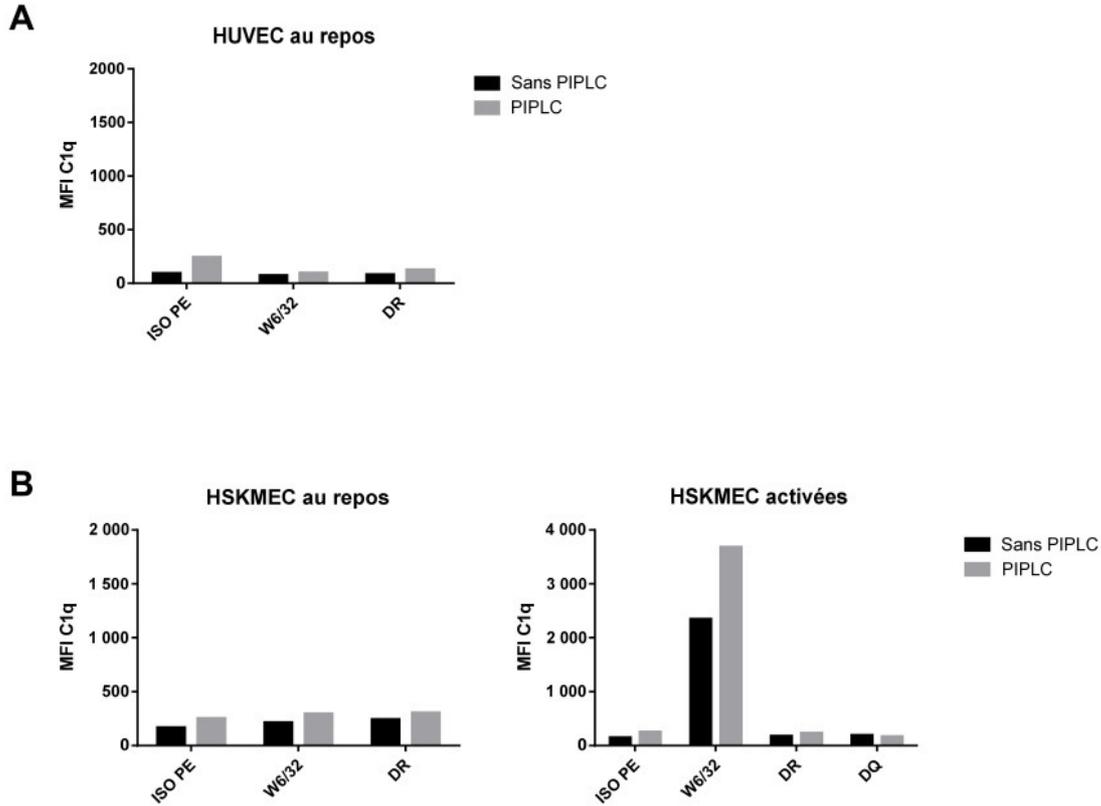


Figure 18 : Effet de la PIPLC sur l'activation du complément par les HUVEC et HSkMEC révélé par le marquage C1q en CMF. Révélation de l'activité du complément par marquage C1q à l'aide d'un anti-C1q biotinylé sur HUVEC au repos (Panel A), et HSkMEC au repos et activées (Panel B) avec ou sans PIPLC (1 U pour 600 000 cellules) en présence de W6/32, DR et DQ quand cela a été possible (n=1).

L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, c'est pourquoi d'autres expériences devront être initiées pour conclure à la significativité statistique ou non de cette tendance. D'autre part, la destruction du CD55 favorise le dépôt de C3b. Pour rappel, le CD55 inhibe la formation des C3 et C5 convertase. Le facteur I et des protéases contenus dans le sérum utilisé pour nos expériences, et aidés du CD46, non éliminé des membranes cellulaires par la PIPLC, dégradent successivement le C3b en iC3b, C3dg puis C3d. Ainsi, l'augmentation du dépôt de C3b s'accompagne d'une augmentation du dépôt de C3d. Pour conclure, l'effet de la PIPLC doit se manifester par une augmentation de l'intensité de marquage du C3d.

Sur les HUVEC activées, la tendance observée correspond à celle attendue, c'est-à-dire celle d'une augmentation de la fixation de C3d sur W6/32 et sur DR en présence de PIPLC (Fig. 19A). Cette tendance pourrait confirmer le rôle des inhibiteurs du complément à ancre GPI en révélant le potentiel des anti-HLA à activer le complément. Pourtant, les résultats observés sur les HUVEC au repos ne concluent pas en ce sens. Il n'existe aucun

marquage C3d sur W6/32 (Fig 19A et 12B) sur les HUVEC au repos en présence ou non de PIPLC alors que le niveau d'expression des molécules HLA-I est très élevé (Fig. 9A, W6/32 MFI~50 000).

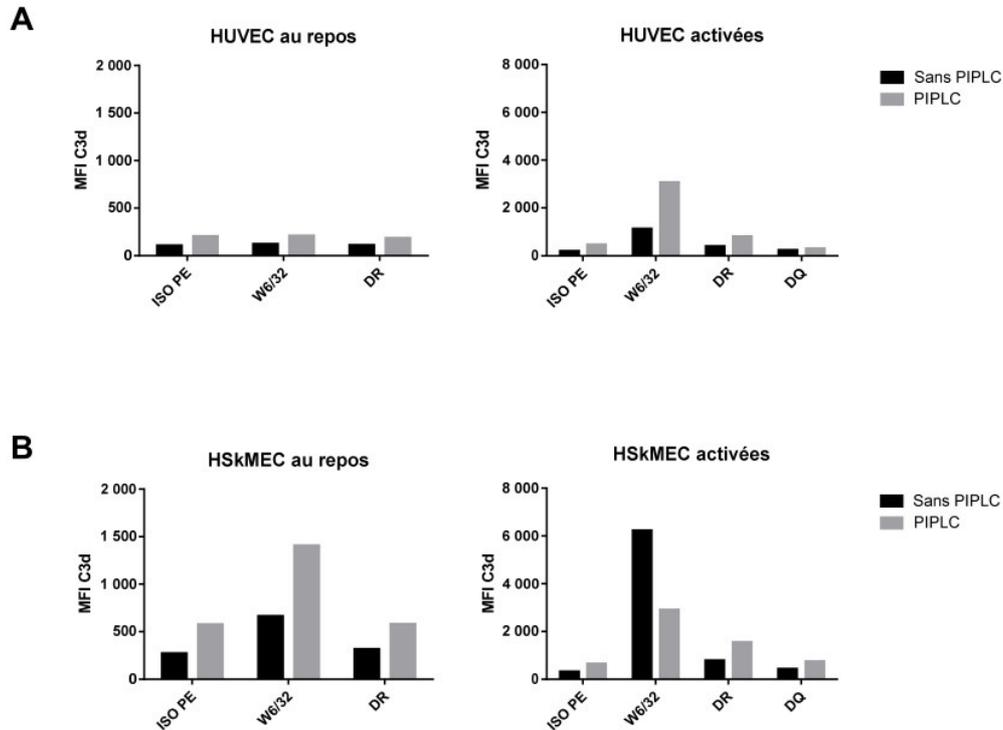


Figure 19 : Effets de la PIPLC sur l'activation du complément sur les HUVEC et HSkMEC révélé par le marquage C3d. Révélation de l'activité du complément par marquage C3d à l'aide d'un anti-C3d biotinylé sur HUVEC au repos et activées (Panel A), et HSkMEC au repos et activées (Panel B) avec ou sans PIPLC (1 U pour 600 000 cellules) en présence de W6/32, DR et DQ quand cela a été possible (n=1).

L'action des inhibiteurs à ancre GPI du complément pourrait aussi être confirmée par les résultats observés sur les HSkMEC. En effet, l'augmentation de la fixation de C3d médié par W6/32 sur les HSkMEC au repos et médié par DR sur les HSkMEC activées est observée en présence de PIPLC (Fig. 19B). Malgré tout, des résultats discordants sont, comme pour les HUVEC mis en évidence. Sur les HSkMEC activées, une diminution de l'intensité de marquage lié au dépôt de C3d sur W6/32 en présence de PIPLC est observée. Ce résultat inattendu peut peut-être s'expliquer par un phénomène de compétition entre la fixation de C1q, très intense (Fig. 18B) et celle du C3d sur W6/32 sur les HSkMEC activées. La significativité statistique des observations devra être confirmée par de nouvelles expériences dans les mêmes conditions.

A noter que sur les HSkMEC activées, une intensité plus importante du marquage C3d est observée par rapport aux HSKMEC au repos (Fig. 19B, MFI = 6000 vs 700 respectivement) à l'aide du W6/32, confirmant les résultats de la figure 12B. L'absence de marquage C3d sur DR s'explique par l'absence d'expression de DR sur les HUVEC au repos (Fig. 9A).

3.2 Action du GM1

Nous n'observons aucune modification du niveau d'expression des molécules HLA-I et II ou à ancre GPI sur les HUVEC et HSkMEC activées ou au repos après action du GM1 1h à 37°C à la dose de 120 µg/mL (Fig. 20).

L'activation de la voie classique du complément révélée par le marquage C1q ou C3d sur les HUVEC au repos est inchangée en présence ou en absence de GM1 (Fig. 21).

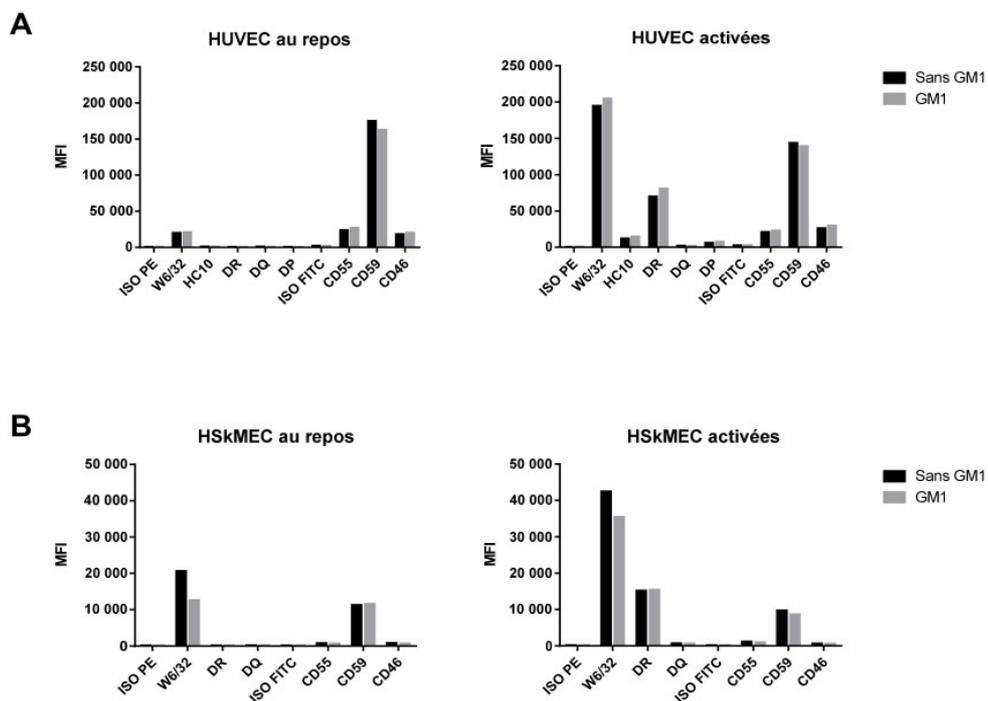


Figure 20 : Expression en CMF des molécules HLA et régulatrices du complément après incubation de CE au repos ou activées avec ou sans GM1. Expression en CMF des molécules HLA-I, HLA-II et régulatrices du complément après incubation d'HUVEC au repos ou activées (Panels A) et HSkMEC au repos ou activées (Panels B), 1h à 37°C sans ou avec 120 µg/ml de GM1 (n=1).

Sur les HUVEC activées, l'activation de la voie classique du complément révélée par le marquage C3d est augmentée en présence de GM1 quand elle est médiée par le W6/32 ou le DR (Fig. 21B). En revanche en présence de DQ, aucune activation du complément n'est révélée par le marquage C3d dans les deux conditions (Fig. 21B).

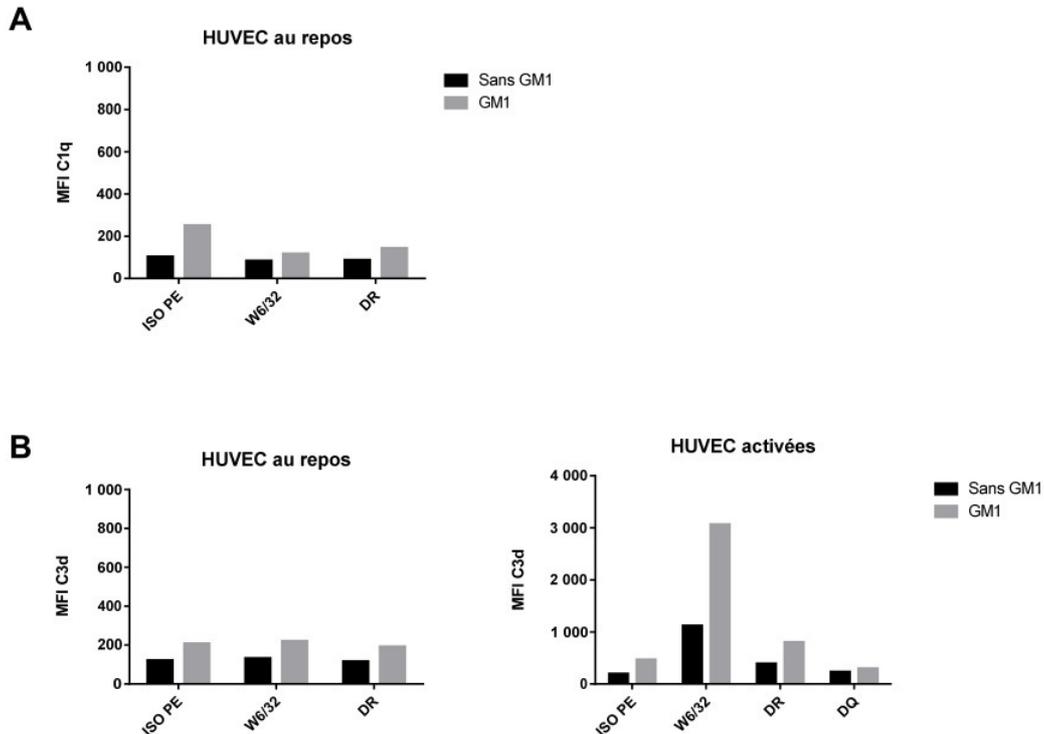


Figure 21 : Effet du GM1 sur l'activation du complément sur les HUVEC révélé par des marquages C1q et C3d. Révélation de l'activité du complément par marquage C1q à l'aide d'un anti-C1q biotinylé sur HUVEC au repos (Panel A), et par marquage C3d à l'aide d'un anti-C3d biotinylé sur HUVEC au repos et activées (Panel B) et ce en présence de W6/32, DR et DQ quand cela a été possible (n=1).

Un autre type cellulaire a été étudié, les HSkMEC, afin de conforter nos observations. Comme pour les HUVEC au repos, l'activation de la voie classique du complément révélée par le marquage C1q ou C3d sur les HSkMEC au repos est inchangée en présence ou en absence de GM1 (Fig. 22). De même, sur les HSkMEC activées, à la différence des HUVEC activées, nous n'avons pas l'impression d'observer de différence significative de l'intensité de marquage lié au dépôt de C1q et de C3d en présence ou non de GM1 (Fig. 22).

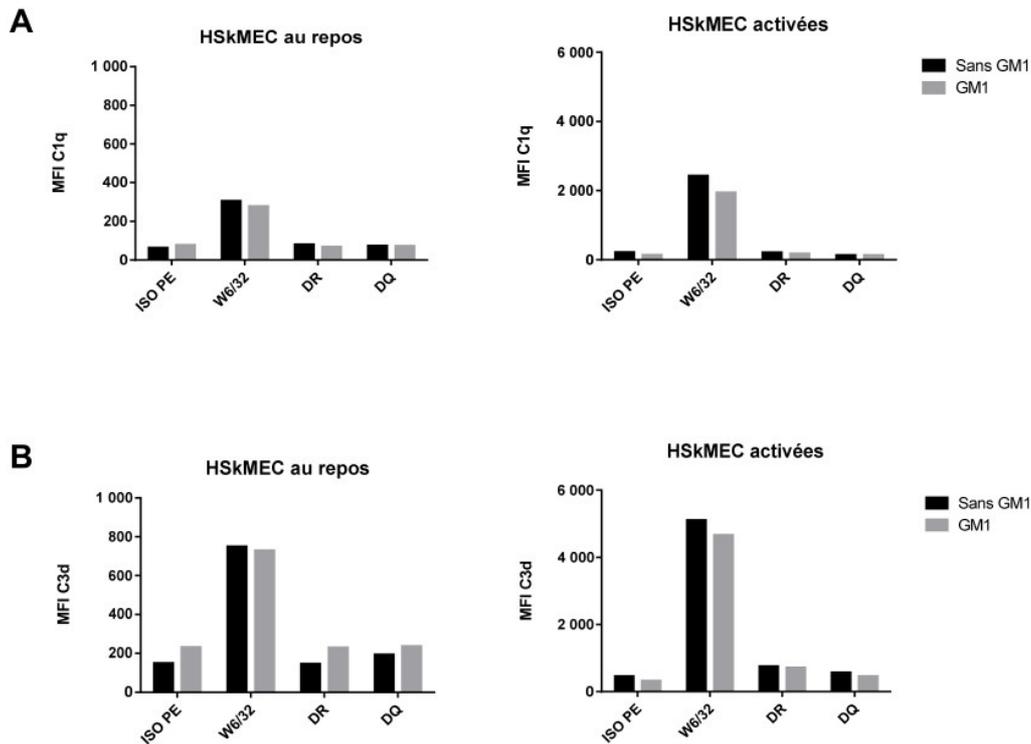


Figure 22 : Effet du GM1 sur l'activation du complément sur les HSkMEC, révélé par un marquage C1q. Révélation de l'activité du complément par marquage C1q à l'aide d'un anti-C1q biotinylé sur HSkMEC au repos et activées (Panel A), et par marquage C3d à l'aide d'un anti-C3d biotinylé sur HSkMEC au repos et activées (Panel B) et ce en présence de W6/32, DR et DQ (n=1).

4. Association des molécules HLA aux microdomaines

4.1 Mise au point

Avant de pouvoir conclure quant à la présence ou absence des molécules HLA-I (FHC) et II (DR) dans les différentes fractions membranaires des lysats cellulaires de cellules endothéliales, il a fallu procéder à de nombreuses mises au point techniques. Le protocole a été testé sur des lignées cellulaires capables à la fois de proliférer très rapidement mais aussi de s'activer (e.g. Jurkat). L'objectif est de conclure à la faisabilité de l'expérience et à la possibilité d'utiliser des anticorps anti-FHC (HC10) et anti-DR (DR A6.147) en immunoblot.

La molécule FHC est une chaîne protéique d'environ 45 KDa reconnue par l'anticorps HC10. La molécule DR intègre est un hétérodimère $\alpha\beta$ de 55 KDa. L'anticorps DR A6.147 reconnaît un épitope de la chaîne α . Il peut ainsi reconnaître à la fois l'hétérodimère $\alpha\beta$ (55

KDa) et le monomère α (35 KDa). Ce monomère α est le résultat du clivage de l'hétérodimère $\alpha\beta$ pouvant survenir lors de la dénaturation liée à l'expérience. La répartition entre l'hétérodimère $\alpha\beta$ et le monomère α est hétérogène selon les types cellulaires et selon les fractions isolées en gradient de sucrose. L'explication avancée est celle d'une association plus ou moins labile des 2 chaînes en fonction du type cellulaire (DR différents) l'exprimant et/ou de leur localisation cellulaire.

Dans un premier temps, l'étude de la présence de molécules FHC et DR a été réalisée sur les lysats cellulaires de plusieurs lignées :

- Des LB : lignée « Boissel »
- Des LT activés et non-activés : Jurkat, JRT3. L'activation des Jurkat et des JRT3 a été réalisée en plaque 96 puits avec de l'OKT3 (anti-CD3). L'activation cellulaire a été contrôlée en CMF par la positivité du marquage CD69. En revanche ces Jurkat activées n'expriment ni DR ni DQ. Un autre protocole de stimulation a été employé afin de promouvoir l'expression des molécules HLA-II sur les Jurkat. Elles sont activées par 25 ng/mL de PMA pour *Phorbol Myristate Acetate* et 1 μ g/mL de ionomycine pendant 6h. Le PMA est un petit composant organique qui diffuse à travers la membrane plasmique vers le cytoplasme et active directement la phosphokinase C (PKC) sans passer par la stimulation du récepteur membranaire (TCR). La ionomycine est administrée de manière conjointe. Il s'agit d'un ionophore calcique utilisé pour augmenter le relargage de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique, une étape nécessaire à l'activation du facteur de transcription NFAT. L'ensemble de ces 2 composants active le LT en évitant la stimulation du TCR. A 0, 6 ou 24h aucune expression des molécules HLA-II n'est observée (données non montrées réalisées au laboratoire CIRID UMR 5164 par moi-même).
- Des cellules exprimant ou non du HLA-I (B35) : K562 et K562-B35.

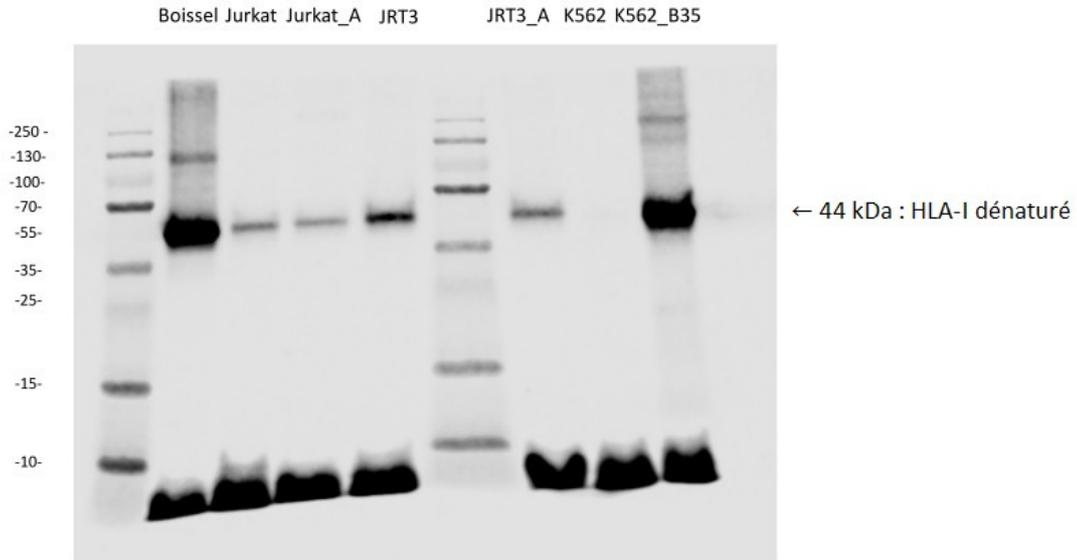
Les résultats sont présentés figure 23. Comme attendu, toutes les lignées cellulaires expriment des molécules FHC hormis les K562. En effet, d'une manière générale, l'ensemble des cellules eucaryotes expriment du HLA-I et donc possèdent à leur surface des FHC. Seules les cellules blastiques K562 sont connues pour être dépourvues de molécules HLA-I et donc dépourvues de FHC dans notre exemple. A noter que les « Boissel » possèdent un niveau d'expression de FHC bien supérieur aux lignées cellulaires T. Ceci

semble normal puisque les LB expriment beaucoup plus de HLA-I que les LT. A contrario, l'expression du DR est limitée aux « Boissel » puisque le HLA-II ne s'exprime que sur quelques types cellulaires et notamment la lignée B. Cette première étape nous a permis de valider l'utilisation du protocole et des anticorps HC10 et DR A6.147 en immunoblot.

Dans un deuxième temps, la lignée cellulaire Jurkat, a été choisie pour une étude plus complète comme le seront ultérieurement les cellules endothéliales (HskMEC et HUVEC). Ainsi $100 \cdot 10^6$ Jurkat ont été collectées à partir de la culture. Les fractions de lysats cellulaires obtenues par ultracentrifugation en gradient de sucrose ont été recueillies puis la présence de FHC et de DR a été étudiée sur 10 μ g de chaque fraction en immunoblot. Les résultats sont présentés figure 24. Comme attendu, les Jurkat au repos n'expriment que du HLA-I, et notamment des FHC révélées à l'aide d'anticorps HC10. Ces FHC sont essentiellement présentes dans les fractions 2, 3 et 4, représentant ici les fractions contenant les radeaux lipidiques, les fractions 5, 6, 7 correspondant aux compartiments intracellulaires plus denses (endosomes, lysosomes, mitochondrie, réticulum endoplasmique).

Cette révélation sur gel est semi-quantitative car l'intensité des bandes nous donne une idée de la quantité de protéines contenues dans chacune des fractions. Le signal est moins intense pour les fractions n°1 et n°3. Habituellement, l'utilisation d'un anticorps anti- β -actine lors de la révélation permet de vérifier la normalisation du dépôt de protéines pour chaque fraction. Or, dans la littérature, selon les types cellulaires et les conditions d'activation de ces cellules, l'actine et la tubuline sont réparties différemment dans les compartiments cellulaires [67]. C'est pourquoi dans nos expériences, la révélation de la présence de β -actine est hétérogène selon les fractions de sucrose étudiées. Ainsi nous ne pouvons conclure que sous un aspect qualitatif c'est-à-dire présence ou absence de la bande d'intérêt.

HC10



DR A6.147

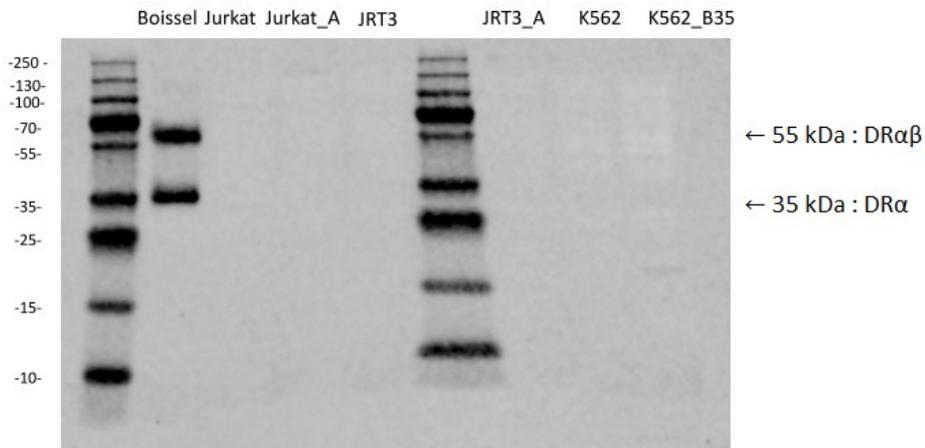
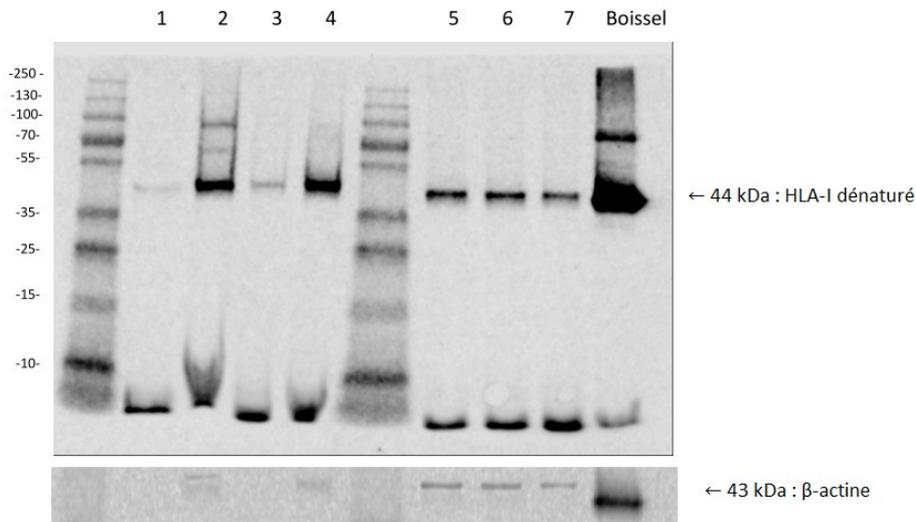


Figure 23 : Expression de FHC et DR sur des lysats de lignées cellulaires en immunoblot. Expression de FHC (en haut) et de DR (en bas) à l'aide des anticorps HC10 et DR A6.147 respectivement sur 10 μ g de protéines issues de lysats de lignées cellulaires : Boissel, Jurkat (Jurkat non activées), Jurkat_A (Jurkat activées), JRT3 (JRT3 non activées), JRT3_A (JRT3 activées), K562, K562-B35 (K562 exprimant une molécule HLA-I : B35).

HC10

Jurkat au repos



DR A6.147

Jurkat au repos

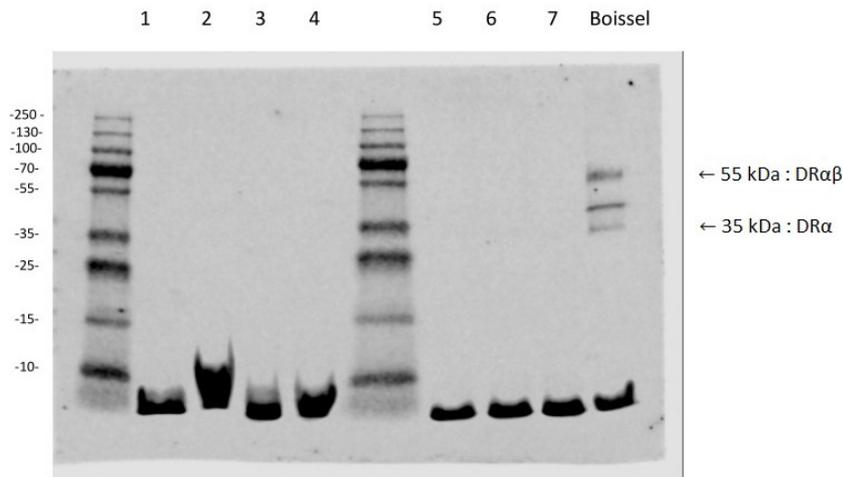


Figure 24 : Expression FHC et DR sur les fractions membranaires isolées à partir de l'ultracentrifugation en gradient de sucrose de lysat de Jurkat au repos. Expression de FHC (en haut) et de DR (en bas) à l'aide des anticorps HC10 et DR A6.147 respectivement, en immunoblot, sur 10 µg de protéines issues de 7 fractions membranaires obtenues après ultracentrifugation en gradient de sucrose de lysats de Jurkat par le Triton X100. Les radeaux lipidiques sont contenus dans les fractions 2, 3 et 4. La révélation avec un anticorps anti-β-actine confirme que sa localisation varie dans les différents compartiments cellulaires. A priori sur les Jurkat au repos, elle n'est pas contenue dans les radeaux lipidiques. Ainsi nous ne pouvons pas conclure sur l'homogénéité de dépôt de protéines dans chacune des fractions, il est ainsi difficile de se faire une idée de la quantité de protéines sur le plan quantitatif, seul l'aspect qualitatif est intéressant.

4.2 Etude des HSkMEC

Un avantage non négligeable des HSkMEC par rapport aux HUVEC est qu'elles prolifèrent beaucoup plus vite. Ainsi il est possible d'en obtenir des quantités suffisantes pour l'analyse en gradient de sucrose en temps raisonnable (2 semaines). L'étude de la présence de FHC et de DR est réalisée dans les différentes fractions membranaires isolées à partir de 70×10^6 HSkMEC au repos et activées à passage 50.

Comme dans les expériences précédentes, le lysat de 30×10^6 « Boissel » sert de contrôle positif pour la présence de molécules HLA-I et -II. Les HSkMEC au repos comme activées expriment des molécules FHC (Fig. 25). La présence de DR, objectivée par la révélation de la chaîne α du DR par l'anticorps DR A6.147, n'est observée que pour les HSkMEC activées (Fig. 26). Seul le monomère α du DR est visible, l'hétérodimère $\alpha\beta$ n'est pas identifiable. Les HSkMEC au repos n'expriment pas de HLA-II, comme observé en CMF. DR semble préférentiellement associé aux fractions 2 à 4, c'est-à-dire celles contenant les radeaux lipidiques (Fig. 26). Les immunoblots anti-HLA-I et anti-HLA-II ayant été réalisés à partir des mêmes fractions de centrifugation, nos résultats indiquent clairement des différences de répartition des molécules HLA sur ces cellules.

4.1 Etude des HUVEC

Pour HUVEC au repos, l'expression de FHC est identifiable malgré la présence de bandes faibles dans les différentes fractions (Fig. 27). L'expression de DR quant à elle, n'est pas observée. La présence de DR dans le lysat cellulaire de « Boissel » nous prouve que l'immunoblot est interprétable (Fig. 28).

A la différence des HSkMEC, trop peu d'HUVEC activées ont été obtenues. L'absence de protéines détectables dans les fractions correspondant aux radeaux lipidiques (fractions n°1 à 4) rend inexploitable l'étude de la présence de FHC et de DR dans les HUVEC activées (Fig. 28).

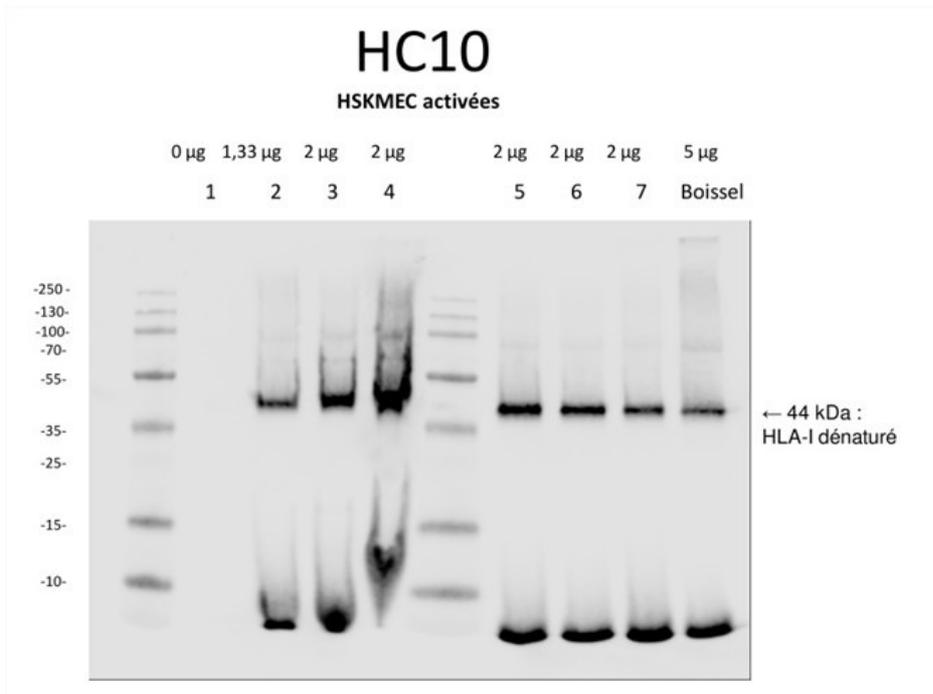
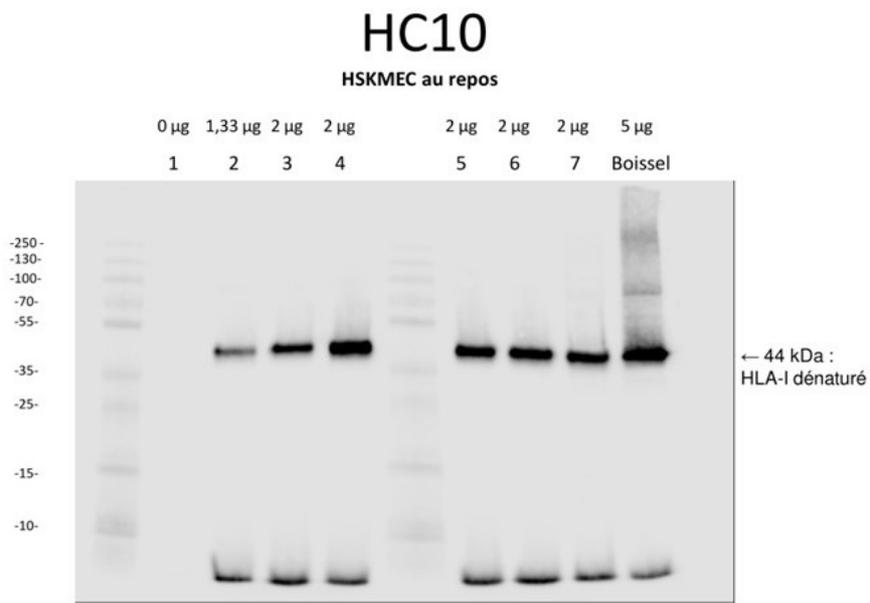


Figure 25 : Présence de FHC dans les lysats de HSkMEC activées ou non. *Etude des différentes fractions membranaires des HSkMEC en immunoblot obtenues après lyse et ultracentrifugation des cellules en gradient de sucrose. Les fractions 2, 3 et 4 contiennent les radeaux lipidiques. Présence de FHC reconnu par l'anticorps HC10 sur les HSkMEC activées ou non. La fraction n°1 contient une quantité insuffisante de protéines pour être détectables dans le test BCA.*

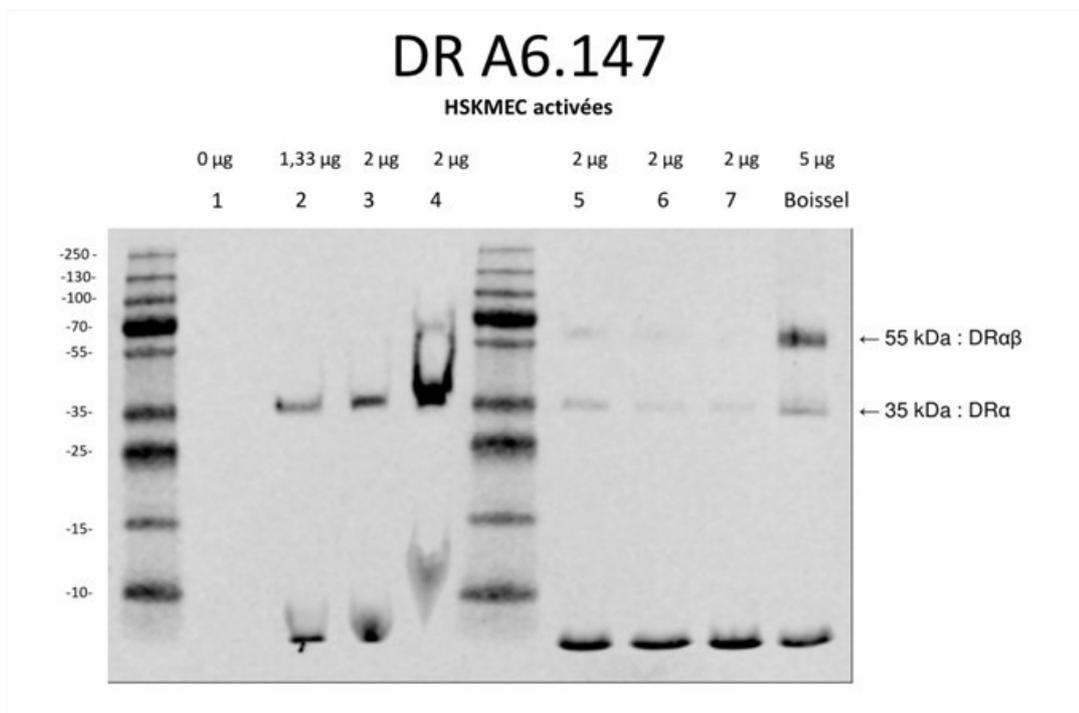
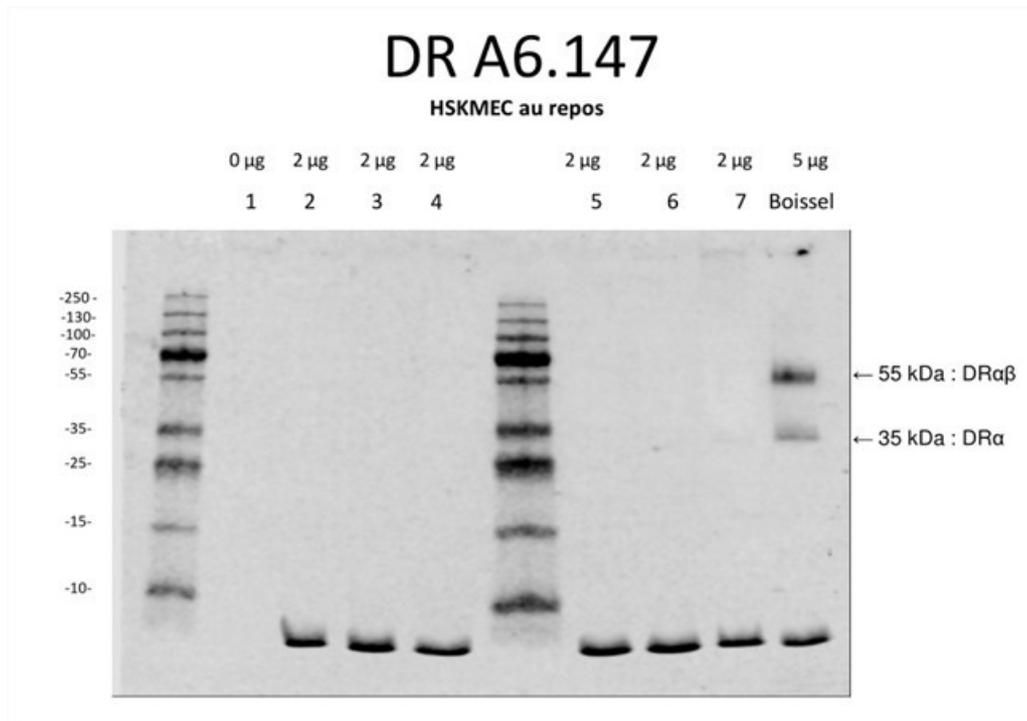


Figure 26 : Présence de DR dans les lysats de HSkMEC activées ou non. *Etude des différentes fractions membranaires des HSkMEC en immunoblot obtenues après lyse et ultracentrifugation des cellules en gradient de sucrose. En haut : HSkMEC au repos, en bas : HSkMEC activées. Les fractions 2 et 3 contiennent les radeaux lipidiques. Présence de DR reconnu par l'anticorps DR A6.147 sur les HSkMEC activées ou non. La fraction n°1 contient une quantité insuffisante de protéines pour être détectables dans le test BCA.*

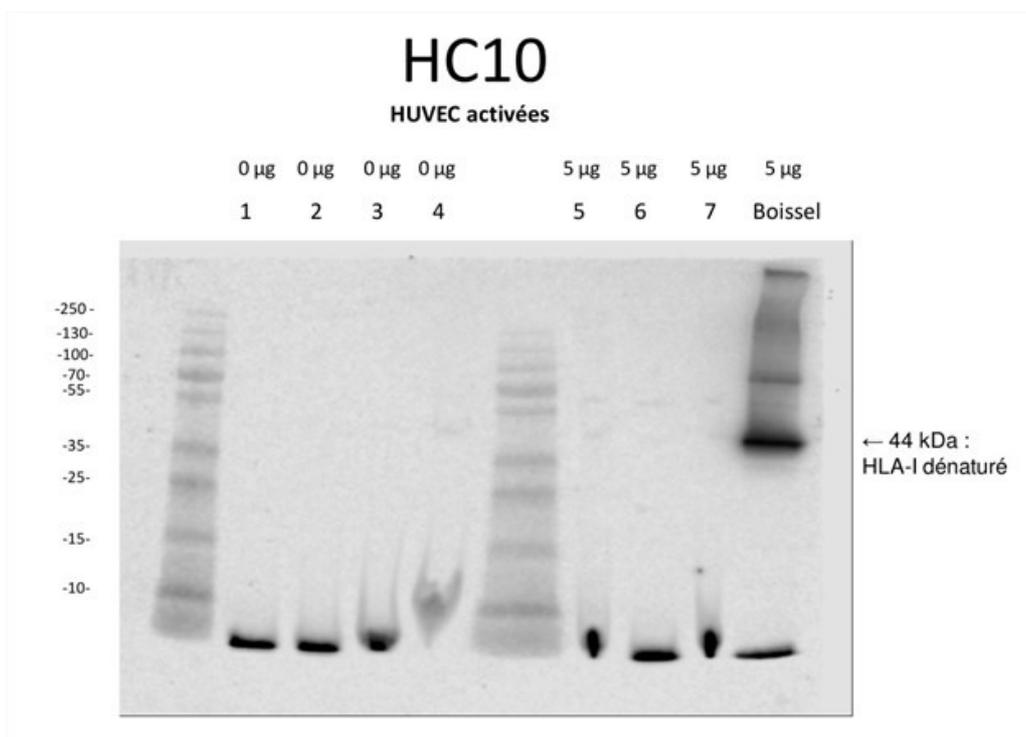
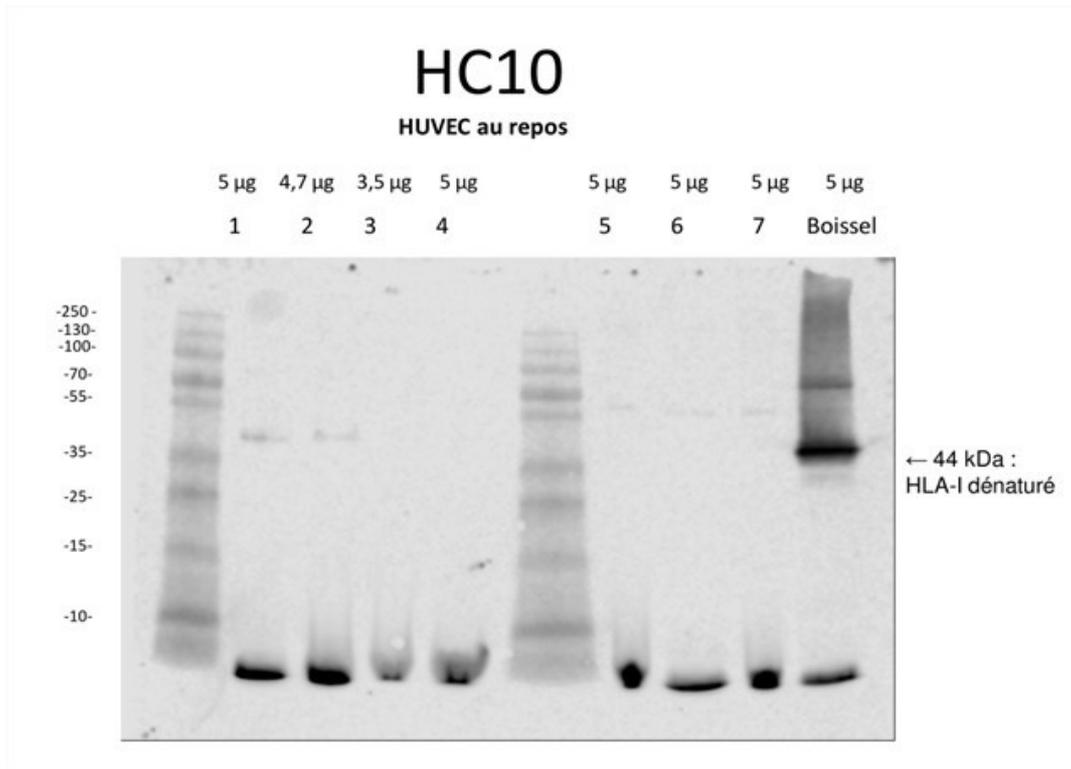


Figure 27 : Présence de FHC dans les lysats de HUVEC activées ou non. *Etude des différentes fractions membranaires cellulaires en immunoblot obtenues après lyse et ultracentrifugation des cellules en gradient de sucrose. En haut : HUVEC au repos, en bas : HUVEC activées. Les fractions 2 et 3 contiennent les radeaux lipidiques. Présence de FHC reconnu par l'anticorps HC10 sur les HUVEC activées ou non.*

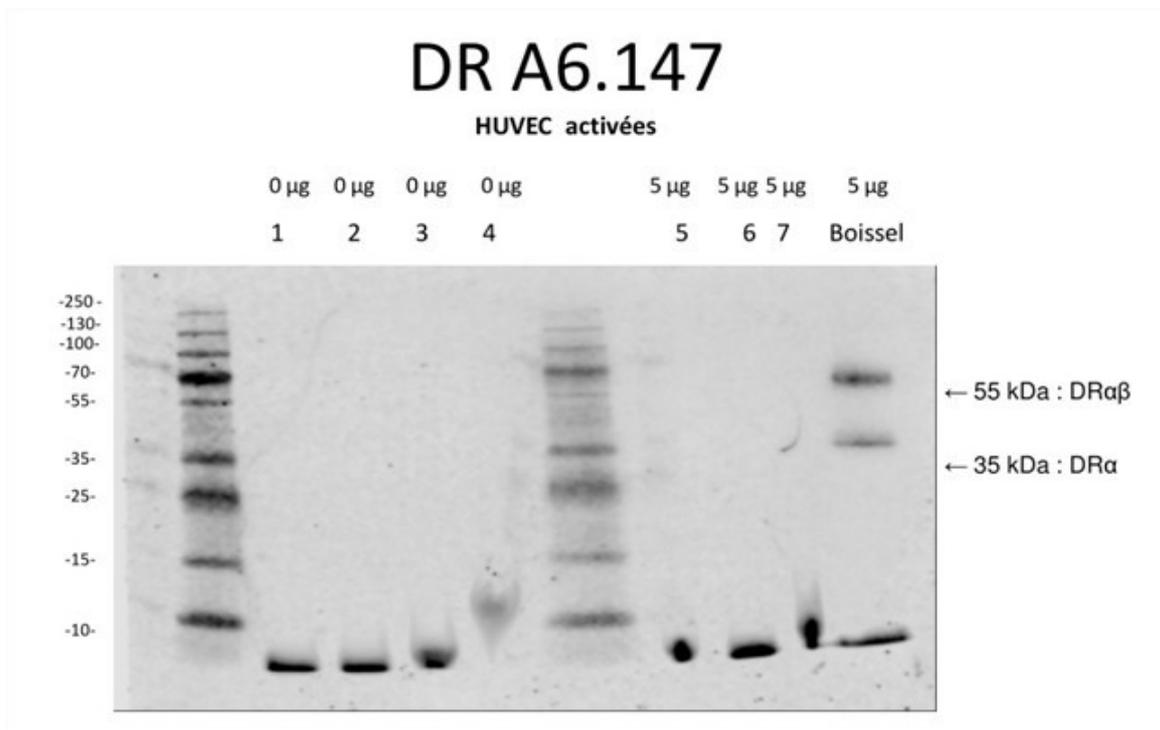
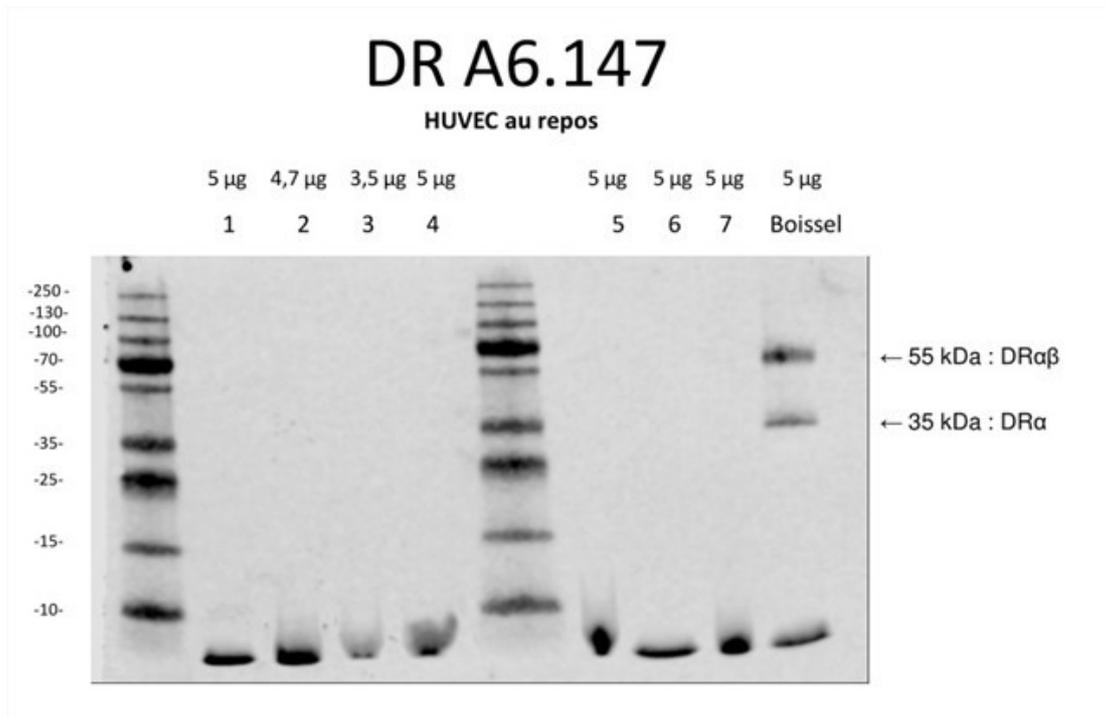


Figure 28 : Présence de DR dans les lysats de HUVEC activées ou non. *Etude des différentes fractions membranaires cellulaire en immunoblot obtenues après lyse et ultracentrifugation des cellules en gradient de sucrose. En haut : HUVEC au repos, en bas : HUVEC activées. Les fractions 2 et 3 contiennent les radeaux lipidiques. Présence de FHC reconnu par l'anticorps DR A6.147 sur les HUVEC activées ou non.*

Discussion

A l'aide des immunomarquages en CMF, nous montrons que l'expression relative de DR par les LB est très supérieure à celle de DQ ou DP. La densité de DR à la surface cellulaire pourrait s'expliquer par le nombre de gènes DR exprimés pouvant être supérieur à DQ selon les haplotypes. Le niveau d'expression de chaque antigène DR par la cellule n'est pas identique. Certains DR semblent être plus ou moins fortement exprimés que d'autres. Pourtant, l'anticorps monoclonal anti-DR reconnaît bien toutes les molécules DR malgré leur polymorphisme. Malgré tout, il est impossible de vérifier si l'affinité des anticorps est réellement identique pour l'ensemble des allèles car le niveau d'expression de chaque allèle sur les billes Luminex® n'est pas connu avec précision. Afin de limiter l'impact de ce paramètre, nous avons utilisé une concentration d'anticorps largement saturante.

Les HUVEC et les HSkMEC au repos n'expriment pas de HLA-II. En revanche, activées, elles expriment plus DR que DQ ou DP tout comme les LB. L'expression de DR, sur les HUVEC et HSkMEC activées, est très forte, de l'ordre de celle du HLA-I natif. Les HLuMEC et les HKdMEC expriment DQ mais pas DR qu'elles soient au repos ou activées. La présence de DQ en quantité importante à la surface des cellules endothéliales de poumon et de rein pourrait peut-être expliquer l'importance de DQ dans la production de DSA *de novo* post-transplantation. Sur les CE, les différences d'expression sont plus marquées, par exemple, DR est sélectivement et constitutivement présent sur les CE microvasculaires rénales à la différence des gros vaisseaux, des tubules ou des HUVEC non activées pour lesquelles DR est absent. DR serait constamment retrouvé et augmenté après stimulation inflammatoire (IFN γ , TNF α) [17], ce que nous ne retrouvons pas pour les HLuMEC et les HKdMEC. De plus, il serait exprimé sans les autres molécules HLA-II [15], [16], [81]. Ainsi, selon les différents territoires de l'organisme, les CE possèdent une hétérogénéité phénotypique et de densité des molécules HLA à la surface cellulaire, mais très peu de travaux dans la littérature comparent l'expression de DR, DQ et DP. Il n'y a pas de consensus quant à l'expression des molécules HLA-II sur les CE. Il existe même des informations contradictoires qui pourraient s'expliquer en partie par l'évolution des performances techniques et le choix des anticorps avec le temps. Par ailleurs, devant l'hétérogénéité phénotypique des molécules HLA-I et -II, il faut utiliser des anticorps monoclonaux reconnaissant des parties conservées mais spécifiques de chaque type de molécule HLA. Enfin, les lignées du Pr Kieda utilisées pour nos travaux sont transformées par le virus simien SV40, leur phénotype pourrait donc être assez éloigné de la réalité.

Malgré tout, la faible expression de DR sur les HLuMEC et HKdMEC activées reste étonnante et l'anticorps ne peut pas être incriminé car il reconnaît tous les DR fréquents (allèles du test Luminex®). Il faut noter que l'expression de DQ nécessite une plus grande période de stimulation par les cytokines pro-inflammatoires comparativement à DR ou DP [25]. Nous observons, comme de nombreux auteurs, une hiérarchie du niveau d'expression des molécules HLA-II à la surface des cellules endothéliales microvasculaires activées telles que DR > DP > DQ [25].

Les HUVEC activées expriment les molécules FHC en quantité plus importante que lorsqu'elles sont au repos. Cette observation reflète probablement le fait que le processus d'activation représente un stress cellulaire entraînant soit une synthèse plus importante des molécules HLA dont certaines seraient des molécules HLA-I « dénaturées » soit une dénaturation plus importante des HLA-I déjà présentes à la surface cellulaire, soit les deux mécanismes à la fois.

Concernant l'expression des molécules membranaires régulatrices du complément, les LB et les HLuMEC expriment plus CD55 que CD59 ou CD46, contrairement aux autres CE qui expriment plus CD59 que CD55. De plus, l'activation des CE ne modifie pas le niveau d'expression de ces molécules. Les LB, les HLuMEC et les HKdMEC possèdent une densité de molécules régulatrices comparable, à la différence des HUVEC et HSkMEC qui en expriment beaucoup plus.

Les anticorps utilisés sont des IgG d'isotype capable d'activer le complément. La fixation d'au moins 2 IgG suffisamment proches l'une de l'autre sur les molécules HLA-I et -II permet la liaison du facteur C1 conduisant à l'activation de la cascade du complément. Les fractions C4 et C3 fournissent des fragments C4b et C3b, capables d'établir des liaisons covalentes avec la cible et à demi-vie longue après clivage en C4d et C3d. En général, l'activation du complément est meilleure d'une part quand la quantité d'anticorps est en excès par rapport à la quantité d'antigène ou au moins à l'équivalence d'où l'utilisation de l'anticorps à concentration saturante, et meilleure d'autre part quand la densité d'antigène exposée est forte [82]. Il faut noter que cette activation a des spécificités en fonction de l'isotype mis en jeu et de la voie utilisée (voie classique vs voie alterne) [82]. Or, il ne semble pas y avoir de relation directe entre la densité membranaire de chaque molécule HLA et la capacité à activer le complément. En effet, sur les LB, il est possible de mettre en évidence avec les anticorps W6/32 et anti-DR, à la fois la liaison de C1q et le processus d'activation jusqu'au stade C3d alors qu'avec l'anticorps anti-DP on n'observe que la fixation de C3d. La

fixation de C1q sur l'anti-DP doit cependant exister pour initier l'activation de la voie classique et conduire au dépôt de C3d observé, mais elle n'est pas détectable. Ainsi, on peut imaginer des mouvements de rassemblement des complexes antigène/anticorps par le phénomène bien connu de « capping » ou bien l'association sélective de ces antigènes préalablement à l'incubation avec l'anticorps dans des domaines particuliers de la membrane. Une faible expression de DR peut donner un signal C1q ou C3d fort. Dans ces situations il deviendrait difficile de prédire la capacité cytotoxique d'un anticorps médiée par le complément sur la simple base du niveau d'expression. De même, sur les HUVEC activées, pour une densité membranaire équivalente de DR et HLA-I natif, la liaison de C1q et le dépôt de C3d apparaissent comme étant beaucoup plus faibles pour DR que pour W6/32. Ces expériences devront être refaites pour confirmer ou non ces observations.

D'une manière générale le marquage C3d est beaucoup plus fort que le marquage C1q. L'explication est celle de la boucle d'amplification de la production de C3d générée par l'activation de la C3 convertase. Un biais relatif à l'utilisation des anticorps anti-HLA est que selon leur type et leur niveau de glycosylation, l'activation de la cascade du complément pourra s'effectuer de façon plus ou moins efficace au sein d'une même sous-classe d'immunoglobuline. De plus, très peu d'anticorps reconnaissant de façon spécifique et exhaustive une « famille » HLA telle que DR ou DQ ou DP, sont disponibles dans le commerce et ou décrits dans la littérature. Il est donc très difficile de confirmer avec un autre anticorps commercial les résultats observés.

Pour rappel, CD55 empêche notamment la formation de la C3 convertase, CD59 inhibe la polymérisation du C9 et CD46 agit comme cofacteur pour l'inactivation par clivage protéolytique de C3b et de C4b par le facteur I. Devant la présence d'une grande quantité de molécules régulatrices, et notamment CD55, à la surface des HUVEC et HSkMEC par rapport aux LB, nous nous attendions à observer un marquage C3d faible, ce qui n'est pas le cas. Les HUVEC au repos ou activées expriment en moyenne 4 fois plus de molécules régulatrices du complément que les HSkMEC au repos ou activées (Fig. 9B) et pourtant le marquage C3d est 20 fois plus fort sur les HUVEC activées que sur les HSkMEC activées (Fig. 12B) contrairement à ce que nous pourrions attendre. Il n'apparaît donc pas de relation entre la quantité de molécules régulatrices du complément et l'intensité du marquage C3d.

Pour étudier l'effet des régulateurs membranaires sur l'activation du complément par les anticorps anti-HLA nous avons utilisé la PIPLC et la MBCyD. Ces molécules ne modifient pas le niveau d'expression des molécules HLA comme attendu. La PIPLC diminue de moitié

l'expression des molécules GPI CD55 et CD59. La MBCyD agit de la même manière pour des concentrations supérieures ou égales à 2 mM. L'action combinée de ces deux molécules ne modifie pas non plus le niveau d'expression des molécules HLA. En revanche, nous observons une augmentation de l'expression de CD55 sans effet sur CD59. Cette dernière observation est contraire à ce que l'on pouvait attendre au vu de leur mode d'action et des résultats de la première expérience. L'action combinée de ces agents aurait dû conduire à une forte diminution de l'expression des molécules à ancre GPI. Cette expérience doit être refaite pour vérifier ces résultats. Cependant, la validité de nos résultats est renforcée par l'analyse combinée des différents régulateurs dans une seule et même expérience.

L'action combinée de la PIPLC et de la MBCyD réduit le marquage C3d médié par l'anti-DR mais augmente celui du W6/32 sur les LB contrairement à ce que l'on attendait. L'interprétation de cette expérience est délicate. D'une part la PIPLC clive les molécules à ancre GPI et notamment CD55, ce qui doit favoriser l'activation du complément. D'autre part la MBCyD déstabilise les radeaux lipidiques. L'hypothèse avancée est qu'elle dissocierait les clusters de molécules HLA-II et éloignerait les molécules à ancre GPI des molécules HLA-II. Elle entraînerait donc des effets opposés sur l'activation du complément. Le marquage C3d très fort pour W6/32 serait en faveur d'une action sur les molécules GPI plus importante que sur les molécules HLA-I (Fig. 16). L'action de la PIPLC prédominerait sur celle de la MBCyD. Pour DR le marquage C3d semble plus faible lorsque la PIPLC et la MBCyD sont utilisées ensemble. La dissociation des clusters, reflet de l'action de la MBCyD serait plus dommageable que celle de l'élimination des molécules à ancre GPI par la PIPLC.

D'après les travaux menés au laboratoire en 2006, le GM1 permettait l'internalisation de CD28 (molécule transmembranaire) mais pas de CD55 ni de CD59 [56]. De plus, il ne modifie pas le niveau d'expression des molécules HLA. Nous confirmons ces résultats sur les molécules HLA et à ancre GPI (Fig. 20). Ainsi, nous nous attendions à observer un marquage C3d inchangé pour W6/32, DR et DQ, en présence ou non de GM1 sur les CE. Ces résultats sont observés sur les HUVEC au repos (Fig. 21B), les HSkMEC au repos et activées (Fig. 22B). Or, sur les HUVEC activées, le marquage C3d semble augmenter en présence de GM1 pour le W6/32 ou le DR (Fig. 21B), sans que nous puissions y apporter une explication. Peut-être que sur les HUVEC activées, la proportion de GM1 exogène intégrée dans la membrane plasmique pourrait éloigner les molécules à ancre GPI ou relocaliser les molécules HLA-I et -II en clusters favorisant l'activation du complément.

Notre hypothèse initiale était que si DQ était contenu dans les radeaux lipidiques, alors sa localisation en clusters favoriserait l'activation du complément (révélée par le dépôt de C3d) ce qui faciliterait l'évolution vers le rejet du greffon. Ainsi, la déstabilisation des radeaux lipidiques par l'ajout de GM1 exogène aurait pu relocaliser les molécules DQ et donc limiter cette activation du complément. Cependant, nous pensions que le GM1 aurait une action sur les molécules HLA pour pouvoir avancer une preuve de leur appartenance aux radeaux lipidiques ce que nous ne confirmons pas. Il est nécessaire de répéter les expériences et d'envisager d'autres moyens de mettre en évidence DQ dans les radeaux lipidiques comme par exemple l'immunoblot des fractions d'ultracentrifugation en gradient de sucrose et des méthodes de microscopie multi couleurs confocales ou à haute résolution pour étudier la distribution de ces molécules sous l'action du GM1.

La réalisation des immunoblots objectivant la détection des molécules FHC et DR dans les radeaux lipidiques des cellules endothéliales activées ou non a nécessité une longue mise au point. La lignée de LB transformée par l'EBV (« Boissel »), sert de contrôle positif à cette étude. Elle est connue pour exprimer des molécules HLA-I en grande quantité de manière bien supérieure à celle des lignées de LT représentées par exemple par les Jurkat. A la différence des cellules issues de la lignée LT, elles expriment des molécules HLA-II comme le DR. En pratique les « Boissel » et les K562-B35 nous ont aussi permis de tester différents anticorps en immunoblot. Comme attendu, les « Boissel » expriment FHC et DR (Fig. 23 à 28) et les K562-B35 n'expriment que FHC (Fig.23). L'utilisation des Jurkat nous a offert l'opportunité de tester le protocole de fractionnement du lysat cellulaire en gradient de sucrose. Leur capacité de prolifération rapide et leur facilité d'activation nous ont permis de travailler sur de grandes quantités de protéines contenues dans les différentes fractions. Comme attendu, les Jurkat au repos et activées expriment des FHC mais en quantité inférieure à celle des « Boissel ». Cependant, leur activation ne permet pas l'expression de DR (Fig. 23, 24). Or les LT activés sont connus pour exprimer du DR quand ils sont activés. Ce marqueur est d'ailleurs utilisé en routine au laboratoire d'Immunologie cellulaire du CHU de Bordeaux en CMF pour quantifier ce compartiment lymphocytaire. Dans nos expériences, nous n'observons pas l'expression de DR sur les Jurkat activées ni en CMF (données non montrées), ni en immunoblot (Fig. 23, 24). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'il s'agit de lignées cellulaires transformées et peut être un peu trop éloignées de la physiologie des lymphocytes humains. Nous observons les mêmes résultats avec les JRT3, lignée d'origine lymphocytaire T (Fig. 23). Il faut noter que des molécules FHC sont présentes dans toutes les fractions du lysat de Jurkat au repos isolées en gradient de sucrose, avec une légère prédominance pour les fractions contenant les radeaux lipidiques (Fig. 24). Ceci s'explique

par le fait que les molécules HLA-I et donc les molécules FHC sont non seulement contenues dans les radeaux lipidiques mais aussi dans tous les compartiments cellulaires en quantité importante.

Les HSkMEC, comme les Jurkat, expriment des molécules FHC dans l'ensemble des fractions que les cellules soient au repos ou activées (Fig. 25). A noter que la fraction n°1 n'a pas pu être exploitée compte-tenu de la non-détection de protéines. Les HSkMEC expriment des molécules DR après activation (Fig. 26). Ce résultat confirme bien celui observé en CMF (Fig. 10A). Les fractions 2, 3 et 4 sont celles qui contiennent le plus de DR et nous savons que ce sont celles qui contiennent les radeaux lipidiques (Fig. 5). Ainsi, un regroupement des molécules DR se produit bien à la surface des HSkMEC activées dans les radeaux lipidiques.

L'étude de l'expression de FHC et de DR est plus délicate pour les HUVEC. Les HUVEC sont des cellules endothéliales non transformées, dont le nombre de passages doit être limité sous peine de perte des propriétés de cellules endothéliales normales. Elles prolifèrent beaucoup moins vite que les HSkMEC. Nous n'avons pas pu produire une quantité suffisante d'HUVEC activées : 10×10^6 HUVEC activées et 20×10^6 HUVEC au repos contre 70×10^6 HSkMEC activées. Il faut noter que le nombre de Jurkat utilisé dans le protocole était initialement de 100×10^6 cellules et celui des « Boissel » de 30×10^6 cellules. C'est pourquoi les résultats obtenus avec les HUVEC activées pour les fractions n°1 à 4 sont interprétables.

Il semble que les HUVEC au repos expriment très faiblement FHC par rapport aux HSkMEC au repos et ce malgré un dépôt de quantité de protéines homogène (1,33 à 2 μ g pour les HSkMEC au repos et 4,7 à 3,5 μ g pour les HUVEC au repos, Fig. 25 et 27). Or, l'expression du HLA-I en CMF sur les HUVEC est du même ordre de grandeur que sur les HSkMEC au repos (Fig. 10A). Donc ce résultat n'est pas cohérent avec ceux obtenus en CMF. L'expérience devra être refaite avec une plus grande quantité d'HUVEC.

Enfin, nous n'avons pas à ce stade vérifié notre hypothèse du regroupement de DQ dans les radeaux lipidiques. Il n'existe pas dans le commerce d'anticorps anti-DQ capable de reconnaître l'ensemble des DQ et fonctionnant en immunoblot. L'étude des fractions de gradient de sucrose n'a donc pas pu être effectuée. Ainsi, l'utilisation de clones spécifiques d'un ou plusieurs DQ pourra être pertinente. Ils devront être sélectionnés en fonction des antigènes DQ exprimés par les différentes cellules dont nous disposons.

Pour confirmer l'existence des radeaux lipidiques nous devons ajouter à nos immunoblots un marqueur de ces structures, comme par exemple un anticorps anti-Lck. La Lck est une protéine tyrosine kinase connue pour appartenir aux radeaux lipidiques et promouvoir la transduction du signal d'activation cellulaire, par exemple dépendant de l'antigène pour le TCR. Elle est présente dans de nombreuses lignées cellulaires d'origine lymphocytaire ou non telles que les CE. Seul l'isolement visuel, lors du recueil des fractions après isolement par ultracentrifugation, nous permet d'affirmer la présence des radeaux lipidiques dans les fractions n°2 et 3 pour les Jurkat et n°2 à 4 pour les HSkMEC et les HUVEC au repos ou activées.

La pathogénicité des anti-DQ n'est toujours pas élucidée. Les propriétés pathogènes des DSA sont essentiellement mises en évidence par leur capacité à activer la voie classique du complément, en conduisant à la formation du complexe d'attaque membranaire et à la libération de facteurs chemoattractants pour les cellules immunitaires. Cependant, d'autres mécanismes indépendants de l'activation du complément existent. Ils passent notamment par des facteurs de signalisation intracellulaire et permettent le recrutement de LT CD4+ de profil Th1 et Th17 [83].

Le projet devra être poursuivi dans plusieurs axes. La répétition des expériences en CMF et en immunoblot sera nécessaire pour confirmer nos observations. De nombreuses expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois même si elles ont souvent été réalisées sur plus d'une lignée cellulaire et notamment pour les CE. Il s'agira ensuite de vérifier l'action des agents déstabilisant les microdomaines (MBCyD et GM1), notamment par l'utilisation d'immunoblots. Après isolement des microdomaines par gradient de densité de sucrose et action de ces molécules, le profil protéique observé sera différent. Ainsi nous observerons probablement un défaut de regroupement de DR par exemple après action de ces molécules. Par ailleurs, il serait intéressant d'utiliser des sérums de patients contenant de réels anticorps anti-HLA dirigés contre ces CE (équivalents des DSA) et les fractions du complément nécessaires à la compréhension des mécanismes de genèse de la pathogénicité des anticorps. En effet, les anticorps monoclonaux murins anti-humains utilisés reconnaissent des épitopes conservés de chaque type de molécules HLA humaines. Ils nous permettent de comparer facilement tous les types cellulaires utilisés. Cependant, les DSA générés par un patient ne reconnaîtront qu'un petit nombre d'allèles HLA, ceux possédant le ou les épitopes apportés par le donneur et contre le(s)quel(s) le receveur s'est immunisé. Les sérums des patients devront être sélectionnés sur la base des caractéristiques de leur(s) DSA, tout en sachant que ces sérums contiennent souvent un mélange complexe d'anticorps

(DSA ou non, souvent de classe I et II), et que chaque patient sera différent des autres. Le groupage HLA des cellules utilisées devra être connu pour sélectionner celles exprimant les molécules d'intérêt à étudier et reconnues par le sérum, contenant les DSA adéquats.

Bibliographie

- [1] M. P. Dierselhuis *et al.*, « Minor H antigen matches and mismatches are equally distributed among recipients with or without complications after HLA identical sibling renal transplantation », *Tissue Antigens*, vol. 82, n° 5, p. 312-316, nov. 2013.
- [2] J. Dausset, « [Iso-leuko-antibodies] », *Acta Haematol.*, vol. 20, n° 1-4, p. 156-166, oct. 1958.
- [3] A. Loupy, G. S. Hill, et S. C. Jordan, « The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure », *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, n° 6, p. 348-357, juin 2012.
- [4] T. Kurosaki, K. Kometani, et W. Ise, « Memory B cells », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, n° 3, p. 149-159, mars 2015.
- [5] L. E. Morales-Buenrostro, P. I. Terasaki, L. A. Marino-Vázquez, J.-H. Lee, N. El-Awar, et J. Alberú, « “Natural” human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males », *Transplantation*, vol. 86, n° 8, p. 1111-1115, oct. 2008.
- [6] L. C. Simone, A. Tuli, P. D. Simone, X. Wang, et J. C. Solheim, « Analysis of major histocompatibility complex class I folding: novel insights into intermediate forms », *Tissue Antigens*, vol. 79, n° 4, p. 249-262, avr. 2012.
- [7] S. K. Payeli *et al.*, « Inhibiting HLA–B27 homodimer–driven immune cell inflammation in spondylarthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 64, n° 10, p. 3139-3149, oct. 2012.
- [8] A. Cauli *et al.*, « The arthritis-associated HLA-B*27:05 allele forms more cell surface B27 dimer and free heavy chain ligands for KIR3DL2 than HLA-B*27:09 », *Rheumatol. Oxf. Engl.*, vol. 52, n° 11, p. 1952-1962, nov. 2013.
- [9] F. A. Arosa, S. G. Santos, et S. J. Powis, « Open conformers: the hidden face of MHC-I molecules », *Trends Immunol.*, vol. 28, n° 3, p. 115-123, mars 2007.
- [10] J. Visentin *et al.*, « Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation », *Transplantation*, vol. 98, n° 7, p. 738-744, oct. 2014.

- [11] J. Cai, P. I. Terasaki, N. Anderson, N. Lachmann, et C. Schönemann, « Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure », *Transplantation*, vol. 88, n° 2, p. 226-230, juill. 2009.
- [12] J. Visentin *et al.*, « Clinical impact of preformed donor-specific denatured class I HLA antibodies after kidney transplantation », *Clin. Transplant.*, vol. 29, n° 5, p. 393-402, mai 2015.
- [13] J. Visentin, G. Guidicelli, J.-F. Moreau, J.-H. Lee, et J.-L. Taupin, « Deciphering allogeneic antibody response against native and denatured HLA epitopes in organ transplantation », *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, n° 7, p. 2111-2121, juill. 2015.
- [14] P. C. Grenzi, R. de Marco, R. Z. R. Silva, E. F. Campos, et M. Gerbase-DeLima, « Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay », *Hum. Immunol.*, vol. 74, n° 10, p. 1300-1303, oct. 2013.
- [15] K. A. Muczynski, T. Cotner, et S. K. Anderson, « Unusual expression of human lymphocyte antigen class II in normal renal microvascular endothelium », *Kidney Int.*, vol. 59, n° 2, p. 488-497, févr. 2001.
- [16] K. A. Muczynski, D. M. Ekle, D. M. Coder, et S. K. Anderson, « Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 14, n° 5, p. 1336-1348, mai 2003.
- [17] V. K. R. Mannam, R. E. Lewis, et J. M. Cruse, « The fate of renal allografts hinges on responses of the microvascular endothelium », *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 94, n° 2, p. 398-411, avr. 2013.
- [18] N. Issa *et al.*, « Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels », *Transplantation*, vol. 86, n° 5, p. 681-685, sept. 2008.
- [19] N. Lachmann *et al.*, « Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts », *Transplantation*, vol. 87, n° 10, p. 1505-1513, mai 2009.

- [20] T. Kobayashi *et al.*, « Significant association between chronic antibody-mediated rejection and donor-specific antibodies against HLA-DRB rather than DQB in renal transplantation », *Hum. Immunol.*, vol. 72, n° 1, p. 11-17, janv. 2011.
- [21] J. M. DeVos *et al.*, « Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation », *Kidney Int.*, vol. 82, n° 5, p. 598-604, sept. 2012.
- [22] M. C. S. Freitas *et al.*, « The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes », *Transplantation*, vol. 95, n° 9, p. 1113-1119, mai 2013.
- [23] M. J. Everly *et al.*, « Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts », *Transplantation*, vol. 95, n° 3, p. 410-417, févr. 2013.
- [24] A. R. Tambur, J. Rosati, S. Roitberg, D. Glotz, J. J. Friedewald, et J. R. Leventhal, « Epitope analysis of HLA-DQ antigens: what does the antibody see? », *Transplantation*, vol. 98, n° 2, p. 157-166, juill. 2014.
- [25] A. R. Cross *et al.*, « Donor Specific Antibodies are not only directed against HLA-DR: Minding your Ps and Qs », *Hum. Immunol.*, avr. 2016.
- [26] A. Tagliamacco *et al.*, « DQ molecules are the principal stimulators of de novo donor-specific antibodies in nonsensitized pediatric recipients receiving a first kidney transplant », *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.*, vol. 27, n° 7, p. 667-673, juill. 2014.
- [27] J. D. Smith *et al.*, « De novo donor HLA-specific antibodies after heart transplantation are an independent predictor of poor patient survival », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 11, n° 2, p. 312-319, févr. 2011.
- [28] A. I. Musat *et al.*, « The significance of donor-specific HLA antibodies in rejection and ductopenia development in ABO compatible liver transplantation », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 11, n° 3, p. 500-510, mars 2011.
- [29] C. A. Irving *et al.*, « Effect of persistent versus transient donor-specific HLA antibodies on graft outcomes in pediatric cardiac transplantation », *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.*, vol. 34, n° 10, p. 1310-1317, oct. 2015.

- [30] C. Wiebe *et al.*, « Class II HLA Epitope Matching-A Strategy to Minimize De Novo Donor-Specific Antibody Development and Improve Outcomes », *Am. J. Transplant.*, vol. 13, n° 12, p. 3114-3122, déc. 2013.
- [31] R. J. Duquesnoy, G. Hönger, I. Hösli, M. Marrari, et S. Schaub, « Antibody-defined epitopes on HLA-DQ alleles reacting with antibodies induced during pregnancy and the design of a DQ eplet map », *Hum. Immunol.*, vol. 77, n° 10, p. 824-831, oct. 2016.
- [32] J. S. Beaty, T. L. Sukiennicki, et G. T. Nepom, « Allelic variation in transcription modulates MHC class II expression and function », *Microbes Infect. Inst. Pasteur*, vol. 1, n° 11, p. 919-927, sept. 1999.
- [33] T. Bachelet *et al.*, « Kidney intragraft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 13, n° 11, p. 2855-2864, nov. 2013.
- [34] H. E. Feucht *et al.*, « Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss », *Kidney Int.*, vol. 43, n° 6, p. 1333-1338, juin 1993.
- [35] G. Guidicelli *et al.*, « Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 27, n° 2, p. 615-625, févr. 2016.
- [36] A. Sicard *et al.*, « Detection of C3d-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies at Diagnosis of Humoral Rejection Predicts Renal Graft Loss », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 26, n° 2, p. 457-467, févr. 2015.
- [37] M. D. Stegall, M. F. Chedid, et L. D. Cornell, « The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation », *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, n° 11, p. 670-678, nov. 2012.
- [38] N. Khovanova *et al.*, « Subclass analysis of donor HLA-specific IgG in antibody-incompatible renal transplantation reveals a significant association of IgG4 with rejection and graft failure », *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.*, vol. 28, n° 12, p. 1405-1415, déc. 2015.
- [39] X. Zhang et E. F. Reed, « Effect of antibodies on endothelium », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 9, n° 11, p. 2459-2465, nov. 2009.

- [40] K. A. Thomas, N. M. Valenzuela, et E. F. Reed, « The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγRs, and endothelium in transplant rejection », *Trends Mol. Med.*, vol. 21, n° 5, p. 319-329, mai 2015.
- [41] N. M. Valenzuela, K. R. Trinh, A. Mulder, S. L. Morrison, et E. F. Reed, « Monocyte recruitment by HLA IgG-activated endothelium: the relationship between IgG subclass and FcγRIIIa polymorphisms », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 15, n° 6, p. 1502-1518, juin 2015.
- [42] G. Hönger, N. Krähenbühl, S. Dimeloe, M. Stern, S. Schaub, et C. Hess, « Inter-individual differences in HLA expression can impact the CDC crossmatch », *Tissue Antigens*, vol. 85, n° 4, p. 260-266, avr. 2015.
- [43] R. Patel et P. I. Terasaki, « Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation », *N. Engl. J. Med.*, vol. 280, n° 14, p. 735-739, avr. 1969.
- [44] R. Hachem, « Antibody-Mediated Lung Transplant Rejection », *Curr. Respir. Care Rep.*, vol. 1, n° 3, p. 157-161, sept. 2012.
- [45] M. Kim *et al.*, « Impact of pretransplant anti-HLA antibodies on outcomes in lung transplant candidates », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 189, n° 10, p. 1234-1239, mai 2014.
- [46] A. Tran, D. Fixler, R. Huang, T. Meza, C. Lacelle, et B. B. Das, « Donor-specific HLA alloantibodies: Impact on cardiac allograft vasculopathy, rejection, and survival after pediatric heart transplantation », *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.*, vol. 35, n° 1, p. 87-91, janv. 2016.
- [47] M. Y. Tang, Q. H. Wang, J. Wang, X. Gao, L. Wu, et J. M. Tan, « Strength of donor-specific antibodies with the use of Luminex single-antigen beads is a reliable predictor of acute rejection in living-relative kidney recipients », *Transplant. Proc.*, vol. 47, n° 2, p. 309-312, mars 2015.
- [48] I. Salvadé *et al.*, « Clinically-relevant threshold of preformed donor-specific anti-HLA antibodies in kidney transplantation », *Hum. Immunol.*, vol. 77, n° 6, p. 483-489, juin 2016.

- [49] J. C. Delgado et D. D. Eckels, « Positive B-cell only flow cytometric crossmatch: implications for renal transplantation », *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 85, n° 1, p. 59-63, août 2008.
- [50] C. V. Harding et E. R. Unanue, « Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation », *Nature*, vol. 346, n° 6284, p. 574-576, août 1990.
- [51] N. J. Poloso, A. Muntasell, et P. A. Roche, « MHC class II molecules traffic into lipid rafts during intracellular transport », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 173, n° 7, p. 4539-4546, oct. 2004.
- [52] D. J. Irvine, M. A. Purbhoo, M. Krosggaard, et M. M. Davis, « Direct observation of ligand recognition by T cells », *Nature*, vol. 419, n° 6909, p. 845-849, oct. 2002.
- [53] E. M. Hiltbold, N. J. Poloso, et P. A. Roche, « MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 170, n° 3, p. 1329-1338, févr. 2003.
- [54] S. Khandelwal et P. A. Roche, « Distinct MHC class II molecules are associated on the dendritic cell surface in cholesterol-dependent membrane microdomains », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 46, p. 35303-35310, nov. 2010.
- [55] A. Pralle, P. Keller, E. L. Florin, K. Simons, et J. K. Hörber, « Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells », *J. Cell Biol.*, vol. 148, n° 5, p. 997-1008, mars 2000.
- [56] P. Legembre, S. Daburon, P. Moreau, J.-F. Moreau, et J.-L. Taupin, « Modulation of Fas-mediated apoptosis by lipid rafts in T lymphocytes », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 176, n° 2, p. 716-720, janv. 2006.
- [57] G. Barbieri, E. Rimini, et M. A. Costa, « Effects of human leukocyte antigen (HLA)-DR engagement on melanoma cells », *Int. J. Oncol.*, vol. 38, n° 6, p. 1589-1595, juin 2011.
- [58] A. Mugler, F. Tostevin, et P. R. ten Wolde, « Spatial partitioning improves the reliability of biochemical signaling », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, n° 15, p. 5927-5932, avr. 2013.

- [59] M. F. Hanzal-Bayer et J. F. Hancock, « Lipid rafts and membrane traffic », *FEBS Lett.*, vol. 581, n° 11, p. 2098-2104, mai 2007.
- [60] M. Zuidscherwoude, C. M. de Winde, A. Cambi, et A. B. van Sriel, « Microdomains in the membrane landscape shape antigen-presenting cell function », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 95, n° 2, p. 251-263, févr. 2014.
- [61] H. A. Anderson et P. A. Roche, « MHC class II association with lipid rafts on the antigen presenting cell surface », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1853, n° 4, p. 775-780, avr. 2015.
- [62] H. A. Anderson, E. M. Hiltbold, et P. A. Roche, « Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation », *Nat. Immunol.*, vol. 1, n° 2, p. 156-162, août 2000.
- [63] H. Kropshofer *et al.*, « Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes », *Nat. Immunol.*, vol. 3, n° 1, p. 61-68, janv. 2002.
- [64] W. W. A. Schamel et B. Alarcón, « Organization of the resting TCR in nanoscale oligomers », *Immunol. Rev.*, vol. 251, n° 1, p. 13-20, janv. 2013.
- [65] A. Clatza, L. C. Bonifaz, D. A. A. Vignali, et J. Moreno, « CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 171, n° 12, p. 6478-6487, déc. 2003.
- [66] S. J. Turley *et al.*, « Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells », *Science*, vol. 288, n° 5465, p. 522-527, avr. 2000.
- [67] N. Setterblad, C. Roucard, C. Bocaccio, J.-P. Abastado, D. Charron, et N. Mooney, « Composition of MHC class II-enriched lipid microdomains is modified during maturation of primary dendritic cells », *J. Leukoc. Biol.*, vol. 74, n° 1, p. 40-48, juill. 2003.
- [68] R. Knorr, C. Karacsonyi, et R. Lindner, « Endocytosis of MHC molecules by distinct membrane rafts », *J. Cell Sci.*, vol. 122, n° Pt 10, p. 1584-1594, mai 2009.
- [69] E. B. Babiychuk et A. Draeger, « Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach », *Biochem. J.*, vol. 397, n° 3, p. 407-416, août 2006.

- [70] D. A. Brown et E. London, « Functions of lipid rafts in biological membranes », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 14, p. 111-136, 1998.
- [71] T. Loftsson et D. Duchêne, « Cyclodextrins and their pharmaceutical applications », *Int. J. Pharm.*, vol. 329, n° 1-2, p. 1-11, févr. 2007.
- [72] V. J. Stella et Q. He, « Cyclodextrins », *Toxicol. Pathol.*, vol. 36, n° 1, p. 30-42, janv. 2008.
- [73] C. Dietrich, Z. N. Volovyk, M. Levi, N. L. Thompson, et K. Jacobson, « Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, n° 19, p. 10642-10647, sept. 2001.
- [74] P. G. Yancey *et al.*, « Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 27, p. 16026-16034, juill. 1996.
- [75] S. Ilangumaran et D. C. Hoessli, « Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane », *Biochem. J.*, vol. 335 (Pt 2), p. 433-440, oct. 1998.
- [76] T. Kolter, « Ganglioside biochemistry », *ISRN Biochem.*, vol. 2012, p. 506160, 2012.
- [77] R. D. Huby, R. J. Dearman, et I. Kimber, « Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 32, p. 22591-22596, août 1999.
- [78] B. Bosch, E. L. Heipertz, J. R. Drake, et P. A. Roche, « Major histocompatibility complex (MHC) class II-peptide complexes arrive at the plasma membrane in cholesterol-rich microclusters », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 19, p. 13236-13242, mai 2013.
- [79] S. K. Patra, A. Alonso, et F. M. Goñi, « Detergent solubilisation of phospholipid bilayers in the gel state: the role of polar and hydrophobic forces », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1373, n° 1, p. 112-118, août 1998.
- [80] L. C. Davis et G. A. Radke, « Measurement of protein using flow injection analysis with bicinchoninic acid », *Anal. Biochem.*, vol. 161, n° 1, p. 152-156, févr. 1987.

- [81] V. C. Gibbs, D. M. Wood, et M. R. Garovoy, « The response of cultured human kidney capillary endothelium to immunologic stimuli », *Hum. Immunol.*, vol. 14, n° 3, p. 259-269, nov. 1985.
- [82] Y. M. Lucisano Valim et P. J. Lachmann, « The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 84, n° 1, p. 1-8, avr. 1991.
- [83] J. Lion *et al.*, « HLA Class II Antibody Activation of Endothelial Cells Promotes Th17 and Disrupts Regulatory T Lymphocyte Expansion », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 16, n° 5, p. 1408-1420, mai 2016.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Anticorps anti-HLA de classe I « dénaturés »
et anti-HLA de classe II DQ :
Effets pathogènes en transplantation**

RESUME :

Malgré l'amélioration constante de l'immunosuppression, les échecs en transplantation restent nombreux. C'est le polymorphisme génétique du système HLA (*Human Leukocyte Antigen*) et en conséquence les différences existant entre le donneur et le receveur qui sont la principale cause des conflits immunitaires après transplantation allogénique. Des études récentes montrent une association importante entre les DSA (*Donor Specific Antibodies*) anti-DQ et les rejets d'organes sans que l'on puisse encore l'expliquer. Par ailleurs, la détection d'anti-HLA-I « dénaturés » dans le sérum d'individus conduit à diminuer les chances d'accès à la greffe mais ne semblent pas être délétères.

Les mécanismes immunogènes des anti-DQ et anti-HLA-I « dénaturés » sont inconnus. Leur étude par des modèles cellulaires communs (cellules endothéliale, lymphocytes B) permettra peut-être de les décrire.

Antibodies against « misfolded » class I HLA and class II DQ : Pathogenicity in transplantation.

Despite the constant improvement of immunosuppression, transplant failures still remain. The main cause of immune conflict after allogeneic transplantation is the genetic polymorphism of the HLA (Human Leukocyte Antigen) and accordingly, the differences between donor and recipient. Recent studies show a significant association between the anti-DQ DSA (Donor Specific Antibodies) and organs rejections no one can yet explain. Furthermore, the detection of antibodies against "misfolded" HLA-I in the serum of individuals leads to decrease the chances of access to transplantation but do not appear to be deleterious.

The immunogenic mechanisms of DQ and « misfolded » HLA-I are unknown. Their study by common cellular models (endothelial cells, B cells) should help us to describe them.

DISCIPLINE administrative : Biologie Médicale

MOTS-CLES : HLA, anticorps, immunisation, transplantation, rejet, radeaux lipidiques

**Immunologie Conceptuelle Expérimentale et Translationnelle (ImmunoConcEpT)
UMR 5164
Université de Bordeaux Bâtiment 1B
146 rue Léo Saignat
BP 14
33076 Bordeaux Cedex**

**Laboratoire d'Immunologie et d'Immunogénétique
Centre Hospitalier et Universitaire de Bordeaux
Place Amélie Raba Léon
33076 Bordeaux Cedex**

**Université de Toulouse Paul-Sabatier – U.F.R des Sciences Pharmaceutiques
35 route des Maraîchers
31062 Toulouse Cedex**

Directeur de thèse : Professeur Jean-Luc TAUPIN