

U 93 R# 483

I. PRESENTATION DE L'EQUIPE.

Equipe de biologie moléculaire comprenant :

D. COHEN, Médecin-Assistant, O. COHEN, Interne des Hôpitaux, A. MARCADET, D.E.A., P. PAUL, D.E.R.B.H., B. SAYAGH, D.E.R.B.H., M.P. FONT, technicienne INSERM.

Cette équipe a été créée en janvier 1982 dans le but d'étudier le polymorphisme des gènes HLA par les techniques de biologie moléculaire. D. COHEN a été se former en 1981 dans le laboratoire du Prof. G.SCHAPIRA pendant une année et s'est entouré de nombreux conseils donnés par F. ROUGEON et son équipe.

La première année a été consacrée à la mise au point, essentiellement, de deux techniques :

a) La technique de Southern permettant de détecter dans la génome des fragments de restriction portant des gènes spécifiques.

b) Le clonage des gènes à partir de banques de cosmides construits dans le laboratoire.

Le laboratoire est réellement fonctionnel depuis septembre 1982.

A. POLYMORPHISME.

La problématique du laboratoire est d'étudier le polymorphisme des gènes HLA de toute classe (I, II et III) en se servant des sondes correspondantes, disponibles, aimablement fournies par d'autres laboratoires (Weissman, Strominger, Peterson, Porter) et du matériel familial exceptionnel dont nous disposons. Il s'agit de 50 familles normales de plus de 4 enfants, volontaires pour venir donner leur sang régulièrement.

Le principe de la détection du polymorphisme des gènes HLA repose sur l'utilisation d'enzymes de restriction qui coupent l'ADN en des sites spécifiques. Deux gènes allèles qui diffèrent dans leur séquence nucléotidiques comporteront des sites de restriction ordonnés différemment déterminant ainsi des fragments de

longueur différente.

Les différences entre ces fragments de différente longueur, hybridant tous avec la même sonde radioactive, sont détectées par la technique de Southern qui nécessite donc successivement :

- extraction de l'ADN
- digestion par enzyme de restriction
- transfert sur filtre
- hybridation et
- autoradiographie

L'écueil le plus important est la difficulté d'obtenir un ADN de qualité régulière pour près de 400 individus.

Une technique particulière, rapide, sûre et robotisée a été mise au point dans le laboratoire. Elle fera l'objet d'une publication.

Par cette nouvelle technique nous avons préparé près de 600mgr de la majorité des membres des familles (actuellement environ 300).

Grâce à l'acquisition de ce matériel l'équipe a pu entamer un travail systématique, utilisant différents enzymes de restriction sur les mêmes individus.

Les premiers résultats sont très prometteurs : Ils sont résumés dans le tableau suivant :

POLYMORPHISM OF CLASS I, II (α and β) HLA GENES

by D. COHEN, L. ASCANIO, M. BUSSON, H. CANN, O. COHEN, C. COULONDRE, A.M.
CHAUSSÉY, M.P. FONT, A. MARCADET, P. PAUL, B. SAYAGH and J. DAUSSET.

DNA analysis by the Southern technique, using HLA probes, has revealed an extensive polymorphism which segregates with HLA haplotypes and correlates with the serologically-defined specificities :

Probe	Enzyme	Size Kb	Antigen(s)	++	+-	-+	==	r	
Class I p B7 (Sood Weissman)	Hind III	5.2	Aw24	4	50	10	4	-0.64	
		5.0	Aw24	14	1	0	53	0.96	
		4.8	A1, 11	22	1	0	45	0.97	
		5.8	A3, 11	7	0	0	6	"1"	
		5.6	A10, 30	6	0	0	7	"1"	
	4.3	A11	3	0	0	10	"1"		
	EcoR V	13.4	B5,7,14,w35	28	3	2	33	0.85	
		8.6	B8	13	1	0	52	0.95	
		4.6	Bw35	9	1	0	56	0.94	
		10.0	B40 (Cw3,w5)	5	0	0	63	"1"	
		2.3	B15	9	6	0	53	0.73	
	EcoR I	7.0	B14, Cw5	16	2	3	32	0.80	
	Class II DC α (Auffray Strominger)	Hind III	10	DR1,2 (MT1)	7	0	0	15	"1"
			6.5	DR3,5 (MT2)	11	2	2	7	0.56
			5.7	DR4,7 (MT3)	11	1	0	10	0.91
Class II DC β (Larhammar Peterson)	EcoR I	5.5	DR7	2	0	0	19	"1"	
		4.4	DR3	7	0	1	13	0.91	
		2.0	DR2	4	0	3	14	0.69	
	Bgl I	a	DR1	3	0	0	18	"1"	
		b	DR4,5 (MB3)	12	0	0	9	"1"	
		c	DR3,7 (MB2)	8	0	2	11	0.82	

Other class I fragments of high frequency do not correlate with known specificities, which suggests that other class I genes are less polymorphic. Other class II fragments of low frequency do not correlate, suggesting the existence of other extensive polymorphisms not serologically detected. The organisation of the human MHC, both in normal individuals and in patients, can be approached by this tool.

Ce travail est entièrement original. Il a permis de mettre en évidence des corrélations très fortes entre la présence d'un fragment, bien déterminé par sa taille par l'enzyme qui l'a produit et la souche qui l'a déterminé et les antigènes HLA sérologiquement définis.

Une première publication montrant la corrélation avec HLA-B8 a déjà été publiée dans PNAS et d'autres publications montrant les autres corrélations sont en cours portant aussi bien sur les antigènes de classe I et classe II.

Ces fragments spécifiques détectés chez les enfants des familles étudiées, ségrégent tous avec le complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme. Dans les familles comportant un recombinaison il est possible de localiser les fragments dans les régions correspondantes.

Une telle étude systématique a permis de définir la fréquence, dans la population, des marqueurs ainsi définis. Ces fréquences normales peuvent être comparées aux fréquences observées dans les populations de malades porteurs de maladies associées avec HLA.

Dès maintenant, deux maladies ont fait l'objet d'une étude préliminaire : le diabète juvénile et la sclérose en plaques.

Perspectives

Le travail systématique déjà entrepris sera poursuivi et étendu de façon à déterminer les fréquences des fragments que, lorsqu'ils sont polymorphes, nous proposons de dénommer allogénotypes.

Nous nous proposons de tester les parents de 50 familles avec 6 enzymes et au moins 6 sondes : classe I, classe II β DC, DR, SB, classe II α DC et complément C4A.

L'analyse permettra d'établir l'existence de corrélation avec les produits des gènes détectés immunologiquement avec d'éventuels déséquilibre de liaison entre eux ou avec les produits.

Nous nous proposons en même temps d'établir les cartes haplotypiques de ces marqueurs en étudiant en même temps que les

parents, au moins deux enfants informatifs, (c'est-à-dire possédant les 4 haplotypes HLA). Ainsi, une carte haplotypique, c'est-à-dire l'organisation génétique de la région sera-t-elle établie sur l'étude d'environ 200 haplotypes. Ceci est crucial pour la compréhension de l'organisation des gènes de classe II qui est particulièrement difficile à établir par les moyens classiques.

Nos premiers résultats nous font prévoir l'existence d'au moins 200 à 300 allogénotypes de classe II car avec une sonde et un enzyme nous avons observé environ 25 allogénotypes, et nous utiliserons 6 enzymes et 3 sondes d'homologie partielle (DR, DC, SB).

Parallèlement, seront étudiées, par les mêmes procédés, les mêmes sondes et les mêmes enzymes de populations de malades porteurs de maladies associées ou liées avec HLA.

On espère ainsi trouver des marqueurs plus fortement, positivement ou négativement, corrélés avec la maladie. A l'extrême ces marqueurs pourraient être spécifiques de la maladie et servir ainsi au diagnostic préventif.

Nous devons souligné que malgré le démarrage récent de ce laboratoire, il fait déjà figure de laboratoire de référence, non seulement national mais international pour ce type d'étude. Les sondes HLA lui sont adressés spontanément pour être étudiées sur son matériel familial exceptionnel. Ainsi, les sondes SB et DR lui ont été adressées avant publication.

De même, en ce qui concerne un malade pour lequel tout typage HLA était impossible (syndrome de lymphocyte nu) celui-ci a été possible au niveau des gènes.

B. ISOLEMENT ET CLONAGE DES GENES HLA.

Une banque de cosmides a été construite à partir de l'ADN d'un individu bien caractérisé par les marqueurs classiques et allogénotypiques, et d'autre part, ayant donné naissance à deux enfants recombinant à deux sites différents d'un même haplotype HLA. L'isolement de clone classe I et classe II est en cours.

Perspectives

L'obtention de différents clones HLA de classe I ou II permettra une étude de relation entre structure et fonction des gènes.

Dans une première étape, les clones classe I seront étudiés de façon à déterminer lequel, ou lesquels, parmi l'ensemble des gènes de classe I porte, ou portent, un allogénotope corrélant avec un produit HLA sérologiquement défini. Ces clones ainsi sélectionnés seront ensuite testés dans des expériences de transfection (en collaboration avec D. FRADELIZI), en utilisant des cellules-hôtes humaines. Le but, à moyen terme, est d'obtenir une batterie de lignées humaines lymphoblastoïdes transformées chacune par un seul gène HLA. A plus long terme cette batterie pourra faire l'objet d'études biochimiques et fonctionnelles, en collaboration avec les équipes de D. CHARRON et J.P. LEVY.

Dans une deuxième étape, une étude similaire pourra être entreprise pour les gènes de classe II.

Enfin, les gènes ainsi classés et caractérisés seront soumis à une étude de séquence des nucléotides (en collaboration avec l'équipe de F. GALIBERT).

En conclusion, un laboratoire très actif, orienté vers les nouvelles techniques de la biologie moléculaire voit s'ouvrir devant lui des perspectives considérables, et on peut exprimer la crainte que les moyens fournis ne correspondent pas toujours à son programme ambitieux.

Dès maintenant, il y a manque de place criant. Le personnel est composé presque uniquement d'étudiants dont on voit mal l'avenir statutaire.

Pour mener à bien ce programme d'une manière concurrentielle sur le plan international, il faudrait tripler la place disponible et l'équipe. Par ailleurs, il ne faut pas cacher que les techniques utilisées sont onéreuses.

Cependant, il est bien certain que toutes les percées nouvelles que l'on attend dans la connaissance du système HLA et

et donc en immunologie fondamentale dépendant du développement parallèle de ce laboratoire spécialisé et de l'ensemble du laboratoire de sérologie et de cellulologie HLA.

et donc en immunologie fondamentale dépendant du développement parallèle de ce laboratoire spécialisé et de l'ensemble du laboratoire de sérologie et de cellulologie HLA.

PUBLICATIONS

1982.

1. ASCANIO L., PAUL P., MARCADET A., MAHOUY G., FRADELIZI D., COHEN D., DAUSSET J. : Polymorphisme des gènes HLA (I) : Mise en évidence d'une étroite corrélation entre des fragments d'ADN déterminés par l'enzyme de restriction Bgl I et des antigènes HLA de classe I. C.R. Acad. Sci. Paris, 295, série III, 433-437, 1982.

1983.

1. CANN H.M., ASCANIO L., PAUL P., MARCADET A., DAUSSET J., COHEN D. : Polymorphic restriction endonuclease fragment segregate and correlates with the gene for HLA-B8. P.N.A.S. 80, 1665-1668, 1983.
2. DAUSSET J. : Nouvelles perspectives concernant HLA et maladies. Conférence Européenne de formation en Histocompatibilité, Strasbourg 16-18 mars 1983.
3. COHEN D., ASCANIO L., BUSSON M., CANN H., FONT M.P., COULONDRE C., CHAUSSEY A.M., FONT M.P., MARCADET A., PAUL P., SAYAGH B., DAUSSET J. : Polymorphism of class I, II (and) HLA genes. Second meeting on Cloning of the HLA and H-2 Regions. 17-19 avril 1983, Warrenton, Virginie, U.S.A.
4. COHEN D., CANN H., FONT M.P., MARCADET A., PAUL P., SAYAGH B., BUSSON M., DAUSSET J. : Allogenotypes of HLA class I genes correlate with HLA-A, B, C specificities, PNAS (sous presse)
5. COHEN D., COHEN O., MARCADET A., FONT M.P., COULONDRE C., CHAUSSEY M., PAUL P., SAYAGH B., FRADELIZI D., HORS J., DESCHAMPS M., DAUSSET J. : A systematic study of allogenotypes of HLA class II genes in normal and diseased individuals, shows a high degree of polymorphism(en preparation)