



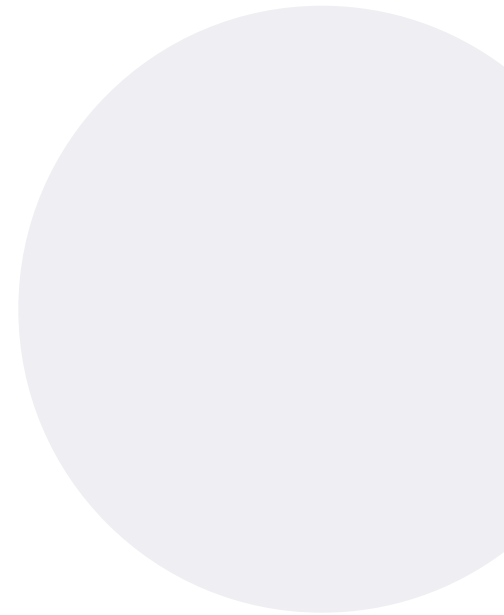
LE GENOTYPAGE HLA EN 2018

Techniques et Perspectives

Alexandre Walencik

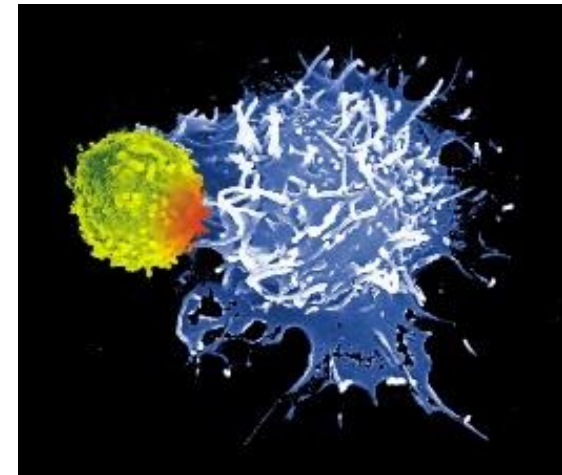
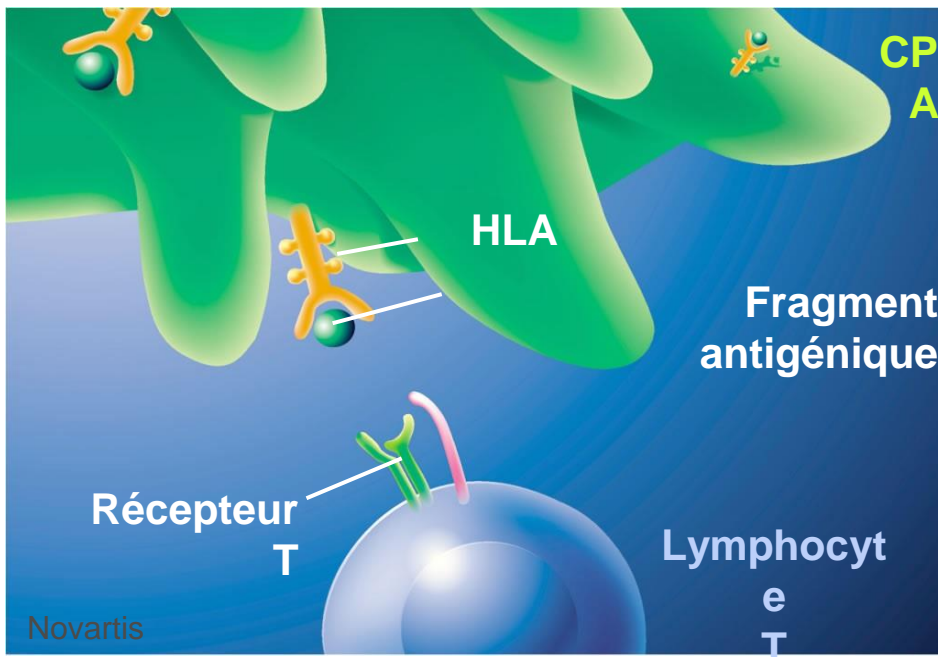


LE SYSTÈME HLA



LES MOLECULES HLA

- Les molécules HLA sont un outil majeur de la surveillance immunologique
- Elles servent à présenter des peptides issus de ~ toutes les cellules de l'organisme aux cellules immunitaires, permettant de voir si elles sont infectées ou dégènèrent
- Le peptide dans son contexte HLA est reconnu par les lymphocytes T et leur récepteur (TCR)

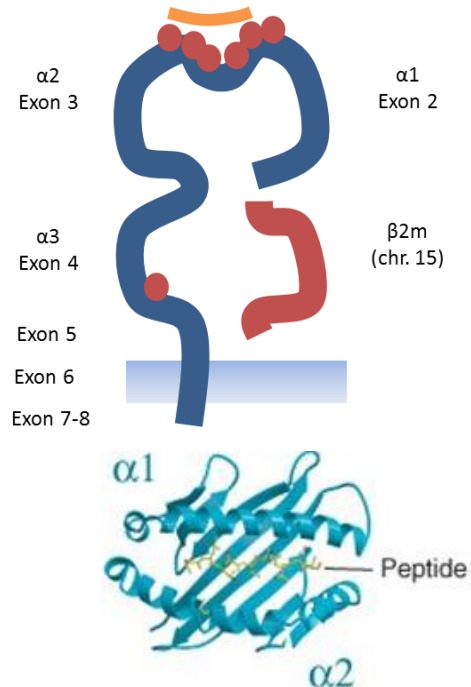


2 TYPES DE MOLECULES HLA

- Protéines

HLA de Classe I

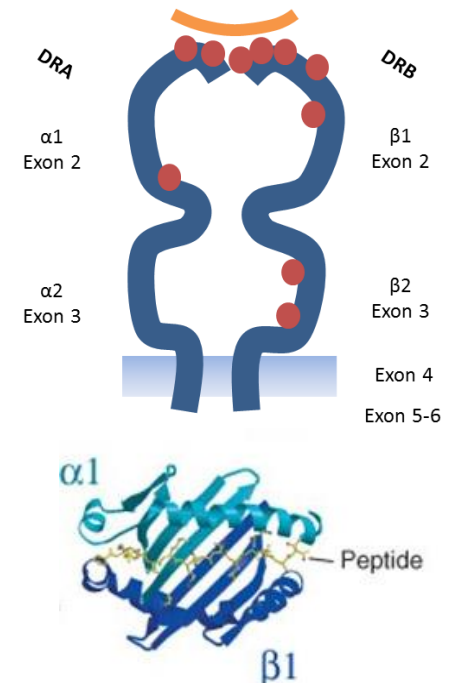
- HLA-A
- HLA-B
- HLA-C



- Peptides endogènes
- Quasi ubiquitaire (hors GR, cornée...)

HLA de Classe II

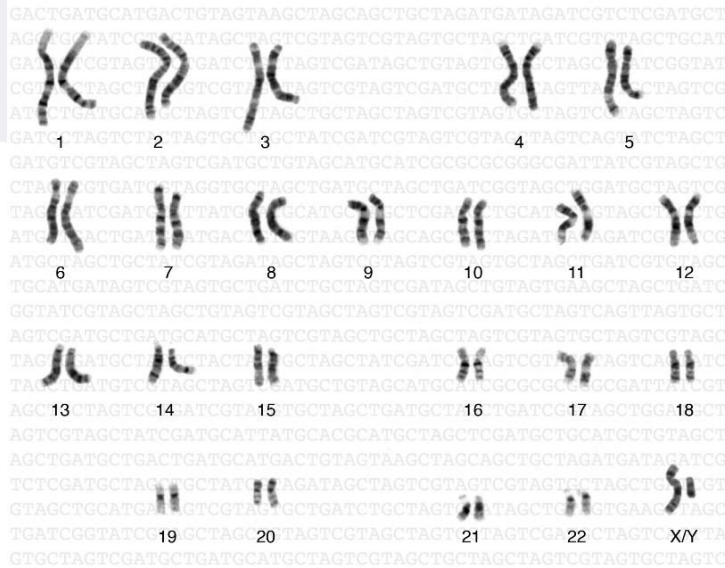
- HLA-DR
- HLA-DQ
- HLA-DP



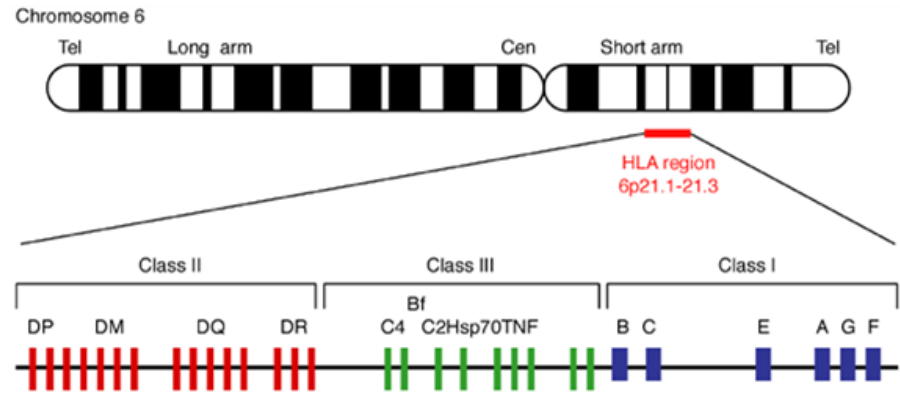
- Peptides exogènes
- limité aux CPA

LES GENES HLA

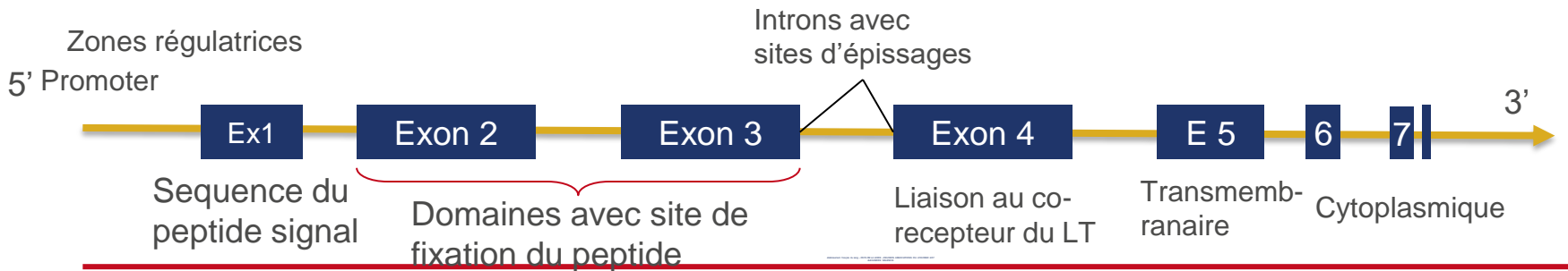
Chromosomes of the Human Genome



- sont tous situés dans une petite région sur le chromosome 6 : le CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité)

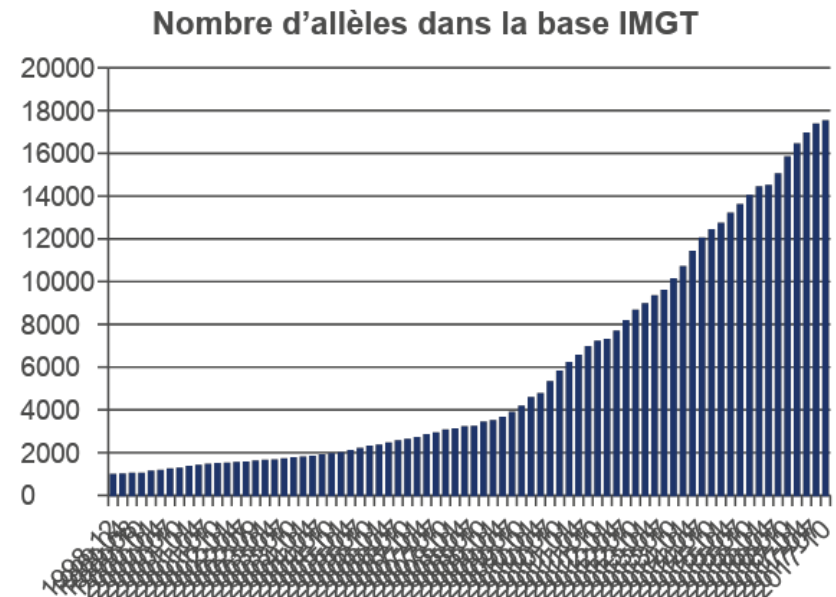


- Structure classique d'un gène (Classe I) :



CARACTERISTIQUES DES GENES HLA

- Polymorphisme :
 - De très nombreux allèles décrits : 17500 (01/2018)
 - Allèles = les différentes versions des mêmes gènes HLA.
 - Tous ne donnent pas une protéine différente
 - Individus généralement hétérozygotes (expression codominante)
 - Détermine une « identité » biologique
- Homologie entre gènes
(et pseudogènes)
- Transmission par blocs
 - Haplotypes
 - Déséquilibres de liaisons entre DR et DQ, B et C



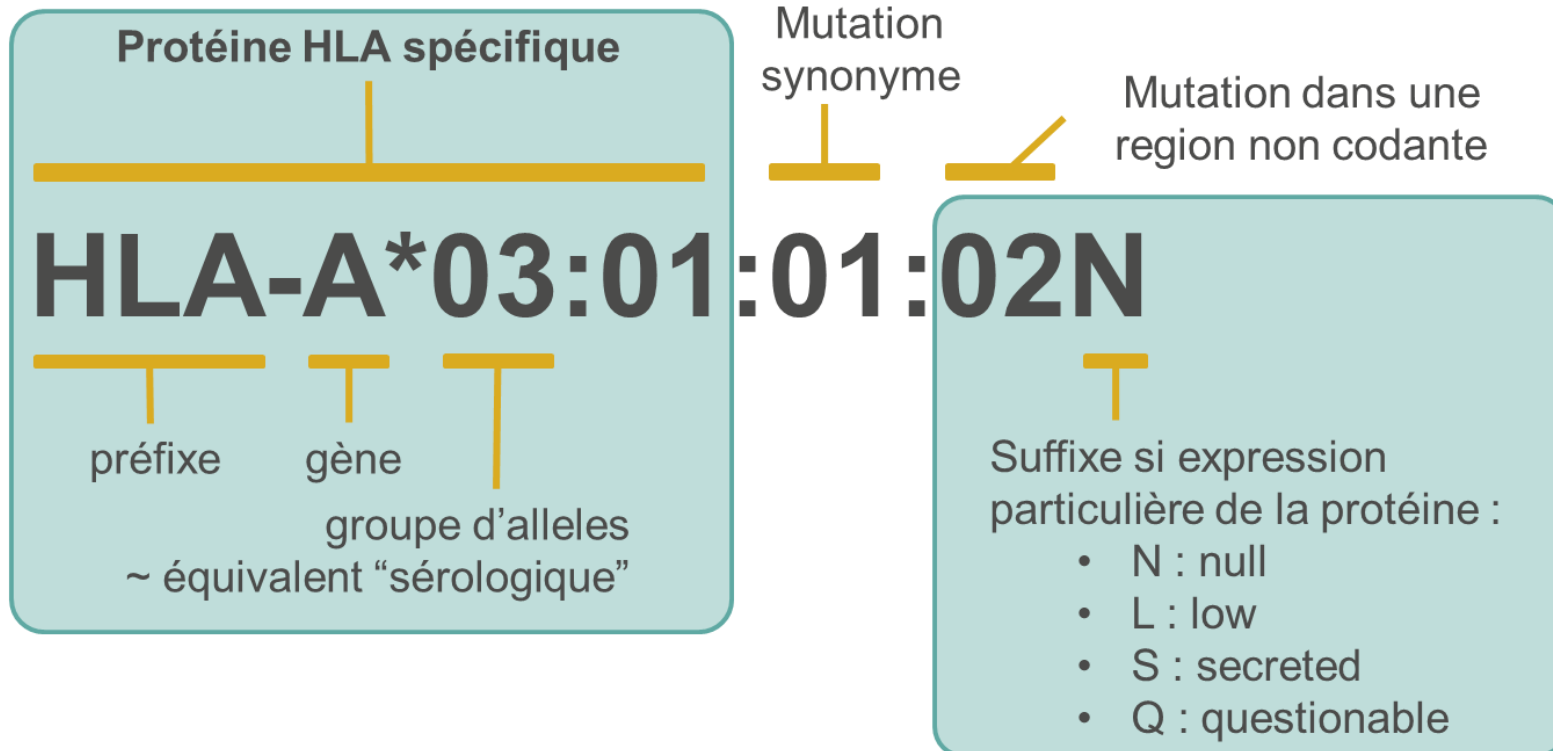
NOMENCLATURE

- Nomenclature HLA :

- Basée sur la structure des allèles
- Officielle et Approuvée par l’OMS

- Depuis 2010

- Résolution = précision du typage



UNE ETUDE FAMILIALE THEORIQUE

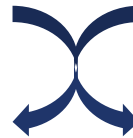
- Transmission par blocs = haplotypes

parents

a	A*29	B*44	C*16	DRB1*07	DQB1*02
b	A*01	B*08	C*07	DRB1*03	DQB1*02

c	A*03	B*40	C*02	DRB1*04	DQB1*03
d	A*03	B*51	C*02	DRB1*11	DQB1*03

enfants



a	A*29	B*44	C*16	DRB1*07	DQB1*02
c	A*03	B*40	C*02	DRB1*04	DQB1*03

b	A*01	B*08	C*07	DRB1*03	DQB1*02
c	A*03	B*40	C*02	DRB1*04	DQB1*03

25% de chance d'être
HLA "géo-identique"

a	A*29	B*44	C*16	DRB1*07	DQB1*02
d	A*03	B*51	C*02	DRB1*11	DQB1*03

b	A*01	B*08	C*07	DRB1*03	DQB1*02
d	A*03	B*51	C*02	DRB1*11	DQB1*03

Quelques cas de
recombinaison (1%)

b	A*29	B*08	C*07	DRB1*03	DQB1*02
d	A*03	B*51	C*02	DRB1*11	DQB1*03



LES TECHNIQUES D'ETUDE DU HLA

Sérologie

- Etude de l'immunisation anti HLA
 - Recherche d'anticorps anti HLA :
 - Dépistage.
 - Détermination de la proportion d'immunisation face à un panel (PRA).
 - Identification haute définition.
 - Vérification de la compatibilité entre donneur et receveur = Cross match
- **(Phénotypage HLA)**

Biologie Moléculaire

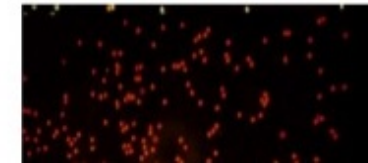
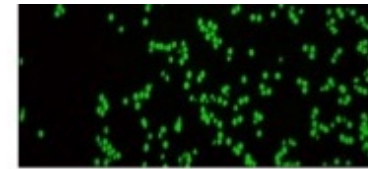
- Détermine les allèles HLA = Génotypage HLA
 - Technique d'urgence
 - Techniques « au locus »
 - NGS

TECHNIQUES DE LYMPHOCYTOTOXICITÉ

- Grace à un panel d'anticorps capables de détruire les cellules qu'ils reconnaissent par l'action du complément

- Technique

- Contact entre cellules isolées du patients
- Et des anticorps anti HLA-X
- Ajout de complément
- Lecture au microscope (colorants vitaux)



- (Typage HLA)

- Peu précis, pas possible pour HLA-C ni DPB1
- Tient compte de l'expression de la protéine

- (Recherche d'Anticorps anti-HLA)

- Disposer d'un panel de cellules

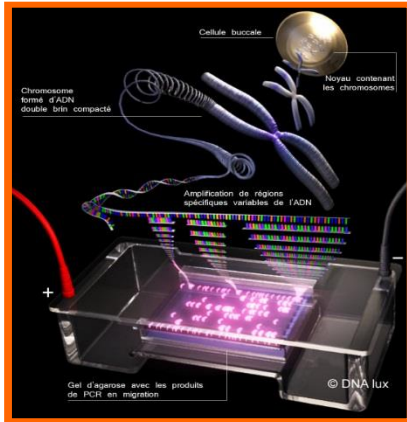
- Epreuve de compatibilité = Crossmatch (24h/24)

- Mise en contact de cellules du donneur
- Et de sérums informatifs sur l'historique immunologique du receveur

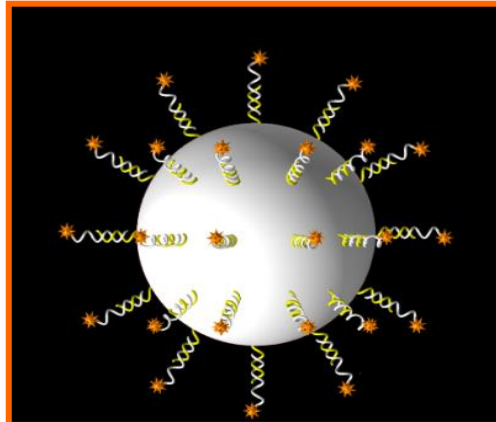
GENOTYPAGE HLA PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE

- A partir d'ADN
- Différentes techniques selon l'application :
 - La précision souhaitée = Résolution
 - La rapidité (urgence ou non)

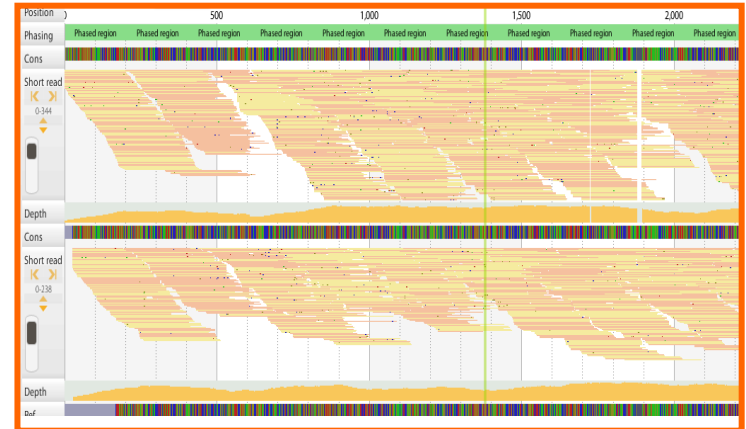
• PCR-SSP:



• PCR-SSO:

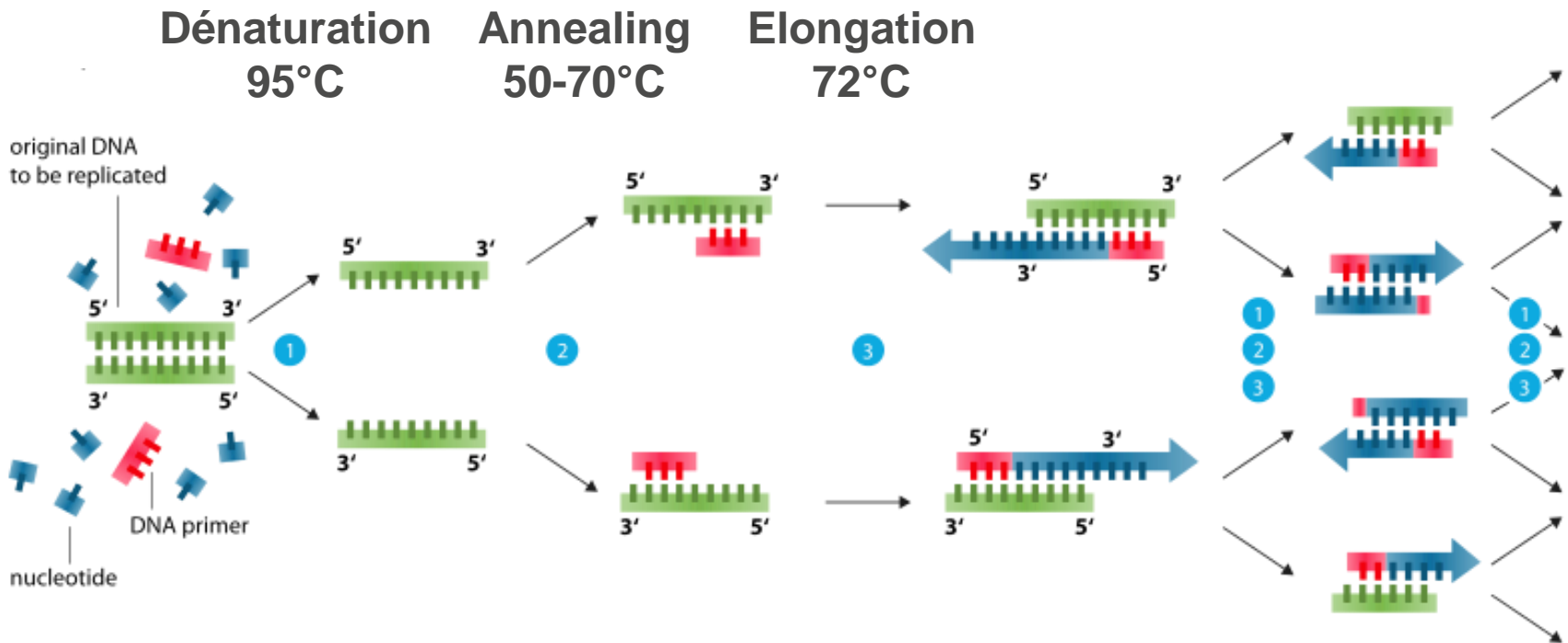


• Séquençage de nouvelle génération (NGS):



PRINCIPE DE L'AMPLIFICATION PAR PCR

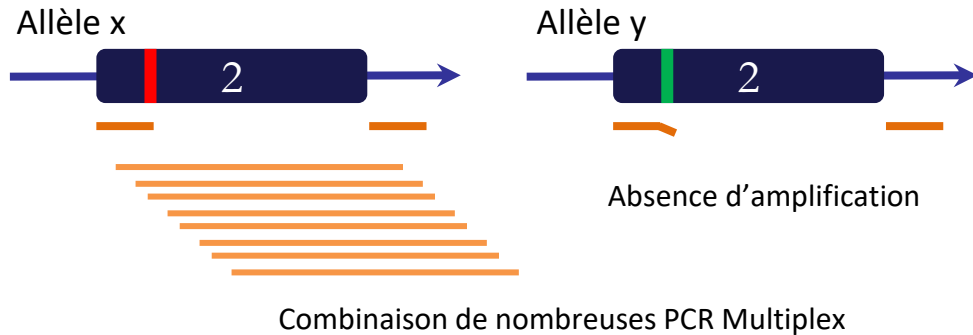
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- Technique enzymatique
- Sélection de cibles d'intérêt (1 exon, 1 gène)
- Amplification exponentielle >> Travail sur amplifiats



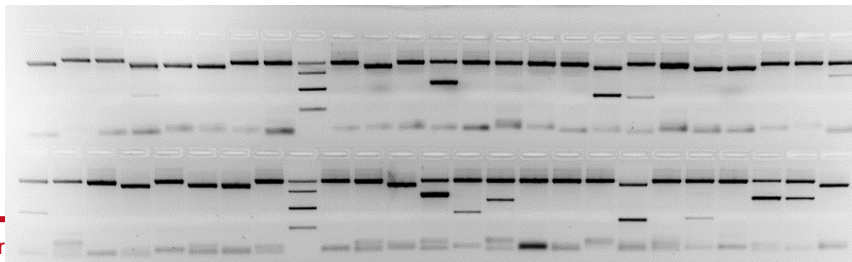
PCR SSP...

- Amplification (ou non) de groupe d'allèles en se basant sur des amorces +/- spécifiques
- Révélation par visualisation sur gel d'agarose ou par qPCR
- La combinaison de X réactions d'amplification positives et négatives permet de déduire les allèles présents

A. Amplification



B. Migration



C. Interprétation

Reactivity pattern of B*08:01:01, B*58:01:01 Display Reactivity List

<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 1, X82	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 22, F25	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 43, 99R
<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 2, N02	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 23, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 44, F25
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 3, 63S	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 24, 74K	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 45, R58
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 4, J82	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 25, 74K	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 47
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 5, 17M	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 26, 01R	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 48
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 6, 20K	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 27, 85F	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 48, 23G
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 7, 23G	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 28, 20K	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 49, 03N
<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 8, 63S	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 29, 64S	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 50, 03N
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 9	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 30, H44	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 51, 03N
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 10, 63G	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 31, R58	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 52, 03N
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 11, 89S	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 32, 78G	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 53, 03N
<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 12, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 33, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 54, 01R
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 13, K73	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 34, 90F	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 55, 03N
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 14, 63G	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 35, K01	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 56, 03N
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 15, 74K	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 36, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 57, 03N
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 16, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 37, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 58, 03N
<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 17, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 38, 78G	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 59, 01R
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 18, 63S	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 39, 78G	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 60, 03N
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 19, 78G	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 40, J82	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 61, 03N
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 20, 85F	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 41, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 62, 27V
<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 21, F25	<input type="checkbox"/> HLA-B low vial 42, 63S	<input checked="" type="checkbox"/> HLA-B low vial 63, 01R

Panel de réactivité Typage

PCR SSP ET SES VARIANTES

- **Avantages**

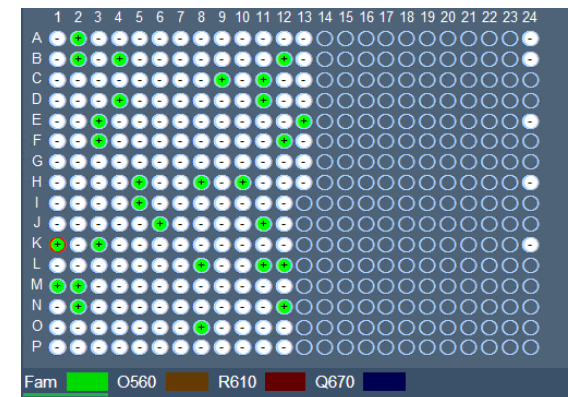
- Flexible > Typage à la demande
- Rapide >> Technique d'urgence +++

- **Inconvénients**

- Cher
- Pas de séries
- Ne voit pas les nouveaux allèles

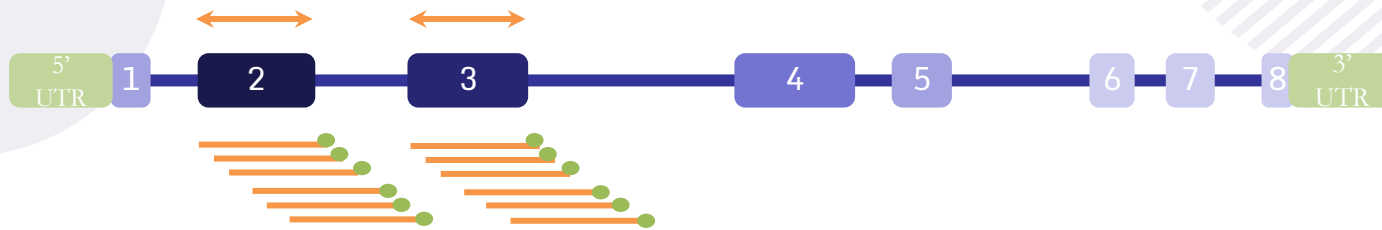
- **Aujourd'hui :**

- Utilisation de qPCR
- Plus rapide : ~1h détection incluse
- Plaque 384 puits : meilleure résolution
- Typage des donneurs cadavériques en vue de don d'organes

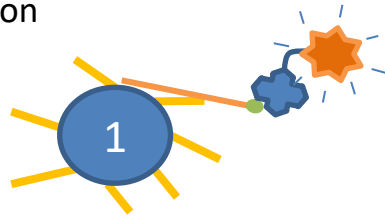


PCR-SSO (SINGLE SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDES)

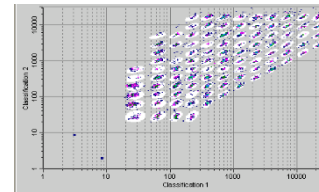
A. Amplification



B. Hybridation



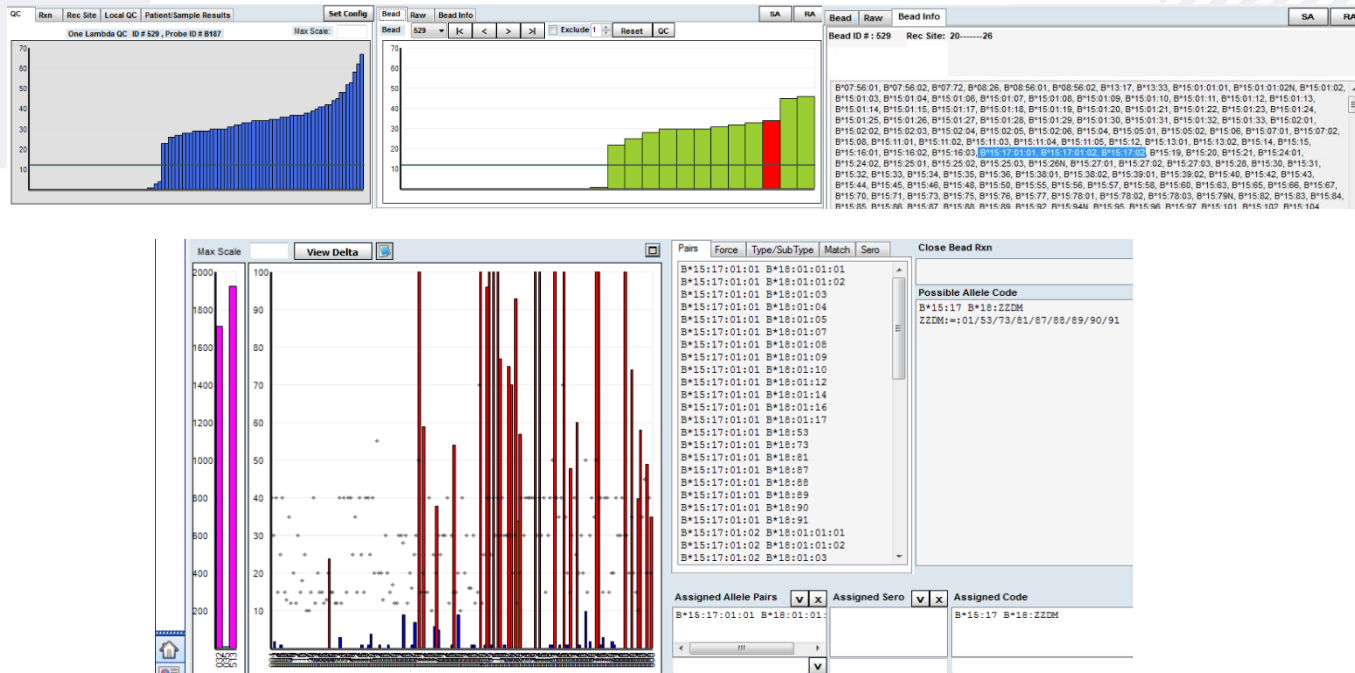
C. Détection par Luminex



- Après l'amplification d'exons clés
- Réaction des amplifiats face à des mélanges de sondes fixés sur billes
- Analyse sur Luminex (multiplexage important)

PCR-SSO (PRINCIPES DE CMF)

- **Interprétation** : Chaque réactivité de bille est comparée à un panel représentatif de la population



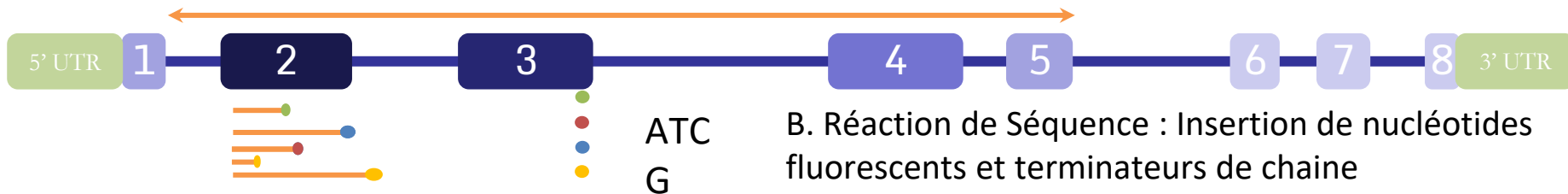
Pour un échantillon donné, le typage découle de l'ensemble des réactivités de chaque bille

- **Avantages**
 - Adapté aux séries
 - Tout en restant assez flexible
- **Inconvénients**
 - Résolution basse à intermédiaire
 - Ne voit pas les nouveaux allèles

TECHNIQUES DE SEQUENCAGE

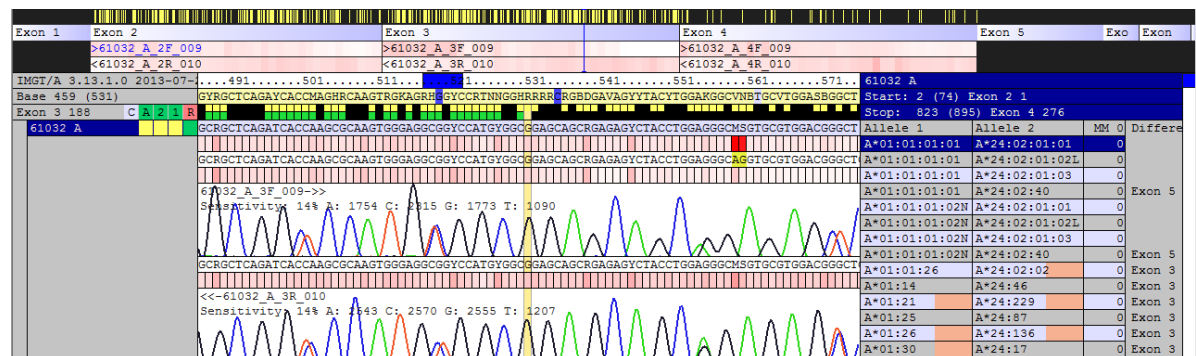
- SBT : Sequence Based Typing
- Génotypage basé sur l'étude directe de la séquence d'ADN
 - Seules techniques capables de déterminer des nouveaux allèles avec précision (polymorphismes non décrits)
- Séquençage capillaire = Sanger

A. Amplification



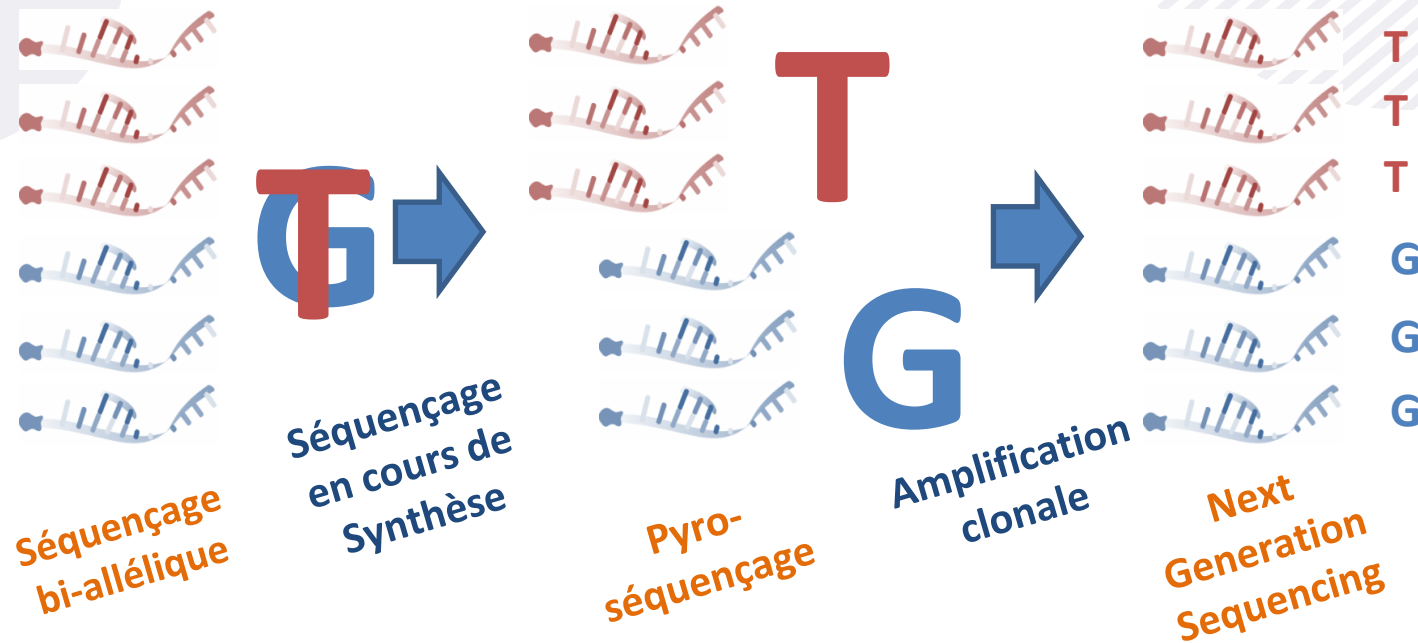
B. Réaction de Séquence : Insertion de nucléotides fluorescents et terminateurs de chaîne

C. Electrophorèse capillaire



D. Interprétation

L'ARRIVEE DU NGS

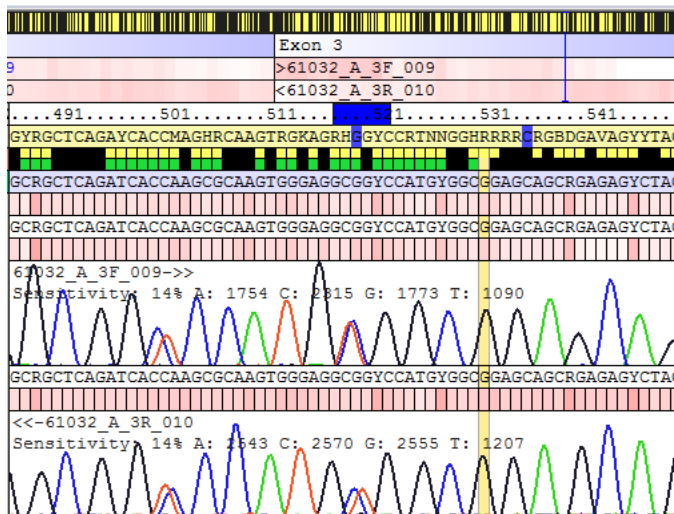


- Obtenir des séquences mono-alléliques = séparation des allèles
- Capacité impressionnante :
 - Etude des gènes en entiers
 - mélange de dizaines d'échantillons

SANGER VS NGS

Séquençage
bi-allélique

Next
Generation
Sequencing



Conexio Assign



Omixon
Twin

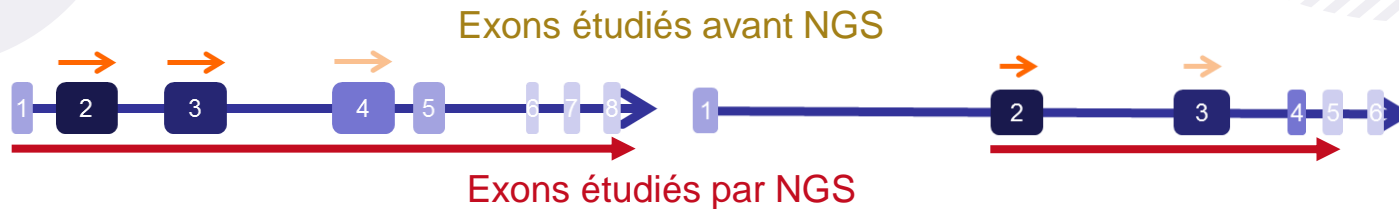
NGS : NEXT GENERATION SEQUENCING

- **Next Generation Sequencing:**
 - = Séquençage de nouvelle génération
 - = Séquençage en haut débit (High Throughput Sequencing)
- **Permet de lire des milliers/millions de séquences d'ADN en parallèle à partir des brins clonaux**
 - Donne des résultats jamais obtenus par une autre technique
 - **Sur de nombreux échantillons simultanément** Identification des échantillons par un index (« code barre » d'ADN synthétique)
- **Des innovations technologiques :**
 - Microfluidique qui permet la séparation des brins d'ADN pour réaliser une amplification clonale
 - Le développement de l'optique, des semi-conducteurs, l'utilisation d'enzymes modifiées,
 - Outils de traitement informatique

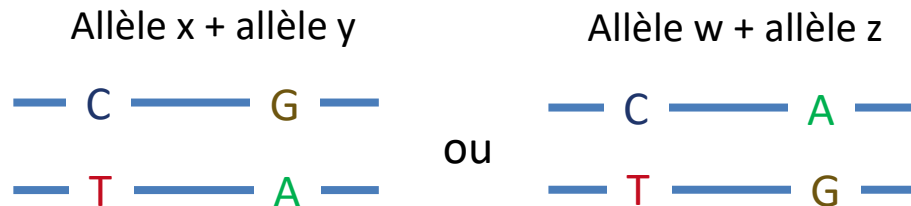
NGS : INTERET POUR LE TYPAGE HLA

- Intérêts

- Augmente la précision du typage HLA grâce à zone d'étude plus étendue



- Détection étendue des allèles nuls
- Polymorphisme sur les exons hors fixation du peptide
- Séquences monoalléliques : S'affranchir des techniques complémentaires par la disparition des ambiguïtés cis-trans (jusqu'à un certain point)



- Nombreux échantillons traités en parallèle (48, 96 voire 192) : Débit et Organisation++
- Economies ?

NGS : PROTOCOLE TECHNIQUE

- Plutôt long

J1 : Sélection de cible : Amplification

1 amplification pour chaque gene HLA pour chaque patient
PCR long range (2-3h de preparation + 4h-6h30 de réaction)

J2 : Préparation de la librairie

Etapes techniques : Vérification et mélange des amplifiats, fragmentation, reparation, greffe des index, sélection de taille et diverses purifications (1 journée de travail)

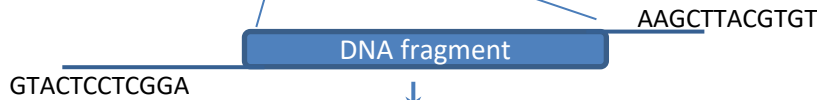
J3 J4 voire J5 : Amplification clonale et Séquençage

Après ajustement de la quantité de librairie et dénaturation
Durée selon la longueur de séquençage voulue : 40h pour 2x250 bp, 20h pour 2x150 bp

J5-J6 : Analyse des données

Logiciel HLA Twin : ~10 minutes / échantillon
Augmente à chaque changement de version de base (nombre d'alleles augmente)

NGS : CE QUE SUBIT L'AMPLIFIAT



Amplification

Fragmentation

Réparation des extrémités

Sélection de taille

Adénylation des brins

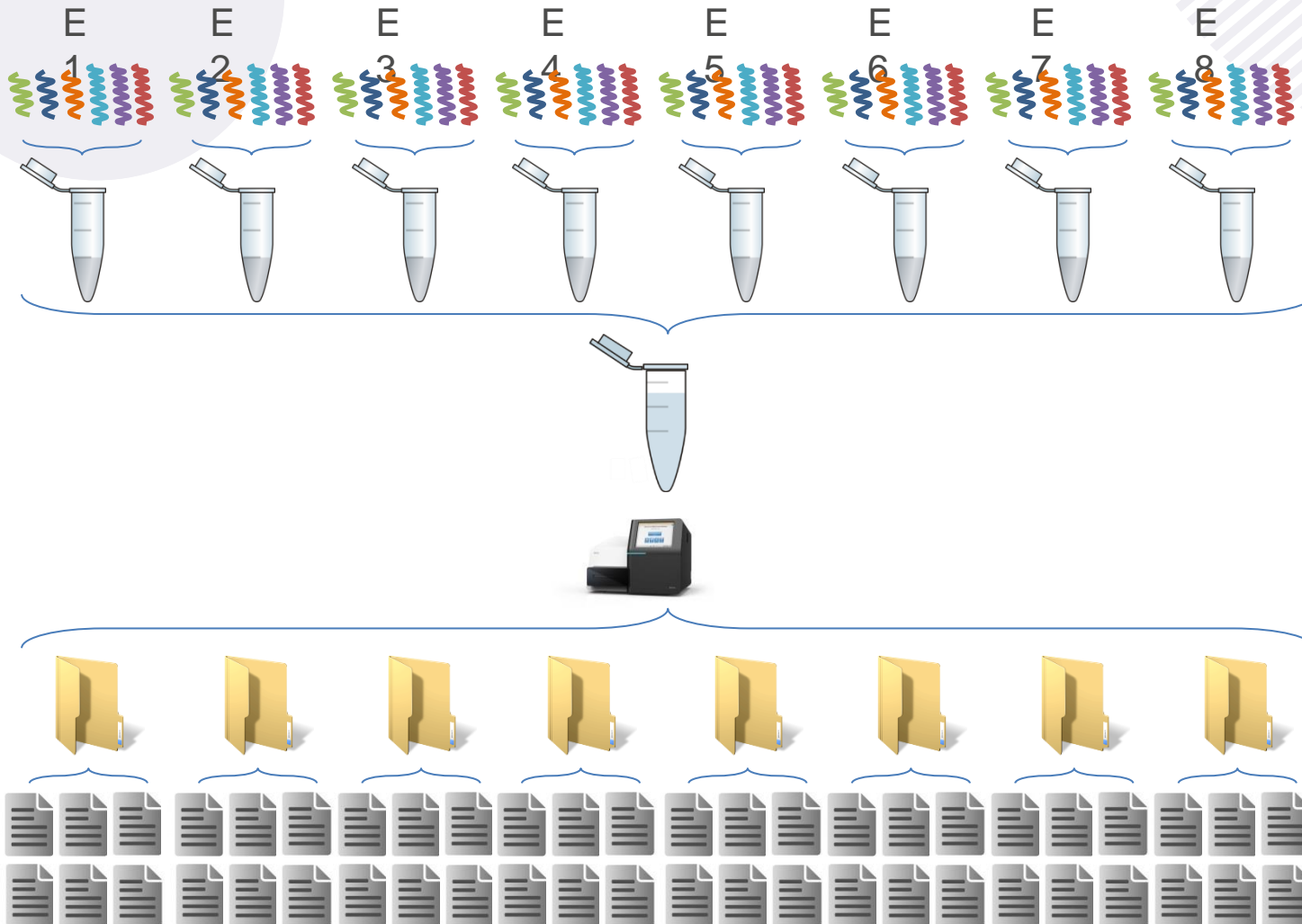
Ligation des adaptateurs

Ligation des Indexs

Dénaturation

NGS : UN DETAIL TECHNIQUE : L'INDEXAGE

- L'indexage = greffer des séquences d'ADN synthétiques différentes d'un échantillon à l'autre



8
échantillons
 $8 \times 6 = 48$ amplifications
quantification/
normalisation et pool
par échantillon
8 indexages
puis pool

1 seul tube
séquencé

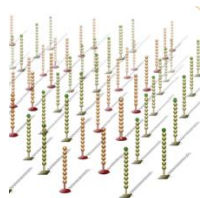
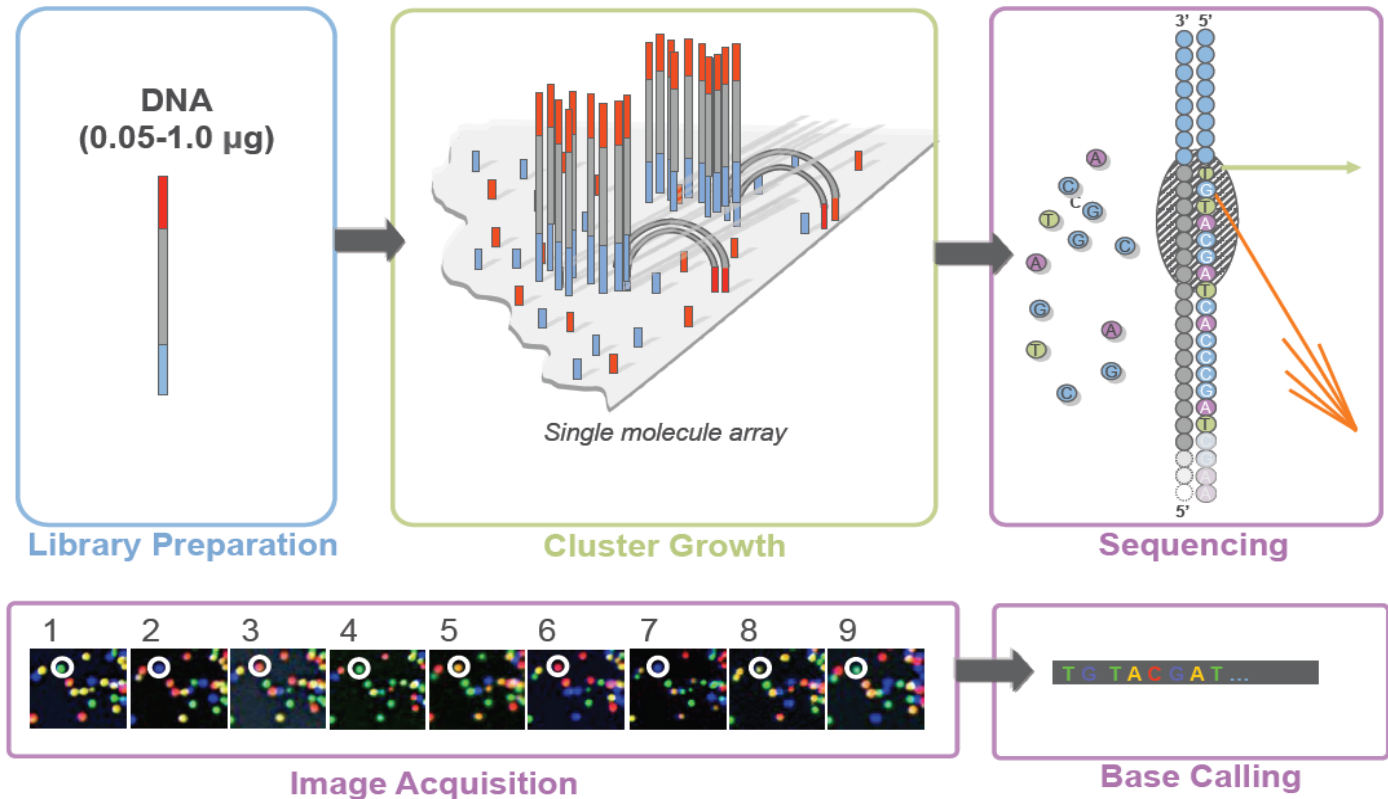
8 fichiers bruts
générés par le
séquenceur

48 locis typés
par logiciel HLA

LE SÉQUENCEUR TRAVAILLE SEUL PENDANT 20H-40H

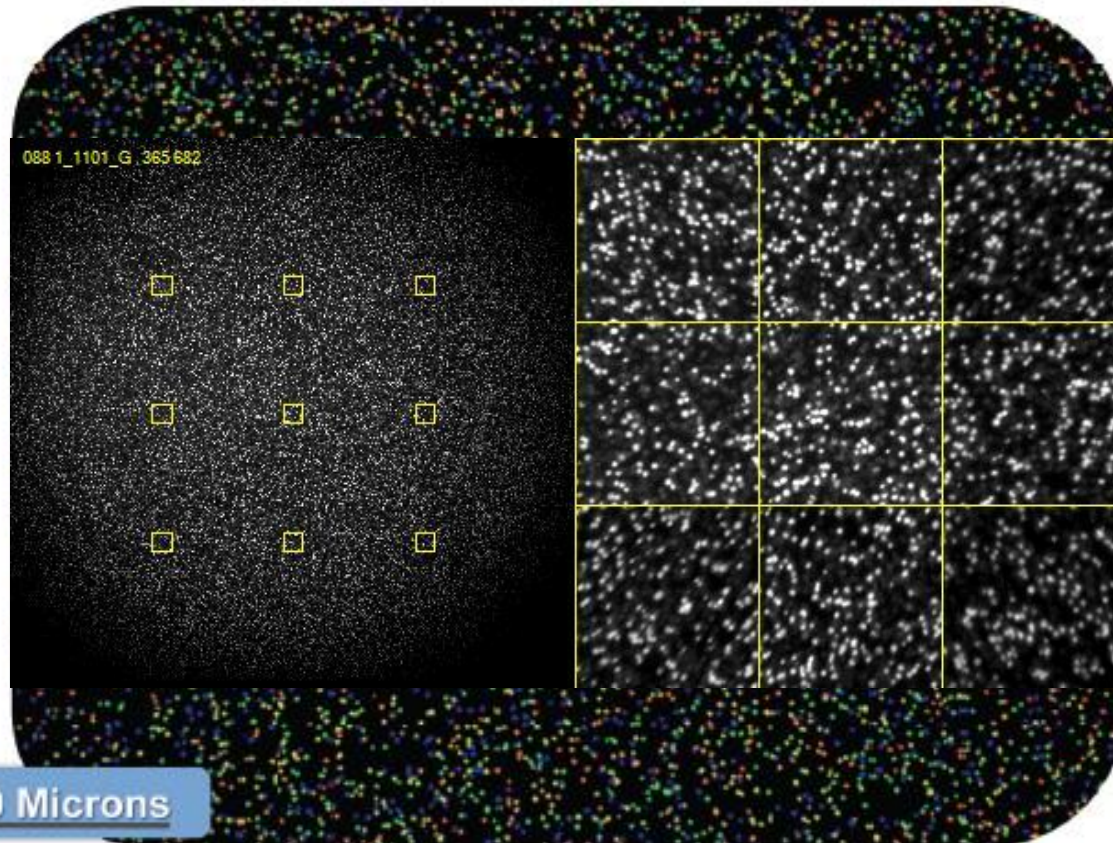


- Amplification clonale par Bridge PCR sur surface solide
- Incorporation de nucléotides fluorescents
- Détection par acquisition d'images à chaque cycle



NGS : SÉQUENÇAGE

- Exemple d'image



Les clusters sont caractérisées par leurs coordonnées géographiques sur la flow cell : entre 500'000 et 1'000'000 /mm²

En réalité, les images Illumina sont en une couleur et le séquenceur prend 4 images à chaque cycle

NGS : EQUIVALENCE DE DONNEES

- La difficulté = la quantité de données générées

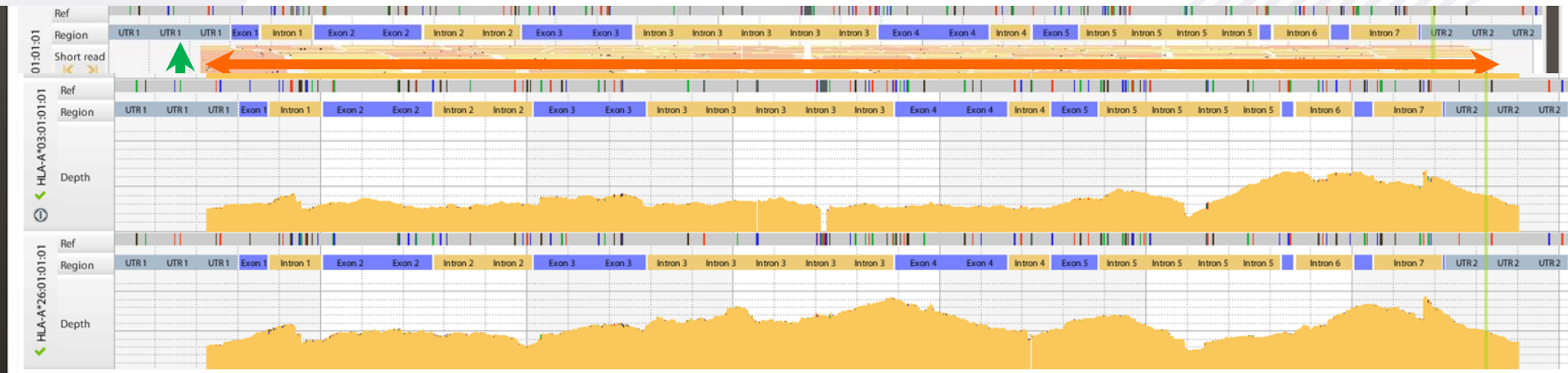
800 abi 3730

1 MiSeq



Informatique !!

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS : VOCABULAIRE



« reads » alignés

Reads : lectures = morceau d'ADN séquencé de taille définie

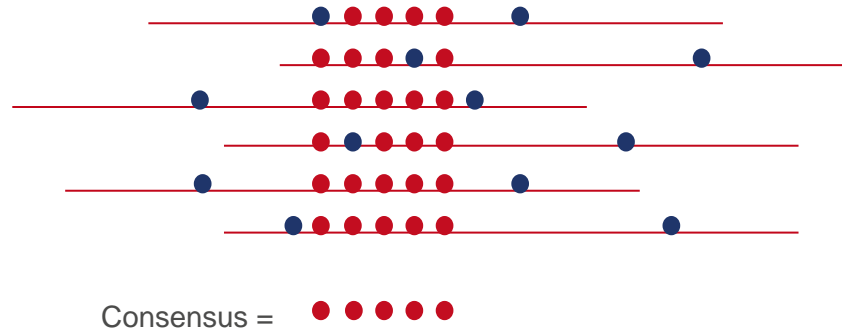
Profondeur : depth = Nombre de reads alignés en une position (ex : 30X – 100X...)

Couverture : coverage = Proportion de la région d'intérêt effectivement séquencée mais fréquemment utilisée pour désigner la profondeur générale au lieu de « profondeur de couverture »

PRINCIPE DE L'ANALYSE NGS

- **Brin VS Brin, les NGS font plus d'erreurs que les séquenceurs capillaires**

➔ Mais on séquence 10-50-100-500-2000 fois le même brin en NGS



Avoir une profondeur de couverture suffisante pour :

- **Eviter les erreurs par substitution**
- **Eviter l'allèle drop out au niveau de l'étape de séquençage**

UNE SEMAINE CLASSIQUE



- Une organisation planifiable et efficace mais peu flexible

NANTES

	Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi
Mati n	Interpreta- tion	Librairie prep 1		Librairie prep 2
Apr ès- midi	PCR 1		PCR 2	

TOURS

	Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi
Mati n	Interpreta- tion		Librairie Tours	Envoi à Nantes
Apr ès- midi		PCR Tours		

Vendredi	Samedi	Dimanche
Quantification librairies	Séquençage	Fin du séquençage
Start Sequençage		Transfert fichiers sur Tours et lancement des analyses

NGS : LE SEQUENCAGE DE NOUVELLE GENERATION

- permet d'étudier les gènes HLA en entier
- **Avantages :**
 - Précision : (Très) haute résolution
 - Organisation : mélange de dizaines d'échantillons séquencés simultanément
- **Inconvénients :**
 - Flexibilité : qq jours
 - Expertise
 - Informatique quantité de données générée
- **Exemple : Résultats**

*Ex : Omixon
HLA Twin V2.1*

State	Allele	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1
✓ Progress	Allele 1	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-A*02:01:01:02L ✓ ● HLA-A*02:01:01:16 ✓ ● HLA-A*02:01:01:01 ⓘ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-B*27:06 ⓘ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-C*03:04:01:01 ⓘ ✓ ● HLA-C*03:04:01:02 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-DQB1*03:01:01:01 ✓ ● HLA-DQB1*03:01:01:03 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-DRB1*12:02:01 ⓘ
✓ Progress	Allele 2	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-A*11:01:01:01 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-B*45:01:01 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-C*16:01:01:01 ✓ ● HLA-C*16:01:01:02 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-DQB1*06:03:01 ⓘ 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ● HLA-DRB1*13:01:01:02 ✓ ● HLA-DRB1*13:01:01:01



LES APPLICATIONS DU TYPAGE HLA

- Transplantations d'organes
- Greffes de Cellules Souches Hématopoïétiques
- Gestion du Registre de donneurs volontaires de moelle osseuse
- HLA et transfusion plaquettaire
- HLA et maladies

TRANSPLANTATION D'ORGANES :

- Organes transplantés par centre :
- À partir de donneurs décédés ou familiaux (rein)

	Angers	Nantes	Tours
Rein	X	X	X
Pancréas		X	
Foie			X
Thorax		X	X

- Réalisation des examens nécessaires à la transplantation
 - **Typage HLA du patient initial**
 - Suivi régulier de l'immunisation
 - **Typage HLA des donneurs potentiels (cadavériques en urgence, vivants par NGS)**
 - Epreuve de compatibilité (cross-match)
 - Suivi post-greffe des anticorps anti-HLA avec recherche d'anticorps anti-greffe

Systeme d'astreinte 24h/24 (NTS et TRS)

GREFFES DE CSH

Cellules souches périphériques (CSP), Moelle osseuse ou Sang de cordon

- **Typage HLA du patient basse ou HAUTE RESOLUTION ++**
- Recherche de **donneurs géno-identiques dans la fratrie** :
 - Ayant hérité des mêmes haplotypes maternel et paternel
- Recherche de **donneurs non apparentés** compatibles sur le fichier national et internationaux
 - HLA 10/10 pour A, B, C, DRB1, DQB1 en haute résolution
 - Typages complémentaires des donneurs potentiels non apparentés et confirmation au laboratoire
- Depuis quelques années, **donneurs haplo-identiques** au sein de la famille
 - 1 seul haplotype en commun : 75% de la fratrie, parents, enfants voire neveux, cousins
- **Unités de sang placentaires** en dernier recours, ou pour les enfants

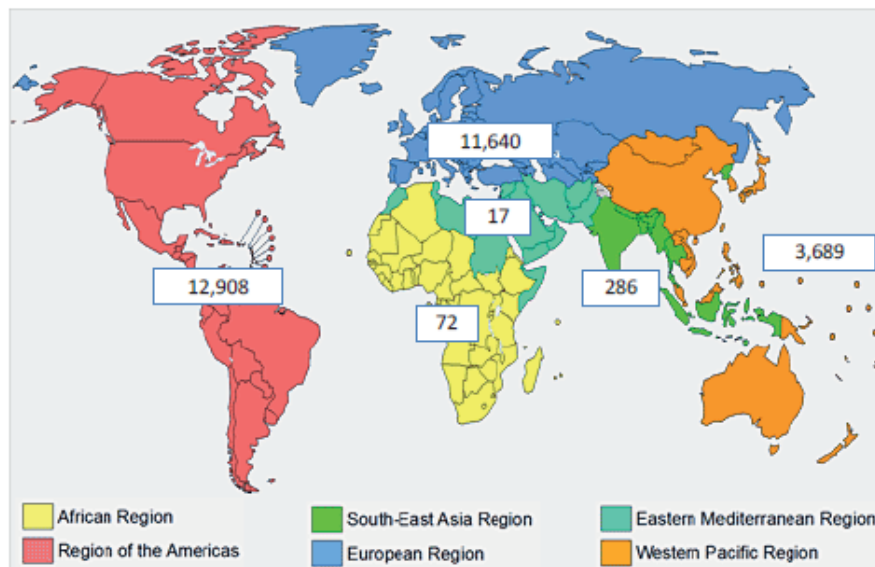
REGISTRE FRANCE GREFFE DE MOELLE

TU VIENS À LA PISCINE ?

J'PEUX PAS
J'AI DON DE
MOELLE OSSEUSE

- Registre de Donneurs Volontaires de Moelle Osseuse
- créé en 1987 par Jean Dausset et Jean Bernard
- Nécessité d'avoir un typage HLA à l'inscription
- Aujourd'hui 30 millions de donneurs dans le monde, ~275000 en France

5.1.5. Nombre de donneurs répertoriés par grandes régions du monde au 31 décembre 2015 (en milliers)



- **France : 15ème position des registres**
 - 8ème position prélèvement de MO (44)
 - 9ème position prélèvement de CSP (144)

HLA ET MALADIES

Certains antigènes HLA sont associés à diverses pathologies
>> Examen des caractéristiques génétiques

Recherche **spécifique** de certains allèles

- **HLA-B*57:01** : prévention des réactions d'hypersensibilité à l'Abacavir
- **HLA-B*27** : spondylarthrite ankylosante, uvéites
- **HLA-B*51** : maladie de Behçet
- **HLA-DQB1*06:02** : narcolepsie
- **HLA-DQ2 (DQB2, DQA5) ou DQ8** : maladie cœliaque
- ...

HLA ET TRANSFUSION PLAQUETTAIRE

CPA HLA Compatible chez patients immunisés avec inefficacité

- **Typage HLA-A et -B des patients**
- **Pool de donneurs avec HLA-A et B connu**

CONCLUSION : RESULTATS

	Sérologie	PCR SSP	PCR SSO	NGS
HLA-A	A2, -	A*02, A*03	A*02:05/32/55... A*03:01/27/...	A*02:05:01 A:03:01:01:02N
HLA-B	B7, B44	B*07, B*44	B*07:02/05/06... B*44:03/73...	B*07:02:01:01 B*44:03:01:01
HLA-C	/	C*07, C*16	C*07:02/11... C*16:01/98...	C*07:02:01:01 C*16:01:01:01
HLA-DRB1	DR4, DR13	DRB1*04, DRB1*13	DRB1*04:04/05... DRB1*13:02	DRB1*04:04:01 DRB1*13:02:03
HLA-DQB1	DQ3, DQ1	DQB1*03, DQB1*06	DQB1*03:02(DQ8) DQB1*06:09/18...	DQB1*03:02:01 DQB1*06:09:01

Transplantation
D'organes



Greffe de CSH



AUJOURD'HUI

- **NGS +++**

- Surtout au **niveau organisationnel**
- **DVMO : registre de meilleure qualité**, moins de typages complémentaires
- Greffe de CSH : **Plus rapide** en cas de recherche de donneurs non apparentés ou haplo
- Transplantation d'organes : par **commodité** et pour évaluation de **l'immunisation au niveau épitopique**

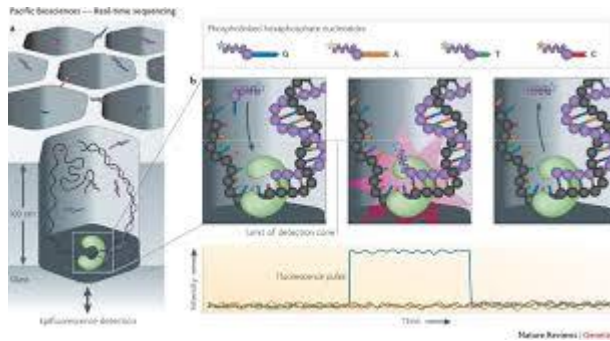
- **MAIS**

- Pas très flexible et **non adapté à l'urgence**
- **Rentabilité du typage au locus** mauvaise (~ prix typage complet)
- **Relevance de mutations hors des zones étudiées avant NGS** pas encore démontrée
- **Organisation entre plusieurs laboratoires** pour diminuer les coûts

PERSPECTIVES

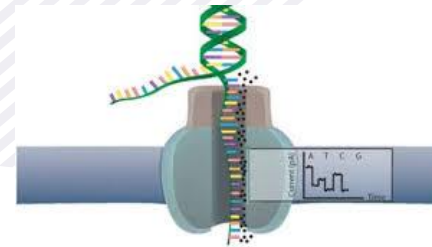
- Fin des protocoles techniques compliqués et de l'amplification clonale
- Augmentation drastique de la taille des séquences lues 500bp >> 10'000-100'000bp

Enzymes au fond de micro puits
Lisent l'ADN en temps réel



- Encore beaucoup d'erreurs

Utilisation de nanopores



Oxford nanopore / **genia**



CONCLUSION



**le
saviez-
vous ?**

**Pour un malade,
la chance de trouver un donneur
compatible est rare, très rare
1 chance sur 1 million.**

**Aidez-nous
à augmenter les chances
de guérison des malades.**

**Rejoignez-nous !
don.de.moelle.osseuse.fr**



**agence de la
biomédecine**
Agence relevant du ministère de la santé