

JULIE ST-LAURENT

**CARACTÉRISATION ET IDENTIFICATION  
D'ANTIGÈNES ÉRYTHROCYTAIRES LIANT LES  
ANTICORPS DE TYPE HTLA**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en microbiologie  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE, DE MICROBIOLOGIE ET  
DE BIO-INFORMATIQUE  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2011

## Résumé

Les anticorps plasmatiques de type HTLA constituent un problème fréquemment rencontré dans les laboratoires d'immunologie érythrocytaire. Leurs caractéristiques particulières rendent d'autant plus difficile l'établissement de méthodes permettant de les éliminer, augmentant le risque de camoufler un anticorps d'importance clinique significative. Des études ont démontré que l'utilisation du récepteur du complément de type 1 sous forme soluble pourrait potentiellement neutraliser un certain nombre de ces anticorps. Certains auteurs associent également ces anticorps à la sous-classe 4 des IgG. Diverses méthodes de déplétion des HTLA basées sur ces observations ont été testées dans le but d'améliorer le typage de ces échantillons. Ces travaux ont démontré que l'utilisation de peptides synthétiques de CR1 représentait un bon potentiel pour y parvenir. Des analyses en biologie moléculaire ont également été réalisées dans le but d'établir le profil du CR1 d'échantillons Yk<sup>a</sup>-, un antigène associé aux HTLA dont la base moléculaire est inconnue.

## **Avant-propos**

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dre Maryse St-Louis, ainsi que son équipe, pour m'avoir accueillie tout au long de ces années et m'avoir fait bénéficier de leur grande expérience et de leur disponibilité.

Merci également à mon co-directeur, Dr André Darveau ainsi qu'aux autres membres de mon comité d'encadrement, Drs Sonia Néron et Michel Vincent, pour leur temps et leurs précieux conseils. Merci aux membres de Recherche et développement d'Héma-Québec, qui ont contribué à faire de ce projet un défi chaque jour plus divertissant et enrichissant.

Je tiens à remercier le personnel du Laboratoire de référence et des cellules souches d'Héma-Québec pour les échantillons et la réalisation des titrages et des agglutinations. Merci également à Jacynthe Lacroix et Lee-Ann McKinnon pour leur aide au cours des stages qu'elles ont réalisés dans notre équipe, ainsi qu'à Nathalie Dussault pour les photos des cartes gel.

Merci aux membres de ma famille et à mes amis qui ont contribué à leur façon à l'aboutissement de ce long parcours.

Finalement, je remercie Héma-Québec, le CRSNG et le FQRNT pour le soutien financier reçu tout au long de ce projet.

## Table des matières

Résumé.....	i
Avant-propos .....	ii
Table des matières .....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures .....	vi
Liste des abréviations.....	vii
1. Introduction.....	1
1.1 Groupes sanguins et transfusion .....	1
1.1.1 Les antigènes érythrocytaires.....	1
1.1.2 Concept d'importance clinique.....	2
1.2 Anticorps et transfusion .....	3
1.2.1 Les immunoglobulines.....	3
1.2.2 Les immunoglobulines en immunologie érythrocytaire .....	4
1.3 Les anticorps de haut titre et de faible avidité .....	6
1.3.1 Caractéristiques générales.....	6
1.3.2 Les immunoglobulines G4.....	7
1.4 Le système Knops .....	9
1.4.1 Les antigènes du système Knops .....	9
1.4.2 Le récepteur du complément de type 1 .....	10
1.5 Problématique HTLA .....	16
1.6 Contexte de recherche et hypothèses .....	17
1.7 Objectifs.....	18
2. Matériel et méthodes.....	19
2.1 Échantillons .....	19
2.2 Déplétion des IgG4 du plasma.....	20
2.2.1 Échantillons .....	20
2.2.2 Couplage des anti-IgG4 humaines .....	20
2.2.3 Déplétion des IgG4 .....	20
2.2.4 Validation de l'efficacité et de la spécificité de la déplétion.....	21
2.2.5 Validation de la spécificité de la déplétion en ELISA.....	21
2.3 Étude des sous-classes des HTLA en cytométrie en flux .....	22
2.4 Dosage des IgG4 totaux du plasma.....	23
2.5 Déplétion des anti-Kn <sup>a</sup> du plasma avec peptides synthétiques de CR1 .....	23
2.5.1 Peptides synthétiques de CR1 .....	23
2.5.2 Couplage des peptides sur système NHS SpinTrap HP.....	24
2.5.3 Déplétion des anti-Kn <sup>a</sup> du plasma.....	24
2.5.4 Validation de l'efficacité de la méthode en ELISA .....	25
2.6 Titrages et tests en agglutination indirecte des échantillons déplétés.....	25
2.7 Analyse de la base moléculaire de l'antigène Yk <sup>a</sup> .....	26
2.7.1 Échantillons .....	26
2.7.2 Génotypage des antigènes Kn, McC et S11/2 par PCR-RFLP .....	27
2.7.3 Analyse des antigènes KCAM, S13 et Yk <sup>a</sup> par PCR et séquençage.....	28
2.7.4 Analyse des polymorphismes quantitatifs par PCR et séquençage .....	29
2.7.5 Analyse du polymorphisme quantitatif HindIII de l'intron 27 par PCR-RFLP .....	30

2.7.6	Évaluation de la densité de CR1/E en cytométrie en flux .....	31
2.7.7	Analyse du polymorphisme de taille du CR1 .....	31
2.7.8	Séquençage du peptide signal du CR1 .....	33
3.	Résultats .....	34
3.1	Élimination des HTLA par déplétion des IgG4 .....	34
3.1.1	Mise au point de la méthode .....	34
3.1.2	Titration des échantillons déplétés en IgG4 .....	35
3.1.3	Analyse en cytométrie en flux des sous-classes HTLA .....	37
3.1.4	Dosage des IgG4 totales dans les plasmas HTLA .....	38
3.2	Neutralisation des anti-Kn <sup>a</sup> à l'aide de peptides synthétiques de CR1 .....	39
3.2.1	Évaluation de l'efficacité de la neutralisation .....	39
3.2.2	Titrages et tests en agglutination indirecte .....	42
3.3	Analyse de la base moléculaire de l'antigène Yk <sup>a</sup> .....	44
3.3.1	Génotypage des antigènes du système Knops .....	44
3.3.2	Analyse des polymorphismes quantitatifs .....	45
3.3.3	Estimation du CR1/E .....	46
3.3.4	Allèles F et S .....	47
3.3.5	Séquençage du peptide signal .....	48
4.	Discussion .....	49
4.1	Neutralisation des HTLA du plasma .....	49
4.2	Analyse de la base moléculaire de l'antigène Yk <sup>a</sup> .....	54
5.	Conclusion .....	58
	Bibliographie .....	59

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b> : Propriétés physiologiques des immunoglobulines G humaines .....	6
<b>Tableau 1.2</b> : Antigènes érythrocytaires associés à la production d'anticorps HTLA .....	7
<b>Tableau 1.3</b> : Allèles d'expression faible et élevée du CR1 .....	14
<b>Tableau 1.4</b> : Antigènes du système Knops et fréquences dans la population caucasienne	15
<b>Tableau 2.1</b> : Profil des différents échantillons cliniques utilisés .....	19
<b>Tableau 2.2</b> : Peptides synthétiques de CR1 .....	24
<b>Tableau 2.3</b> : Polymorphismes du système Knops et résultats attendus au génotypage .....	28
<b>Tableau 2.4</b> : Amorces pour l'analyses des polymorphismes quantitatifs 3066G>T et 5480C>G.....	29
<b>Tableau 3.1</b> : Titrage des échantillons avec et sans IgG4 .....	37
<b>Tableau 3.2</b> : Titrage des échantillons traités avec peptides de CR1 .....	42
<b>Tableau 3.3</b> : Phénotype attendu suite au génotypage des antigènes du système Knops ....	45
<b>Tableau 3.4</b> : Analyse moléculaire des polymorphismes quantitatifs du CR1 .....	46

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> : Représentation schématique d'un globule rouge et des différents antigènes érythrocytaires .....	1
<b>Figure 1.2</b> : Structure d'une immunoglobuline G .....	4
<b>Figure 1.3</b> : Représentation schématique de la protéine CR1, incluant les 3 sites de liaison au C3b/C4b .....	10
<b>Figure 1.4</b> : Régulation de l'activation de la cascade du complément par le CR1 .....	12
<b>Figure 1.5</b> : Élimination des complexes immuns opsonisés par le C3b via le CR1 .....	12
<b>Figure 1.6</b> : Disposition du CR1 à la surface du globule rouge .....	14
<b>Figure 2.1</b> : Agglutination en carte gel .....	26
<b>Figure 2.2</b> : Allèles F et S du CR1 et liaison des amorces pour analyse des polymorphismes de taille.....	32
<b>Figure 3.1</b> : Efficacité et spécificité de la déplétion des IgG4 .....	35
<b>Figure 3.2</b> : Dosage des IgG totales dans les plasmas déplétés et non-déplétés en IgG4 ....	36
<b>Figure 3.3</b> : Analyse des sous-classes HTLA en cytométrie en flux .....	38
<b>Figure 3.4</b> : Dosage des IgG4 dans des plasmas HTLA .....	39
<b>Figure 3.5</b> : Dosage des IgG totaux dans les plasmas traités avec peptides de CR1 .....	40
<b>Figure 3.6</b> : Dosage des IgG totales éluées des billes .....	41
<b>Figure 3.7</b> : Test en agglutination indirecte des échantillons déplétés .....	43
<b>Figure 3.8</b> : Test en agglutination indirecte des éluats de billes couplées aux peptides de CR1 .....	44
<b>Figure 3.9</b> : Densité de CR1 par érythrocyte chez les Yk <sup>a</sup> - .....	47

## Liste des abréviations

- BSA** : *Bovine Serum Albumin*  
**C4bp**: *C4 binding protein*  
**Cas**: Caséine  
**CR1/E**: CR1 par érythrocyte  
**CR1**: *Complement Receptor type 1*  
**CR2**: *Complement Receptor type 2*  
**DAF**: *Decay Accelerating Factor*  
**EDTA**: Éthylènediamine tétra-acétique  
**ELISA**: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
**FBS**: *Fetal Bovine Serum*  
**FcR**: Récepteur Fc  
**FITC**: *Fluorescein isothiocyanate*  
**HTLA**: *High Titer, Low Avidity*  
**Ig**: Immunoglobuline  
**IL-2R**: Récepteur de l'interleukine 2  
**JMH**: John Milton Hagen  
**Kn**: Knops  
**LHR**: *Long Homologous Repeat*  
**LISS**: *Low Ionic Strength Saline*  
**MAIEA**: *Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Erythrocyte Antigens*  
**McC**: McCoy  
**MCP**: *Membrane Cofactor Protein*  
**MFI**: *Mean of Fluorescence Intensity*  
**MHNN**: Maladie hémolytique du nouveau-né  
**PBS**: *Phosphate Buffered Saline*  
**PCR**: *Polymerase Chain Reaction*  
**PFA**: Paraformaldéhyde  
**PfEMP1**: *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*  
**PVDF**: *Polyvinylidene Fluoride*  
**RT-PCR**: *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*  
**SCR**: *Short Consensus Repeat*  
**SDS-PAGE**: *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*  
**Sl**: Swain-Langley  
**TBE**: Tris-Borate-EDTA  
**TBS**: *Tris Buffered Saline*  
**TMB**: Tétraméthylbenzidine  
**TTBS**: *Tween 20-Tris Buffered Saline*  
**Tw**: Tween 20

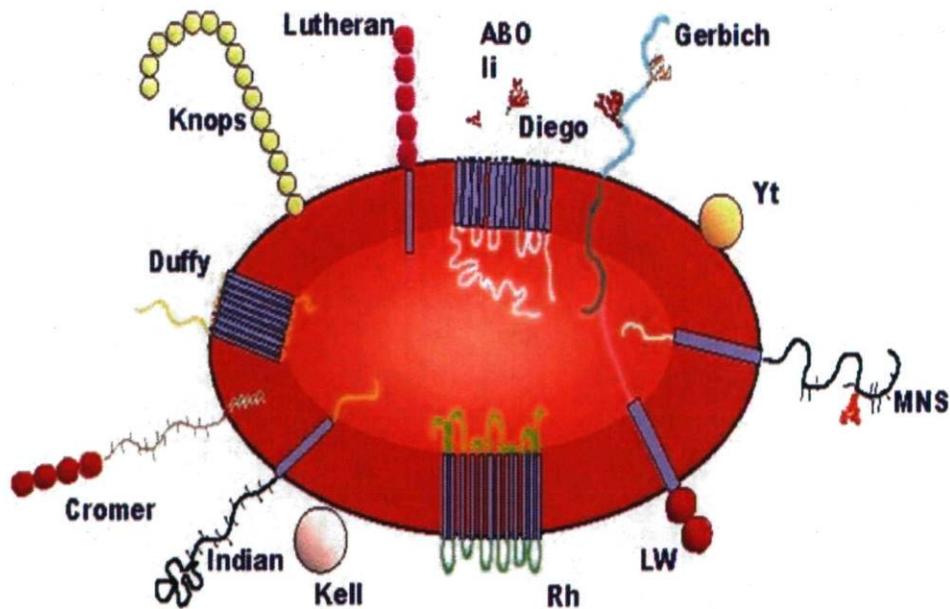
Yk<sup>a</sup>: York a

# 1. Introduction

## 1.1 Groupes sanguins et transfusion

### 1.1.1 Les antigènes érythrocytaires

L'*International Society of Blood Transfusion* (ISBT) reconnaît actuellement 30 groupes sanguins, regroupant plus de 317 antigènes érythrocytaires [1]. Un groupe comprend tous les antigènes régulés par un même locus génique ou par un ensemble de gènes hautement liés qui ne présentent pas ou peu de recombinaison entre eux [2]. Il peut s'agir de protéines (antigène D), de glycoprotéines ou de glycolipides (antigènes ABO) exerçant des fonctions diverses à la surface des globules rouges (transport, adhésion, structure, etc.) (Figure 1.1). La majorité de ces molécules est synthétisée et ancrée dans la membrane de la cellule au cours de la maturation de la lignée érythroïde. Il existe cependant quelques antigènes érythrocytaires qui sont produits et sécrétés par d'autres types cellulaires, puis adsorbés à la surface des globules rouges.



Slide courtesy of E. Sjöberg Wester

**Figure 1.1 : Représentation schématique d'un globule rouge et des différents antigènes érythrocytaires.**  
Adaptée de E. Sjöberg Wester [3]

L'incidence des différents antigènes au sein d'une population est grandement variable et influencée par l'origine ethnique des individus. Deux catégories ont cependant été créées pour permettre de classer ceux présentant une incidence particulière. Ainsi, on définit comme étant de haute fréquence (publics) les antigènes présentant une fréquence de plus de 99% au sein d'une même population. À l'inverse, on nommera antigènes de basse fréquence (privés) ceux présentant une incidence de moins de 1% [2].

### *1.1.2 Concept d'importance clinique*

Les 317 antigènes sanguins connus ne revêtent pas tous la même importance dans un contexte transfusionnel. Certains sont d'importance clinique élevée, c'est-à-dire qu'ils sont associés à des réactions hémolytiques transfusionnelles ou à la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN), une affection au cours de laquelle les anticorps maternels induisent la destruction massive des érythrocytes fœtaux. D'autres ne sont pas cliniquement significatifs et ne sont généralement pas pris en considération lors de la sélection du culot globulaire à transfuser. Les mécanismes régissant l'importance clinique des antigènes ne sont pas réellement connus, mais on peut supposer l'influence d'une multitude de facteurs tels la nature antigénique, la classe d'immunoglobuline (IgM, IgG) produite et la densité antigénique.

L'organisme peut développer naturellement des anticorps dirigés contre des antigènes érythrocytaires. Cette immunisation est généralement due à la présence d'antigènes ubiquitaires dans l'environnement [2]. Ce phénomène s'applique surtout aux antigènes du système ABO. Les anticorps dirigés contre les autres antigènes résultent généralement d'une alloimmunisation contre des globules rouges humains. La transfusion et la grossesse sont les deux sources majeures de contact avec des globules rouges étrangers. On peut également observer l'apparition d'autoanticorps dans certains cas de maladie auto-immune ou d'allogreffe.

## 1.2 Anticorps et transfusion

### 1.2.1 Les immunoglobulines

Les mécanismes d'alloimmunisation contre les globules rouges humains ne sont pas bien compris. On sait cependant que les cellules transfusées, avec le temps, se dégradent et libèrent une multitude de molécules dans la circulation sanguine [4]. Ces molécules sont prises en charge par les cellules présentatrices d'antigènes, ce qui déclenche une cascade complexe de sécrétion et d'activation cellulaire qui ne sera pas abordée ici. Ce qu'on sait cependant, c'est que cet enchaînement d'étapes mène à la production des immunoglobulines qui sont d'intérêt en transfusion.

Les immunoglobulines sont des protéines monomériques ou multimériques sécrétées par les lymphocytes B suite à une immunisation contre un antigène spécifique. Elles sont constituées de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques, présentant une masse moléculaire d'environ 50 et 25 kDa, respectivement. Ces chaînes sont liées entre elles par des ponts disulfures. La digestion de l'immunoglobuline par la pepsine génère deux fragments :  $F(ab')_2$  et Fc. Le fragment  $F(ab')_2$  est constitué de deux Fab, chacun comportant une chaîne légère et une section de chaîne lourde. C'est dans cette région que se trouve le paratope, la région variable de la molécule qui assure généralement les interactions antigène-anticorps (Figure 1.2). Une immunoglobuline monomérique est donc dite bivalente, puisqu'elle possède deux Fab pouvant potentiellement reconnaître chacun un épitope. Quant au fragment Fc, il comporte les deux portions de chaînes lourdes restantes. Il s'agit d'une portion constante de l'immunoglobuline à laquelle on attribue généralement les fonctions effectrices de la molécule. C'est notamment cette partie qui interagit avec les récepteurs Fc (FcR) de plusieurs cellules immunitaires ainsi que les molécules du complément. C'est également cette portion, de par sa structure moléculaire, qui définit l'isotype et la sous-classe de l'immunoglobuline ainsi que les propriétés qui leur sont spécifiques [5].

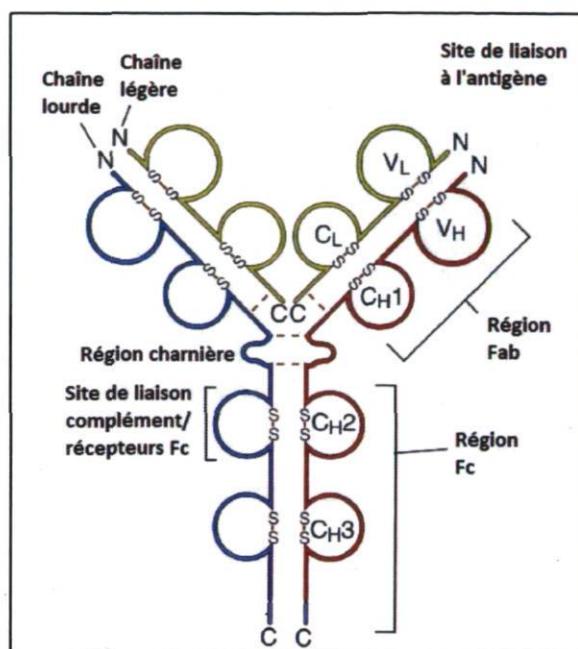


Figure 1.2 : Structure d'une immunoglobuline G. Adaptée de Abbas et Lichtman [6]

L'IgM, une immunoglobuline pentamérique, est toujours le premier isotype sécrété en réponse à un antigène spécifique. Il en existe quatre autres (IgG, IgA, IgD et IgE), dont la production sera influencée par les signaux reçus lors de la maturation de la réponse antigénique du lymphocyte B. Par exemple, les IgA sont souvent associées à l'immunité mucoale, tandis que les IgE sont reconnues pour leur rôle au cours des réponses hypersensibles ou antiparasitaires. En immunologie érythrocytaire, ce sont généralement des IgG et des IgM qui sont observées et qui revêtent donc une importance plus grande pour les sérologistes.

### 1.2.2 Les immunoglobulines en immunologie érythrocytaire

Parce qu'il est polymérique, l'IgM peut lier une grande quantité d'antigènes et est ainsi doté d'un grand pouvoir de réticulation. Les IgM ont donc la capacité de générer de gros agrégats lorsque mis en contact avec des cellules portant leur antigène cible. La plupart des anticorps du système ABO sont de ce type, ce qui justifie l'importance majeure de ce système en transfusion. Par contre, il semble que la capacité des IgM à activer la cascade du complément ait un rôle plus crucial dans l'induction d'une réponse transfusionnelle

grave [4]. En raison de leur grande taille, ils sont incapables de traverser la barrière placentaire et n'induisent pas la maladie hémolytique du nouveau-né. Finalement, dans les laboratoires d'immunologie érythrocytaire, les IgM sont souvent associées au phénomène d'agglutinines froides. Certains anticorps dirigés contre les globules rouges sont réactifs à des températures de moins de 25°C. Ils ne sont donc pas cliniquement significatifs, mais peuvent induire des biais important lors du typage des échantillons de sang [4].

Les anticorps dirigés contre les globules rouges peuvent également être de type IgG sécrété sous forme monomérique. Comme les IgM, ils peuvent être en cause lors de réactions post-transfusionnelles, mais ils sont également en cause dans les cas de MHNN [4, 7]. On connaît actuellement quatre sous-classes d'IgG ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ) en circulation chez l'humain et classées de un à quatre en fonction de leur taux sérique moyen (9, 3, 1 et 0,5 mg/ml) [8]. Chacune de ces sous-classes se distingue d'une part par des différences moléculaires au niveau de la région constante de la chaîne lourde. D'autre part, on peut les reconnaître par leurs propriétés fonctionnelles (Tableau 1.1). Par exemple, les IgG1 et les IgG3 sont connues comme étant le plus souvent impliquées au cours d'une réaction immunitaire par leur forte capacité à lier le complément et les récepteurs Fc [9]. Les anticorps dirigés contre des antigènes érythrocytaires d'importance clinique appartiennent souvent à ces deux sous-classes. Les IgG2, quant à elles, sont souvent dirigées contre des polysaccharides tandis que les IgG4 appartiennent pour leur part à une catégorie bien spéciale et encore mal comprise.

**Tableau 1.1 : Propriétés physiologiques des immunoglobulines G humaines.** Adapté de Murphy *et al.* [8]

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
<b>Chaîne lourde</b>	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$
<b>Masse moléculaire (kD)</b>	146	146	165	146
<b>Taux sérique (mg/ml)</b>	9	3	1	0,5
<b>Activation de la voie classique du complément</b>	++	+	+++	-
<b>Activation de la voie alterne du complément</b>	-	-	-	-
<b>Transfert placentaire</b>	+++	+	++	+/-
<b>Liaison aux macrophages et autres phagocytes</b>	+	-	+	+/-

### 1.3 Les anticorps de haut titre et de faible avidité

#### 1.3.1 Caractéristiques générales

La classification des anticorps érythrocytaires ne se limite pas qu'à leur isotype. Dans les années 1960 et 1970, alors que plusieurs antigènes sanguins étaient encore inconnus, les sérologistes ont observé l'existence d'anticorps aux caractéristiques particulières dans le plasma de patients [10]. Ces anticorps, de type IgG, possédaient des réactions variables et parfois difficiles à reproduire. Ils démontraient également une réactivité semblable et ce, quelle que soit leur dilution. De plus, leurs antigènes cibles semblaient se retrouver chez 90 à 99% des individus. Ces anticorps semblaient donc reconnaître des antigènes de haute fréquence (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2 : Antigènes érythrocytaires associés à la production d'anticorps HTLA.**  
Adapté de Issit *et al.* [10]

<p>Catégorie 1 : Antigènes généralement définis par des anticorps de type HTLA</p> <p>Cs<sup>a</sup>, Yk<sup>a</sup>, Kn<sup>a</sup>, Kn<sup>b</sup>, McC<sup>a</sup>, McC<sup>b</sup>, Sl1, Sl2, Sl3, Ch, Rg, JMH</p>
<p>Catégorie 2 : Antigènes définis par des anticorps quelques fois de type HTLA</p> <p>Gy<sup>a</sup>, Hy, Jo<sup>a</sup> (Jc<sup>a</sup>)</p>
<p>Catégorie 3 : Antigènes définis par des anticorps, dont quelques-uns de type HTLA</p> <p>Ge2, Ge3, Yt<sup>a</sup>, Lu<sup>b</sup>, para-Lu, para-Kell, système Cr, Fy3</p> <p>Co<sup>a</sup>, Di<sup>b</sup>, In<sup>b</sup>, Vel</p>

Aussi, certains étaient partiellement neutralisés par des pools de plasma humain (réservoir d'antigènes sanguins solubles) et demeuraient présents malgré plusieurs rondes d'adsorption sur globules rouges positifs. Finalement, ils semblaient être de faible importance clinique et ne pas induire l'élimination massive des globules rouges malgré l'opsonisation lors de la transfusion. Ce sont ces caractéristiques particulières qui leur ont valu le nom de HTLA (*High Titer, Low Avidity* ou *High Titer, Low Antigen density*). Leur faible avidité est toutefois questionnable. On pourrait supposer que cette propriété est simplement due à une faible densité antigénique à la surface des globules rouges [10]. En effet, plusieurs des antigènes dont les anticorps sont connus pour avoir des caractéristiques HTLA sont exprimés à des niveaux variables sur les globules rouges et leur niveau d'expression peut fluctuer au cours de la vie du globule rouge ainsi que celle de l'individu. La raison pour laquelle certains patients développent des HTLA demeure incertaine. On sait toutefois qu'il s'agit généralement de patients multitransfusés et ainsi exposés aux multiples polymorphismes retrouvés de manière naturelle dans la population.

### 1.3.2 Les immunoglobulines G4

Plusieurs anticorps de type HTLA ont été associés à la sous-classe 4 des immunoglobulines G. C'est du moins le cas pour les anticorps dirigés contre les systèmes

Knops, JMH (John Milton Hagen) et Chido-Rodgers [11, 12]. Les IgG4 possèdent des caractéristiques très spéciales qui leur sont propres (Tableau 1.1). D'abord, leur interaction avec la molécule C1q du complément et les récepteurs Fc est beaucoup plus faible que pour les autres sous-classes. Leur capacité à induire une réponse immunitaire est donc très limitée [5]. Ils ne traversent que très faiblement la barrière placentaire, ce qui signifie que leur rôle potentiel dans les cas de MHNN est relativement faible. Il est maintenant connu qu'il se produit *in vivo* des échanges de demi-molécules (une chaîne lourde et une chaîne légère) d'IgG4 au cours d'un processus nommé *Fab-arm exchange* [13-15]. Ce phénomène serait dû non seulement à la modification d'un acide aminé dans la région charnière de l'IgG4, mais est également dépendant du domaine CH3. Les IgG4 sont donc considérées comme étant généralement des molécules hétéro-bivalentes [16]. Autrement dit, ils possèdent deux paratopes de spécificité différente.

Cette conclusion a pu être tirée suite à l'observation que les IgG4 dans le sérum de patients ayant développé des anticorps anti-pollen et anti-acariens réagissaient de manière croisée contre ces deux antigènes. Ils se comportent cependant comme des anticorps monovalent. Cela a donc un grand impact sur leur capacité à former de gros complexes immuns, et ainsi induire une réponse immunitaire. En fait, on considère généralement que les IgG4 sont incapables de précipiter leur antigène cible [17]. En entrant en compétition avec les anticorps précipitant, ils peuvent même jouer un rôle dans la solubilisation des complexes immuns [18]. C'est pourquoi les IgG4 sont davantage associées à des activités pacificatrices et de tolérance au sein du système immunitaire.

Les immunoglobulines IgG4 semblent être produites en réponse à de grandes quantités d'antigène, comme on en retrouve lors d'une transfusion ou d'allergie aux acariens [19]. Elles semblent également apparaître à la suite d'immunisations répétées. Les cas d'allergies et de réponses antiparasitaires en sont un bon exemple. Dans chacune de ces situations, on observe initialement un titre élevé d'IgG1, qui cède progressivement place aux IgG4 [9]. Dans les cas d'allergies, par exemple, l'apparition des IgG4 corrèle avec une diminution des symptômes. Un autre exemple est celui des apiculteurs, chez qui l'on retrouve généralement un titre élevé d'IgG4 anti-phospholipase A2, une enzyme retrouvée dans le venin des abeilles [9].

On constate donc que les IgG4 et les HTLA possèdent de nombreuses caractéristiques communes. Les HTLA ne sont pas cliniquement significatifs, c'est-à-dire qu'ils n'entraînent pas de réponse immunitaire. De plus, ils sont souvent développés chez des patients ayant reçu de multiples transfusions ou chez des femmes ayant eu une ou plusieurs grossesses, deux situations au cours desquelles l'individu est exposé à plusieurs reprises ou pendant une longue durée à l'antigène cible, en quantité relativement élevée (faisant référence au volume d'antigène plutôt qu'à la densité). Ces caractéristiques communes appuient davantage les observations indiquant que les anticorps contre plusieurs groupes sanguins associés aux HTLA soient de type IgG4.

## 1.4 Le système Knops

### 1.4.1 Les antigènes du système Knops

Les anticorps dirigés contre plusieurs antigènes érythrocytaires sont connus pour présenter des caractéristiques de type HTLA (Tableau 1.2). Ils sont cependant divisés en trois classes, selon la fréquence de ces caractéristiques. Parmi les antigènes reconnus comme étant généralement associés à des anticorps de type HTLA se trouvent ceux du système Knops, décrit en 1970 [20], qui comprend les antigènes Kn<sup>a</sup>, Kn<sup>b</sup>, McC<sup>a</sup>, McC<sup>b</sup>, S11, S12, S13, Yk<sup>a</sup> et KCAM. La plupart des antigènes appartenant à ce groupe sont dits de haute fréquence. (ex : 98% des Caucasiens sont Kn<sup>a</sup>/Kn<sup>a</sup>). Ils sont également considérés comme étant de faible importance clinique puisqu'ils n'engendrent généralement pas de réaction post-transfusionnelle. Il n'existe donc aucune nécessité de sélectionner un donneur compatible pour ce groupe. Dans les années 1990, il a été démontré que les anticorps dirigés contre les antigènes du système Knops reconnaissaient le récepteur du complément de type 1 (CR1, CD35 ou *C3b/C4b binding protein*) [21]. Ces antigènes sanguins sont donc portés par le CR1 [7].

### 1.4.2 Le récepteur du complément de type 1

Le gène encodant le CR1 est réparti sur 133 à 160 kb sur le chromosome 1 (1q32) et comprend de 39 à 47 exons. La séquence codante peut être divisée en quatre sections hautement homologues (60 à 99%), nommées LHR-A, LHR-B, LHR-C et LHR-D. Ces répétitions seraient dues à une duplication génique et à des *crossing over* inégaux à l'intérieur de l'allèle primordial du CR1 [22]. C'est également ce qui justifie les variations dans la taille du gène. Quatre variants sont connus à ce jour : CR1-1, CR1-2, CR1-3 et CR1-4, codant pour des protéines présentant une masse moléculaire entre 190 à 280 kDa [7]. Le CR1-1 (variant F) et le CR1-2 (variant S) sont les deux formes les plus fréquemment rencontrées au sein de la population caucasienne. L'ARN messager du variant F s'étend sur 8581 pb et encode 2039 acides aminés, tandis que celui du variant S s'étend sur 9961 pb et encode 2489 acides aminés. Lors de leur migration sur gel SDS-PAGE, les variants F et S présentent une masse moléculaire relative de 220 et 280 kDa, respectivement. La masse moléculaire du CR1 et les antigènes de groupes sanguins qu'il porte ne semblent pas être liés [23].

Le CD35 est une glycoprotéine linéaire transmembranaire de type 1 qui se divise en 4 domaines : 1) peptide signal de 47 acides aminés en N-terminal, absent de la protéine mature, 2) domaine extracellulaire de 1930 acides aminés comprenant les 4 LHR, 3) domaine transmembranaire de 25 acides aminés et 4) domaine cytoplasmique de 43 acides aminés [24].

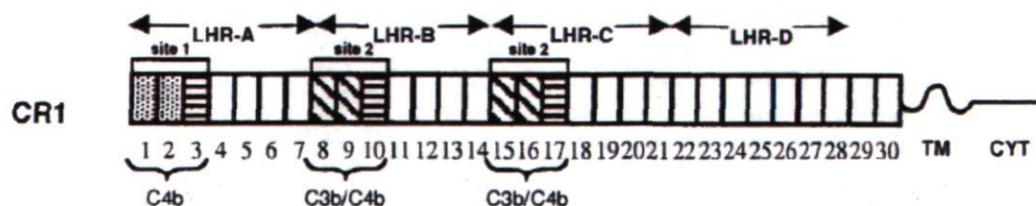
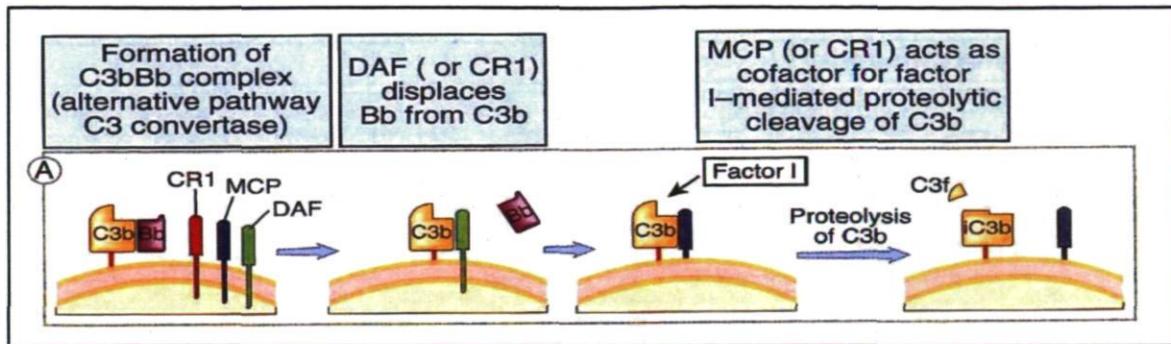


Figure 1.3 : Représentation schématique de la protéine CR1, incluant les trois sites de liaison au C3b/C4b. Tirée de Moulds *et al.* [25].

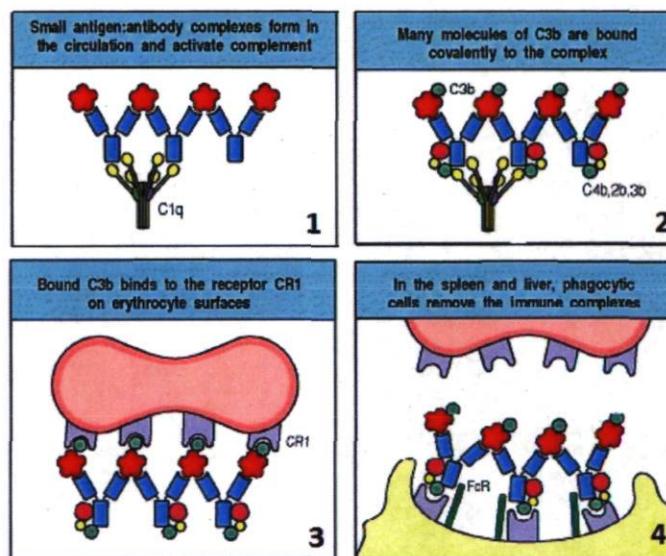
À l'intérieur des quatre sections hautement homologues (LHR) se retrouvent des régions répétées d'environ 60 acides aminés nommées SCR (*Short Consensus Repeats* ou CCP). On en compte sept par LHR, plus deux dans la région C-terminale de la partie extracellulaire (Figure 1.3). Ces domaines répétés sont caractéristiques des protéines liant le C3b et le C4b [26]. Parmi les protéines possédant ce type de motif, on compte le facteur H, C4bp, DAF, le CR2, le facteur B, MCP et certaines autres protéines non liées au complément, comme l'IL-2R et le facteur XIIIb [27]. Certaines de ces protéines sont d'ailleurs retrouvées sous forme soluble dans le plasma.

Le CR1 est essentiellement exprimé à la surface des érythrocytes, des macrophages, des granulocytes, des lymphocytes B et des cellules dendritiques folliculaires. Il se retrouve également sous forme soluble dans le plasma suite à un clivage protéolytique du CR1 membranaire [28]. Le CD35 assure deux fonctions précises au sein du système immunitaire lors de l'élimination des complexes immuns et de la régulation de l'activation du complément [29].

Tout d'abord, le CR1 à la surface des érythrocytes permet la prise en charge et l'élimination des complexes immuns dans le plasma en liant le C3b et le C4b à leur surface et permet leur acheminement vers la rate et le foie, où ils sont éliminés. Le CR1 à la surface des macrophages permet quant à lui la phagocytose de ces mêmes complexes (Figure 1.4). Il permet aussi d'inhiber les voies classique et alterne du complément en agissant à titre de cofacteur lors du clivage du C3b et du C4b par le facteur I, empêchant ainsi la formation des convertases C3 et C5 (Figure 1.5) [8, 30]. Le CD35 jouerait également un rôle lors de la présentation antigénique et de l'activation de la réponse immunitaire [24].



**Figure 1.4 : Régulation de l'activation de la cascade du complément par le CR1.** Tirée de Abbas et Lichtman [6]



**Figure 1.5 : Élimination des complexes immuns opsonisés par le C3b via le CR1.** Adaptée de Murphy *et al.* [8]

L'implication du CR1 a pu être observée au cours de plusieurs maladies liées au système immunitaire. En effet, on observe un nombre inférieur de CR1 par érythrocyte (CR1/E) chez les patients souffrant de lupus systémique érythémateux, d'hémoglobinurie paroxystique nocturne, d'anémie hémolytique, de diabète insulino-dépendant, du syndrome d'immunodéficience acquise ou de tout autre condition impliquant une élimination massive des complexes immuns [7]. En effet, le CR1 serait perdu lors de la prise en charge des complexes immuns des érythrocytes aux macrophages du foie et de la rate [31]. En 2003, Sadallah et collaborateurs ont mis en évidence la production d'autoanticorps dirigés contre

le CD35 chez les patients atteints de lupus, d'une cirrhose du foie ou infectés par le virus de l'immunodéficience humaine. Ces anticorps ne seraient toutefois pas impliqués dans la diminution de la quantité de CR1 à la surface des érythrocytes puisque les épitopes reconnus sont absents de la protéine sous forme native.

Plusieurs maladies autoimmunes sont directement liées à la production insuffisante de CR1 en raison de son rôle essentiel au sein de la régulation de la cascade du complément. Le CR1 doit se retrouver en concentration suffisante afin de permettre une inhibition convenable, empêchant ainsi l'attaque des tissus par les molécules du complément retrouvées en trop grande concentration. Il a également été démontré que le CR1 était impliqué dans la formation de rosettes entre les globules rouges non infectés et ceux infectés exprimant l'*erythrocyte membrane protein 1* de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) dans les cas de malaria sévère [32, 33].

En plus du polymorphisme de taille, le CR1 présente un polymorphisme quantitatif. En effet, le nombre de CR1 par érythrocyte est extrêmement variable au sein de la population, allant de 30 à 800 molécules par globule rouge [23]. On connaît actuellement quatre polymorphismes qui semblent être associés à la régulation de l'expression du CD35 (Tableau 1.3). Toutefois, leur effet ne semble pas s'appliquer à toutes les populations. Par exemple, l'influence du fragment de restriction *HindIII* dans l'intron 27 a été démontrée chez les populations caucasienne et chinoise, mais ne semble avoir aucun effet chez les Afro-américains [34]. Plusieurs études ont tenté de démontrer une relation entre les différents polymorphismes et le niveau de sévérité/résistance aux infections à *P. falciparum* dans les zones endémiques de malaria (Gambie, Papouasie Nouvelle-Guinée, Thaïlande, Inde). Chez certaines populations, il semble que les allèles d'expression faible de la molécule confèrent une certaine protection face aux stades avancés de la malaria. Cette corrélation n'est toutefois pas observée pour toutes les origines ethniques [35-37].

**Tableau 1.3 : Allèles d'expression faible et élevée du CR1**

Position	3066G>T	4843A>G	5480C>G	<i>HindIII</i>
Expression élevée	3066G	4843A	5480C	-
Expression faible	3066T	4843G	5480G	+

Outre ces polymorphismes quantitatifs, le CD35 demeure tout de même une molécule faiblement exprimée à la surface des globules rouges et retrouvée en faible concentration dans le plasma (~ 31 ng/ml) [38]. C'est sans doute cette caractéristique, en plus des amas de CR1 à la surface des érythrocytes, qui prévient la phagocytose des globules rouges malgré leur opsonisation massive par des anticorps dirigés contre le CD35. Lors de la prise en charge des complexes immuns ou en présence de HTLA, les globules rouges peuvent être recouverts d'une quantité importante d'anticorps liés au CR1. Le fait que cette protéine membranaire se retrouve en quantité aussi faible et non répartie uniformément sur la membrane semble nuire à l'initiation du mécanisme de fermeture éclair essentiel à la phagocytose (Figure 1.6) [39].

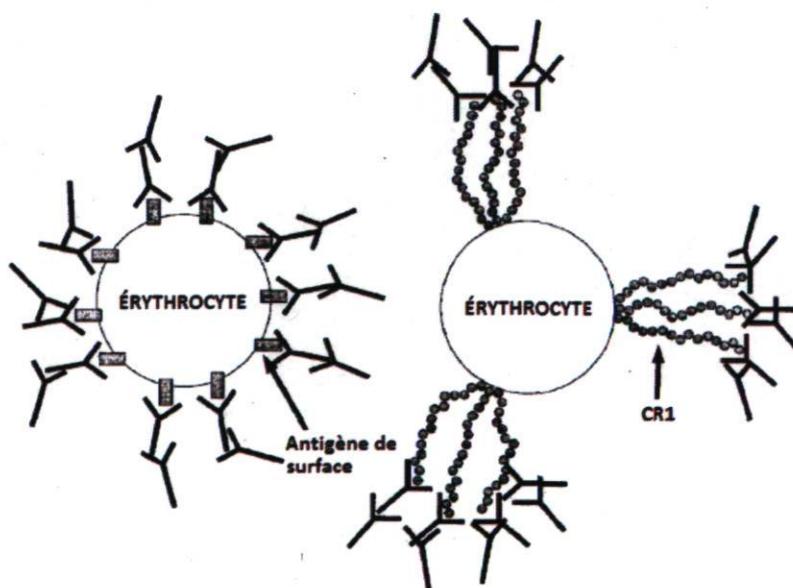


Figure 1.6 : Disposition du CR1 à la surface du globule rouge. Adaptée de Reinagel *et al.* [39]

Aucun individu complètement dépourvu de CR1 n'a été identifié à ce jour. Le phénotype nul (négatif lors du typage des antigènes du système Knops) est dû à une quantité réduite de CR1/E, estimée à moins de 10% de la valeur normale [7, 40]. Ce phénotype se nomme Helgeson en l'honneur du premier patient chez qui il a été observé. Il existe cependant peu d'information disponible quant à l'état physiologique des patients typés Helgeson.

La troisième catégorie de polymorphismes retrouvés chez le CR1 est représentée par les antigènes du système Knops, localisés dans le LHR-D. Jusqu'à tout récemment, la base moléculaire de tous ces antigènes était connue, à l'exception du Yk<sup>a</sup> [7, 23, 25]. À l'automne 2010, Veldhuisen et collaborateurs ont identifié un polymorphisme à l'origine du phénotype York a négatif [41]. Le tableau 1.4 présente les différents polymorphismes associés aux antigènes du système Knops ainsi que leur fréquence au sein de la population caucasienne.

**Tableau 1.4 : Antigènes du système Knops et fréquence dans la population caucasienne.** Adapté de J.M. Moulds [23] et Veldhuisen *et al.* [41]

Antigène	Exon	Position*	Fréquence (%)**
<b>Kn<sup>a</sup></b>	29	4681G	98
<b>Kn<sup>b</sup></b>	29	4681A	4,5
<b>McC<sup>a</sup></b>	29	4768A	100
<b>McC<sup>b</sup></b>	29	4768G	0
<b>SI1</b>	29	4801A	100
<b>SI2</b>	29	4801G	0
<b>SI3+</b>	29	4828T/4801A	100
<b>SI3-</b>	29	4828A/4801A	0
<b>KCAM+</b>	29	4843A	95
<b>KCAM-</b>	29	4843G	5
<b>Yk<sup>a+</sup></b>	26	4223C	92
<b>Yk<sup>a-</sup></b>	26	4223T	8

\* Calculée à partir du codon d'initiation de la transcription (ATG)

\*\* Fréquence dans la population caucasienne

La forme mutée des antigènes Kn, McC et SI génère trois sites de restriction : *NdeI*, *MvaI*269i et *MfeI*, respectivement [42]. Il est à noter que la position 4843 détermine à la fois l'antigène KCAM et une allèle d'expression du CR1.

### 1.5 Problématique HTLA

Les anticorps de type HTLA constituent un problème fréquemment rencontré par les sérologistes des banques de sang. En effet, leurs propriétés particulières font en sorte qu'ils sont difficiles à analyser avec les méthodes de sérologie classique et impossible à éliminer du plasma des échantillons à tester. En raison de leur spécificité pour les antigènes de haute fréquence, les HTLA induisent une réaction positive sur toutes les cellules testées, sans possibilité de discrimination lors du typage des échantillons de sang. Si leur importance clinique est considérée comme étant moindre, il n'en va pas de même pour certains anticorps que les HTLA pourraient camoufler. Le taux d'alloimmunisation chez les individus recevant des transfusions de manière chronique est évalué entre 25 et 47%, en considérant uniquement les anticorps cliniquement significatifs [43]. La probabilité de trouver un anticorps significatif dans ce type d'échantillon est bien réelle. Le risque se trouve donc dans la possibilité d'ignorer l'un de ces anticorps pouvant causer des réactions post-transfusionnelles graves. Il devient donc impératif de développer un moyen de contrer les problèmes engendrés par la présence des HTLA dans les échantillons de sang.

Les anticorps HTLA sont généralement considérés comme étant impossibles à neutraliser. Il existe toutefois quelques exceptions, comme le cas des anti-Chido/Rodgers. Ces derniers peuvent être neutralisés par du plasma humain contenant du C4, porteur de ces deux antigènes. L'incapacité du plasma à neutraliser la plupart des autres HTLA serait due à l'inexistence de leur antigène correspondant sous forme soluble ou leur présence en quantité insuffisante dans le plasma [44]. À l'heure actuelle, l'utilisation de pools de plasma, les rondes d'adsorption-élution multiples sur cellules positives ou le typage à l'aide de cellules rares demeurent encore les seuls moyens (peu efficaces) que possèdent les laboratoires de sérologie pour faire face aux HTLA.

### 1.6 Contexte de recherche et hypothèses

En 1975, Race et Sanger sont parvenus à adsorber des anti-Kn<sup>a</sup> sur des globules blancs, porteurs de CR1 [45]. Cependant, il va de soi que l'utilisation de leucocytes compliquerait la technique visant à contrer les problèmes causés par la présence des HTLA dans les échantillons de sang. Ces cellules portent plusieurs des antigènes exprimés par les globules rouges et risquent ainsi d'adsorber les anticorps que l'on tente d'identifier. Ainsi, en 1996, Moulds et Rowe ont démontré qu'il était possible de neutraliser les anticorps dirigés contre les antigènes sanguins du système Knops à l'aide d'un CR1 soluble recombinant [44]. À la suite de ces observations, des chercheurs de la *National Blood Foundation* sont parvenus à démontrer qu'il était également possible de neutraliser les anticorps du système Knops en utilisant seulement des fragments de la protéine CD35 tronquée [24]. Le LHR-C ainsi que le LHR-D génèrent à eux seuls les mêmes résultats que la protéine complète. Toutefois, les possibilités que représente l'utilisation de molécules recombinantes, comme le CR1 soluble, dans les laboratoires de sérologie semblent avoir été mises de côté puisque aucune publication portant sur ce sujet n'est disponible depuis.

Face à ce constat, l'hypothèse qu'il serait possible de mettre au point un système permettant d'adsorber les HTLA dans les échantillons de plasma et ainsi permettre l'analyse et l'utilisation plus sécuritaire des produits sanguins a été émise. De plus, lors de l'élaboration de ce projet de maîtrise, la base moléculaire de l'antigène Yk<sup>a</sup> était inconnue. L'analyse d'échantillons typés négatifs pour cet antigène a été envisagée pour permettre l'identification de la nature moléculaire de cet antigène.

### 1.7 Objectifs

Ce projet de maîtrise visait la mise au point d'une méthode permettant de neutraliser les HTLA d'échantillons de plasma. Afin d'y parvenir, plusieurs approches ont pu être envisagées en se basant sur l'information connue au sujet de ce type d'anticorps. Initialement, les anticorps dirigés contre le système Knops ont été préférés. Suite aux observations de Moulds et collaborateurs au sujet du CR1 [44], les fragments solubles ainsi que les peptides synthétiques semblaient être deux options intéressantes pour y parvenir. Aussi, sachant que plusieurs évidences associent les HTLA aux IgG4, cette molécule représentait également une avenue prometteuse qui permettrait de couvrir une plus grande diversité de spécificités antigéniques.

Les hypothèses ont pu être vérifiées suite à la réalisation des objectifs suivants :

- Mise au point d'un système de déplétion des IgG4 du plasma
- Vérification en études sérologiques de l'efficacité de la méthode IgG4 à neutraliser les HTLA
- Mise au point d'un système de déplétion des anti-Knops à partir de peptides synthétiques de CR1
- Vérification en études sérologiques de l'efficacité de la méthode des peptides à neutraliser les HTLA

Parallèlement, des travaux ont été réalisés dans le but d'élucider la base moléculaire de l'antigène York a ( $Yk^a$ ). L'hypothèse a pu être vérifiée suite à la réalisation des objectifs suivants :

- Analyse complète des polymorphismes du *CR1* d'individus suspectés  $Yk^a$ - en sérologie
- Analyse complète des polymorphismes du *CR1* d'individus contrôles sélectionnés aléatoirement

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Échantillons

Ce projet de recherche a été approuvé par le comité d'éthique à la recherche d'Héma-Québec. Les échantillons contrôles proviennent du registre de donneurs pour la recherche d'Héma-Québec. Les échantillons cliniques ont été référés à notre laboratoire par le Laboratoire de référence et des cellules souches (Tableau 2.1).

**Tableau 2.1 : Profil des différents échantillons cliniques utilisés**

<b>Échantillons pour essais avec HTLA</b>			
<b>Identification</b>	<b>Sexe</b>	<b>Année de naissance</b>	<b>Anticorps</b>
HTLA-1	F	1972	anti-Kn <sup>a</sup> , anti-D WinRho
HTLA-2	F	1989	anti-JMH
HTLA-3	F	1986	anti-JMH
HTLA-4	F	1915	anti-Kn <sup>a</sup>
HTLA-5	F	1932	anti-Kn <sup>a</sup>

<b>Échantillons suspectés Yk<sup>a</sup>-</b>			
<b>Identification</b>	<b>Sexe</b>	<b>Année de naissance</b>	<b>Anticorps</b>
1	M	1940	anti-Yk <sup>a</sup> suspecté
2	M	1956	anti-Yk <sup>a</sup> suspecté
3	M	1942	anti-Yk <sup>a</sup> suspecté
4	M	1923	anti-Yk <sup>a</sup> suspecté
5	M	1950	anti-Yk <sup>a</sup> suspecté
6	F	1920	anti-Yk <sup>a</sup> suspecté

## **2.2 Déplétion des IgG4 du plasma**

### **2.2.1 Échantillons**

Puisque les HTLA sont souvent associés à la sous-classe 4 des IgG, une méthode de déplétion a été mise au point afin de vérifier si leur élimination permettait d'inhiber la réactivité contre les globules rouges. La mise au point de la méthode a été effectuée en utilisant le Seracon I (SeraCare, Edmonton, Canada), qui est un pool de plasma humain issu de plusieurs milliers de donneurs. La constance et la disponibilité de l'échantillon étaient ainsi assurées. La méthode a été testée avec des plasmas contenant des HTLA, soit un anti-JMH ou un anti-Kn<sup>a</sup>.

### **2.2.2 Couplage des anti-IgG4 humaines**

La méthode a été développée à l'aide du système *NHS SpinTrap HP* (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Canada), constitué de billes de sépharose recouvertes de groupements NHS activés liant le groupement C-terminal des protéines. Le couplage a été effectué selon les indications du fabricant, à raison de 150 µg d'anticorps de souris anti-IgG4 humain (Southern Biotech, Birmingham, AL) pour 600 µl de billes en suspension. Brièvement, l'anticorps a été mis en suspension dans une solution de couplage (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3) et incubé à la température de la pièce. Le couplage chimique et le blocage des sites libres ont été effectués en alternant le passage d'un tampon basique (0,5 M éthanolamine, 0,5 M NaCl, pH 8,3) et d'un tampon acide (0,1 M acétate, 0,5 M NaCl, pH 4,0). Les billes ont finalement été neutralisées par plusieurs passages de tampon saline-Tris (TBS : 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5). Tous les passages ont été effectués par centrifugation à 100 x g pendant une minute.

### **2.2.3 Déplétion des IgG4**

Pour dépléter les IgG4, 25 µl de plasma, soit une moyenne de 13 µg d'IgG4, ont été dilués 12 fois en duplicata dans du TBS. L'un des échantillons a été mis en contact avec les billes couplées et incubé à 4°C. L'autre a été conservé à titre de contrôle non-déplété. Les *flow through* ont ensuite été recueillis par centrifugation. Les échantillons ont été concentrés à 25 µl sur membrane de cellulose (MilliPore, Billerica, MA), puis analysés.

#### **2.2.4 Validation de l'efficacité et de la spécificité de la déplétion**

Afin de s'assurer que la déplétion n'affecte que la sous-classe 4 des IgG, une vérification de l'efficacité et de la spécificité de la méthode a été effectuée lors des essais avec le Seracon I. Pour ce faire, les quatre sous-classes d'IgG retrouvées dans les échantillons déplétés et non-déplétés ont été analysées en immunobuvardage. Les échantillons ont été préparés en quatre séries, selon les quantités requises pour chaque sous-classe : IgG1 à 90 ng, IgG2 à 2,5 µg, IgG3 à 500 ng et IgG4 à 5 ng. Les protéines ont été diluées dans un tampon dénaturant contenant 5% de β-mercaptoéthanol et chauffées à 95°C pour une durée de cinq minutes. Les échantillons ont ensuite été déposés sur un gel d'électrophorèse à une concentration de 10% d'acrylamide, tel que décrit par Laemmli *et al.* [46]. La migration a été effectuée à 200 V pendant environ une heure. Par la suite, les protéines ont été transférées sur membranes de polyvinylidene fluoride (PVDF) (Millipore) pendant une heure avec agitation à l'aide d'un système de transfert Transblot (Bio-Rad, Mississauga, Canada) dans un tampon méthanol. Les sites non spécifiques des membranes ont été bloqués à l'aide d'une solution de TBS ajoutée de 0,1% de Tween 20 (TTBS) contenant 5% de lait en poudre (Carnation, Markham, Canada) et 1% de polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) à 4°C durant une nuit. Les anticorps de souris spécifiques anti-IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 couplés à la peroxydase (Southern Biotech) ont ensuite été dilués à 1 : 5000 dans la solution de blocage, mis en contact avec les membranes et incubés une heure à température ambiante, avec agitation. Les membranes ont finalement été lavées trois fois durant cinq minutes dans le TTBS. Les membranes ont été révélées à l'aide du réactif ECL Plus (GE Healthcare). Les membranes ont été recouvertes du réactif pendant cinq minutes et exposées sur des films.

#### **2.2.5 Validation de la spécificité de la déplétion en ELISA**

Dans le but de s'assurer que la méthode n'affecte pas de manière considérable le taux d'IgG totales, le dosage des échantillons déplétés et non-déplétés a été effectué par ELISA. L'anticorps polyclonal de chèvre spécifique à la région Fc des IgG humaines (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a tout d'abord été adsorbé dans les plateaux Immulon 2HB à fond rond (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) en solution à 2,5 µg/ml dans du tampon carbonate 100 mM à pH 9,7, à 4°C durant la nuit. Les plateaux

ont ensuite été lavés six fois avec une solution de tampon phosphate salin (3,2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM  $\text{NaCl}$ ) contenant 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw). Les plateaux ont ensuite été bloqués avec une solution de PBS-Tw contenant 1% de caséine (PBS-Cas-Tw) durant une heure à 37°C, puis lavées de nouveau. Les échantillons dilués dans le bloquant ont ensuite été déposés. Une courbe standard entre 0 et 50 ng/ml a été réalisée à partir d'IgG humaines purifiées. Les échantillons ont été dilués à une concentration estimée à 40 ng/ $\mu\text{l}$  afin de correspondre aux limites de la courbe standard. Les plateaux ont été incubés une heure à 37°C. Suite à un troisième lavage, l'anticorps de chèvre anti-IgG humaine polyclonal spécifique à la région Fc couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch) et dilué 1 : 40 000 en PBS-Cas-Tw a été ajouté et incubé une heure à 37°C. Finalement, les plateaux ont été lavés et la présence d'IgG a été détectée par colorimétrie à l'aide d'un substrat de la peroxydase, le tétraméthylbenzidine (TMB) (Scytek Laboratories, Logan, UT). La réaction a été arrêtée à l'aide de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N et la densité optique a été lue au lecteur de plaque SpectraMax Plus (Molecular Devices, Guelph, Canada) à 450 nm avec une référence de 630 nm.

### **2.3 Étude des sous-classes des HTLA en cytométrie en flux**

Afin de déterminer à quelle sous-classe appartiennent réellement les HTLA, des globules rouges ont été incubés en présence de plasma contenant ce type d'anticorps, puis marqués avec un anticorps dirigé contre chacune des quatre sous-classes d'IgG. Pour ce faire, un tube de sang O négatif a été prélevé sur EDTA et centrifugé à 150 x g pour une durée de 15 minutes dans le but de séparer les globules rouges des autres constituants du sang. Un petit volume du culot globulaire a été prélevé et lavé à cinq reprises dans de la saline à 0,9% en centrifugeant 2 minutes à 1000 x g entre chaque lavage. Le culot a ensuite été resuspendu à 1%. Par la suite, 50  $\mu\text{l}$  de suspension de globules rouges ont été incubés avec 16  $\mu\text{l}$  d'échantillon (anti-JMH ou anti-Kn<sup>a</sup>), pendant une heure à 37°C. Les échantillons ont ensuite été lavés en saline 0,9%. Les anticorps de souris spécifiques aux IgG1 (Invitrogen, Burlington, Canada), aux IgG2 (BD Pharmingen, Mississauga, Canada) aux IgG3 (Invitrogen) ou aux IgG4 (Southern Biotech) ont ensuite été ajoutés et incubés dix minutes à la température de la pièce. Le culot a été lavé en PBS additionné de 1% de sérum

foetal bovin et de 0,01% d'azide de sodium (PBS-FBS- $\text{NaN}_3$ ) et centrifugé cinq minutes à 1000 x g. L'anticorps de mouton anti-IgG de souris couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (AbD Serotec, Raleigh, NC) a été ajouté et incubé dix minutes à la température de la pièce, dans le noir. Les échantillons ont ensuite été lavés en PBS-FBS- $\text{NaN}_3$  et les cellules ont été fixées dans le paraformaldéhyde à 2% (Sigma-Aldrich). Le traitement des échantillons a été effectué à l'aide du cytomètre CyFlow ML (Partec, Swedesboro, NJ).

## **2.4 Dosage des IgG4 totaux du plasma**

Les HTLA sont souvent caractérisés par des titres d'anticorps élevés. Le dosage des IgG4 des différents échantillons a donc été réalisé afin de voir s'il existait une corrélation entre la présence des HTLA et le taux sérique d'IgG4. Le dosage a été effectué en ELISA spécifique aux IgG4. Pour ce faire, une méthode semblable à celle décrite au point 2.2.5 a été utilisée. L'anticorps de souris anti-IgG4 humain (Southern Biotech) a été adsorbé à 2  $\mu\text{g/ml}$  comme anticorps de capture. Une courbe standard allant de 0 à 40 ng/ml a été réalisée à partir d'IgG4 $\kappa$  purifiés (Sigma-Aldrich). Les échantillons de plasma avec et sans HTLA ont été dilués à une valeur estimée de 25 ng/ml d'IgG4. Un contrôle positif à 15 ng/ml d'IgG4 a également été inclus. L'anticorps de surface utilisé est un anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) humain couplé à la peroxydase dilué 1 : 25 000.

## **2.5 Déplétion des anti-Kn<sup>a</sup> du plasma avec peptides synthétiques de CR1**

### ***2.5.1 Peptides synthétiques de CR1***

Les peptides ont été synthétisés par la compagnie GenScript (Piscataway, NJ, USA) à l'aide de la technologie FlexPeptide<sup>TM</sup>. Il s'agit de six 15-mères qui ont été dessinés afin d'inclure la région polymorphique de l'antigène Knops (Tableau 2.2). Trois peptides contiennent le polymorphisme de l'antigène Kn<sup>a</sup> situé à différents endroits dans la séquence. Les trois autres présentent le polymorphisme de l'antigène Kn<sup>b</sup>, selon la même configuration. Les peptides lyophilisés ont été resuspendus dans l'eau à 2 mg/ml.

Tableau 2.2 : Peptides synthétiques de CR1

Peptide	Séquence
<b>Kn<sup>a</sup>-1</b>	LFEL <b>V</b> GERSIYCTSK
<b>Kn<sup>a</sup>-2</b>	GEQLFEL <b>V</b> GERSIYC
<b>Kn<sup>a</sup>-3</b>	TGPDGEQLFEL <b>V</b> GER
<b>Kn<sup>b</sup>-1</b>	LFEL <b>M</b> GERSIYCTSK
<b>Kn<sup>b</sup>-2</b>	GEQLFEL <b>M</b> GERSIYC
<b>Kn<sup>b</sup>-3</b>	TGPDGEQLFEL <b>M</b> GER

### 2.5.2 Couplage des peptides sur système NHS SpinTrap HP

Différentes combinaisons de peptides ont été testées. Les combinaisons retenues pour les essais préliminaires sont les suivantes : pool des peptides Kn<sup>a</sup>, pool des peptides Kn<sup>b</sup> et pool des peptides Kn<sup>a+b</sup>. Les couplages ont été effectués selon la méthode énoncée au point 2.2.2. Le protocole a été adapté afin de coupler 30 µg de peptide sur 60 µl de billes en suspension. Pour chaque essai, une colonne de billes sans peptides a été traitée de la même façon à titre de contrôle négatif (billes non-couplées).

### 2.5.3 Déplétion des anti-Kn<sup>a</sup> du plasma

Afin de dépléter les anti-Kn<sup>a</sup>, des plasmas contenant ce type d'anticorps ont été utilisés. En supposant qu'un peptide retienne un anticorps, la quantité de peptides couplée aux billes devrait dépléter au moins 60 µl de plasma selon les mêmes étapes qu'au point 2.2.3. Par contre, une fois que les *flow through* ont été récoltés, les billes ont été lavées en TBS-urée 2,5 M. Puis, les anticorps retenus par la colonne ont été élués en acide acétique 2,5% (Fisher, Ottawa, Canada) et neutralisés immédiatement en Tris-HCl 1 M, pH 7,5. Finalement, les échantillons non-déplétés, les *flow through* et les éluats ont tous été concentrés sur membrane de cellulose afin de retrouver un volume de 60 µl.

#### **2.5.4 Validation de l'efficacité de la méthode en ELISA**

Afin de s'assurer de la spécificité et de l'efficacité de la méthode, deux ELISA permettant de doser les IgG totales ont été réalisés selon la méthode énoncée au point 2.2.5. Le premier a servi à comparer les taux d'IgG totales dans les plasmas non-déplétés et ceux passés sur billes afin de vérifier que le traitement n'affecte pas significativement les IgG dans les échantillons. Les plasmas et les *flow through* ont ainsi été dilués à une concentration estimée de 40 ng/ml afin de correspondre aux limites de la courbe standard. Le deuxième ELISA a servi à analyser la capacité des peptides à adsorber les anti-Kn<sup>a</sup> de manière spécifique. La quantité d'éluat concentré à déposer dans les puits a été déterminée à l'aide de dilutions sériées. La dilution 1 : 100 a permis d'obtenir des densités optiques à l'intérieur des limites de la courbe standard.

#### **2.6 Titrages et tests en agglutination indirecte des échantillons déplétés**

Afin de déterminer si la déplétion des échantillons permet d'éliminer la réactivité des plasmas contre les globules rouges, des essais en sérologie ont été effectués. Ces essais ont été réalisés par le personnel du Laboratoire de référence et des cellules souches d'Héma-Québec à Québec. Les plasmas non-déplétés et les *flow through* ont été dilués en série par un facteur deux, de 1 à 1024, en saline 0,9%. Étant donné les quantités limitées d'échantillon, la technique de titrage standard a été modifiée afin d'utiliser le minimum de volume de plasma possible. Ainsi, l'essai a été réalisé en carte *ID-Micro Typing System* (Ortho Clinical Diagnosis, Markham, Canada) plutôt qu'en tube. Une carte est constituée de 6 microtubes préremplis de particules de gel, de diluant et de l'antisérum approprié (Figure 2.1).

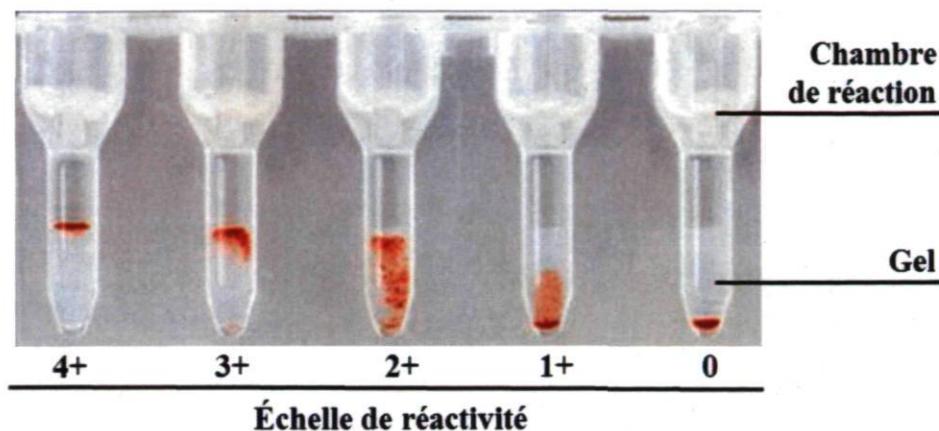


Figure 2.1 : Agglutination en carte gel. Adaptée du site Internet de Cardinal Health [47].

Dans le cas présent, la solution LISS (*Low Ionic Strength Saline*) a été utilisée comme diluant et l'antisérum était l'antiglobuline humaine. Une goutte de suspension de globules rouges à 3% a été ajoutée à 25  $\mu$ l de plasma dans la partie supérieure du microtube. Le tout a été incubé une heure à 37°C et centrifugé. La centrifugation permet à l'échantillon mis en contact avec le plasma et l'antiglobuline de pénétrer dans le gel situé dans la partie inférieure du microtube. Les cellules agglutinées sont retenues au-dessus du gel tandis que les cellules non-agglutinées se déplacent librement jusqu'au fond du tube et forment un culot bien défini. Le niveau de migration à l'intérieur du gel permet de déterminer la force de la réaction. Le titre de l'anticorps correspond à la dernière dilution à laquelle l'agglutination donne un résultat de 1+.

## 2.7 Analyse de la base moléculaire de l'antigène Yk<sup>a</sup>

### 2.7.1 Échantillons

Lors de l'élaboration de ce projet de maîtrise, la seule information connue au sujet de cet antigène était qu'il est porté par le CR1. Ainsi, la stratégie envisagée était de faire une analyse complète des polymorphismes connus du CR1 chez des individus suspectés Yk<sup>a</sup> négatif en sérologie et de les comparer à des échantillons contrôles, choisis aléatoirement dans le registre de donneurs avec consentement d'Héma-Québec.

L'ADN génomique des échantillons a été extrait par affinité sur membrane de silice à partir de sang total. Pour ce faire, la trousse *QIAamp DNA Blood Mini kit* (Qiagen, Mississauga, Canada) a été utilisée selon les indications du manufacturier.

L'ARNm des échantillons a été extrait par affinité sur membrane de fibre de verre à partir de sang total préservé dans le *RNA Later*. Pour ce faire, la trousse *RiboPure RNA Isolation kit* (Ambion, Streetsville, Canada) a été utilisée selon les recommandations du fabricant.

### 2.7.2 Géotypage des antigènes *Kn*, *McC* et *S11/2* par PCR-RFLP

Le géotypage des antigènes *Kn*, *McC* et *S11/2* a été effectué selon la méthode décrite par Moulds *et al.* [42]. Les amorces suivantes ont été utilisées :

**510s** : 5'-ACCAGTGCCACACTGGACCAGATGGAGAACAGCTGTTTGAGCAT-3'

**511as** : 5'-GGAGGAGTGTGGCAGCTTG-3'

Ces amorces ciblent l'exon 29 du *CRI* et génèrent un fragment de 305 pb. Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume final de 50 µl contenant environ 50 ng d'ADN génomique, 5 µl de tampon PCR 10X et 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, Streetsville, Canada), 0,1 µM de chacune des amorces, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, Burlington, Canada) et une unité d'AmpliTaq Glod (Applied Biosystems). L'amplification a été effectuée selon le programme suivant :

$$95^{\circ}\text{C } 9 \text{ min} \rightarrow \left. \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C } 30 \text{ sec} \\ 60^{\circ}\text{C } 1 \text{ min} \\ 72^{\circ}\text{C } 30 \text{ sec} \end{array} \right\} 35\text{x} \rightarrow 72^{\circ}\text{C } 5 \text{ min} \rightarrow 4^{\circ}\text{C } \infty$$

Par la suite, le produit PCR a été clivé à l'aide des enzymes de restriction spécifiques à chaque antigène : FastDigest *NdeI*, *MvaI*269I et *MfeI* (Fermentas, Burlington, Canada). La digestion enzymatique a été réalisée dans un volume final de 20 µl comprenant 10 µl de produit PCR, 2 µl de tampon FastDigest 10X, 1 unité d'enzyme et 7 µl d'eau de type biologie moléculaire. Les échantillons ont ensuite été incubés à 37°C pour une durée de 15 minutes. Les échantillons ont été déposés sur gel d'agarose (Sigma) - Synergel (BioAmerica, Laval, Canada) 3% coloré au GelRed (Biotium, Hayward, CA) en tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 0,5X. Le marqueur de masse moléculaire *50bp DNA Ladder*

(Invitrogen) a également été inclus. La migration a été effectuée à 105 V en TBE 0,5X, pour une durée de 75 minutes. Le Tableau 2.3 indique les résultats attendus selon les différents polymorphismes connus.

**Tableau 2.3 : Polymorphismes du système Knops et résultats attendus au génotypage**

Polymorphisme	Enzyme	Normal (pb)	Hétérozygote (pb)	Muté (pb)
Kn <sup>a</sup> /Kn <sup>b</sup>	<i>Nde</i> I	305	305, 261, 44	261, 44
McC <sup>a</sup> /McC <sup>b</sup>	<i>Mva</i> 1269I	305	305, 166, 139	166, 139
SI1/SI2	<i>Mfe</i> I	305	305, 161, 144	161, 144

### 2.7.3 Analyse des antigènes KCAM, SI3 et Yk<sup>a</sup> par PCR et séquençage

L'analyse des antigènes KCAM et SI3 a été effectuée par séquençage du produit PCR issu du génotypage des antigènes Kn, McC et SI. Les amplicons ont été produits selon la méthode décrite au point 2.7.2. Les produits PCR ont ensuite été purifiés à l'aide de l'ExoSAP-It (GE Healthcare) selon les indications du fabricant. Les produits purifiés ont été dosés sur gel d'agarose 2% en TBE 1X en incluant le marqueur *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) à titre de référence. La migration a été effectuée en TBE 1X, à 105 V pour une durée de 75 minutes. Les échantillons ont ensuite été dilués à 2 ng/μl et transmis à la Plateforme d'analyse moléculaire de l'Université Laval pour être séquencés à partir de la technologie 3130XL d'Applied Biosystems. Les séquences ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel *Geneious* (Biomatters Ltd, Auckland, Nouvelle-Zélande) en utilisant la séquence de référence NM\_000573.3.

Le séquençage de l'antigène York a été réalisé en utilisant les amorces décrites par Velhuisen *et al.* [41] :

**1304s** 5'-TTTCTGTGATCCACCTATCAGC-3'

**1305as** 5'-AGCTATCTGCCAGCCTTGG-3'

Ces amorces permettent d'amplifier l'exon 26 du *CRI* en ciblant les régions introniques flanquantes et génèrent un fragment de 393 pb. L'amplification a été réalisée dans un volume final de 50  $\mu$ l selon les conditions énoncées au point 2.7.2 à l'aide du programme suivant :

$$95^{\circ}\text{C } 9 \text{ min} \rightarrow \left. \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C } 30 \text{ sec} \\ 55^{\circ}\text{C } 30 \text{ sec} \\ 72^{\circ}\text{C } 30 \text{ sec} \end{array} \right\} 35\text{x} \rightarrow 72^{\circ}\text{C } 7 \text{ min} \rightarrow 4^{\circ}\text{C } \infty$$

Les produits PCR ont ensuite été purifiés à partir de la trousse *MinElute PCR Purification* (Qiagen) selon les indications du fabricant et séquencés.

#### 2.7.4 Analyse des polymorphismes quantitatifs par PCR et séquençage

Les polymorphismes quantitatifs 3066G>T et 5480C>G ont été analysés par l'amplification de deux fragments PCR différents à l'aide des amorces dessinées par Pham *et al.* [48] (Tableau 2.4).

**Tableau 2.4 : Amorces pour l'analyses des polymorphismes quantitatifs 3066G>T et 5480C>G**

Nom	Séquence	Région cible
1241s	5'-GCTACATGCAGGTTGAGACCTTAC-3'	Exon 29
1242as	5'-CTGAGATGTGGCTAGAAAGTA-3'	Exon 29
1243s	5'-GTCACAGGTCCTACTATTGTTTCAG-3'	Exon 33
1244as	5'-CCATTTAGGATATGTGGAAGCAGG-3'	Exon 33

La combinaison des amorces 1241 et 1242 génère un fragment de 252 pb et cible le polymorphisme 3066G>T. La combinaison des amorces 1243 et 1244 génère un fragment de 332 pb et cible le polymorphisme 5480C>G. Le polymorphisme 4843A>G a pu être identifié au point 2.7.3. L'amplification a été réalisée dans un volume final selon les conditions énoncées à la section précédente en utilisant le programme suivant :

$$95^{\circ}\text{C } 9 \text{ min} \rightarrow \left. \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C } 30 \text{ sec} \\ 64^{\circ}\text{C } 1 \text{ min} \\ 72^{\circ}\text{C } 30 \text{ sec} \end{array} \right\} 30\text{x} \rightarrow 72^{\circ}\text{C } 7 \text{ min} \rightarrow 4^{\circ}\text{C } \infty$$

Les produits PCR ont finalement été purifiés, séquencés et analysés selon la méthode énoncée à la section 2.7.3.

### 2.7.5 Analyse du polymorphisme quantitatif *HindIII* de l'intron 27 par PCR-RFLP

L'analyse de ce polymorphisme a été adaptée de Cornillet *et al.* [49] en utilisant les amorces suivantes :

**1245s** 5'- CCTTCAATGGAATGGTGCAT- 3'

**1246as** 5'- CCCTTGTAAGGCAAGTCTGG-3'

L'amplification a été réalisée dans un volume final de 50  $\mu$ l selon les concentrations énoncées à la section 2.7.2. Un programme en *touchdown* a été développé afin de favoriser l'amplification plus spécifique de la région cible. Le fragment PCR de 1800 pb a été amplifié à partir du programme suivant :

95°C 9 min	→	95°C 30 sec 61°C 1 min 72°C 30 sec	}	15x
		↓		
		95°C 30 sec 55°C 30 sec 72°C 45 sec	}	35x → 72°C 7 min → 4°C

La digestion enzymatique a été réalisée dans un volume final de 20  $\mu$ l comprenant 10  $\mu$ l de produit PCR, une unité de FastDigest *HindIII*, 2  $\mu$ l de tampon FastDigest Green 10X et 7  $\mu$ l d'eau de type biologie moléculaire. Le tout a été incubé 15 minutes à 37°C. Finalement, 10  $\mu$ l de produit digéré ont été déposés sur un gel d'agarose 1% en TBE 1X et coloré au GelRed. La migration a été faite en TBE 1X à 105 V pour une durée de 75 minutes. La digestion enzymatique du fragment génère un fragment de 1300 pb et un fragment de 500 pb en présence de l'allèle d'expression faible.

### ***2.7.6 Évaluation de la densité de CR1/E en cytométrie en flux***

L'évaluation de la densité de CR1 à la surface des globules rouges a été effectuée à l'aide d'un marquage anti-CD35 sur des globules rouges. Les cellules provenaient soit d'un tube de sang total-EDTA frais ou de globules rouges congelés conservés en Glycerolyte 57 (Baxter, Mississauga, Canada).

Pour les échantillons frais, les tubes ont été centrifugés à 600 x g pendant 15 minutes. Pour chaque condition, 20 µl de culot globulaire ont été prélevés et resuspendus dans 80 µl de PBS-FBS-NaN<sub>3</sub>.

Pour les échantillons congelés, les cellules ont été décongelées et lavées une première fois en saline 1,5% et centrifugées à 1000 x g pendant deux minutes. Le culot a ensuite été lavé à plusieurs reprises en saline 0,9%, jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Le culot a ensuite été distribué en aliquots de 20 µl et resuspendu dans 80 µl de PBS-FBS-NaN<sub>3</sub>.

La première étape du marquage consiste à ajouter 2,5 µl d'anticorps de souris anti-CD35 humain (AbD Serotec) et incubé dix minutes à température ambiante. L'échantillon est ensuite lavé en PBS-FBS-NaN<sub>3</sub> et centrifugé à 1000 x g pendant cinq minutes. L'anticorps de mouton anti-IgG de souris marqué à la FITC (AbD Serotec) a ensuite été ajouté (5 µl par tube) et incubé 10 minutes à température ambiante, dans le noir. Les échantillons ont été lavés de nouveau et fixés dans le PFA 2% pour une durée de cinq minutes à température ambiante, dans le noir. Les échantillons ont été lavés de nouveau et analysés au cytomètre en fonction de la taille et de la granularité. La densité de CR1 à la surface des globules rouges est évaluée en fonction de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI).

### ***2.7.7 Analyse du polymorphisme de taille du CR1***

Dans le but de déterminer la taille du CR1 exprimé par les individus étudiés, un RT-PCR a été mis au point afin de détecter la présence des allèles F et S du CR1. Le RT-PCR a été mis au point en exploitant l'insertion supplémentaire entre les LHR-A et B sur l'ARNm du variant S. Les amorces suivantes ont été utilisées :

**1120as** : 5'- TCCAATGGACAGCATTGACC- 3'

**1121s** : 5'- AGGCAGCTCTGCTAGTTAC - 3'

Ces amorces ciblent une région chevauchant le LHR-A et B chez le variant F (Figure 2.2). En présence du variant S, un fragment supplémentaire est amplifié.

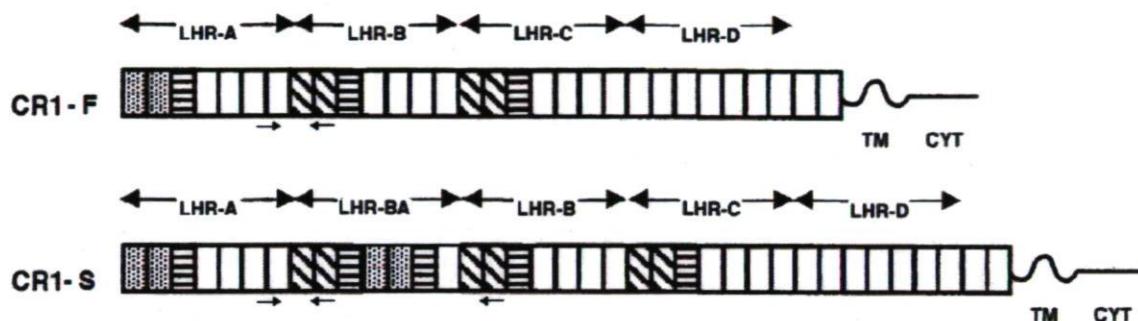


Figure 2.2 : Allèles F et S du CR1 et liaison des amorces pour analyse des polymorphismes de taille

Les amplifications ont été réalisées en volume final de 50  $\mu$ l en utilisant la trousse *Superscript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq* (Invitrogen) selon les indications du fabricant à l'aide du programme PCR suivant :

$$55^{\circ}\text{C } 30 \text{ min} \rightarrow 94^{\circ}\text{C } 2 \text{ min} \rightarrow \left. \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C } 15 \text{ sec} \\ 56^{\circ}\text{C } 1 \text{ min} \\ 68^{\circ}\text{C } 2 \text{ min} \end{array} \right\} 40\text{x} \rightarrow 68^{\circ}\text{C } 5 \text{ min} \rightarrow 4^{\circ}\text{C } \infty$$

Les produits PCR ont ensuite été visualisés sur gel d'agarose 1% en TBE 1X et coloré au GelRed. La présence de l'allèle F sous forme homozygote génère un fragment de 633pb. La présence de l'allèle S génère un fragment de 633 pb et de 2100 pb. Il est donc impossible de déterminer si elle se retrouve sous forme homozygote ou hétérozygote.

### **2.7.8 Séquençage du peptide signal du CR1**

Afin de détecter une éventuelle anomalie au niveau de l'expression et du transport du CR1 chez les individus Yk<sup>a</sup>-, la région encodant le peptide signal de 47 acides aminés a été amplifiée et séquencée. Les amorces suivantes ont été utilisées :

**1290s** : 5'- CCCTTCAACACGGAGAGCAGGC - 3'

**1291as** : 5'- TGCACGCGAGTTCTCTGCGG - 3'

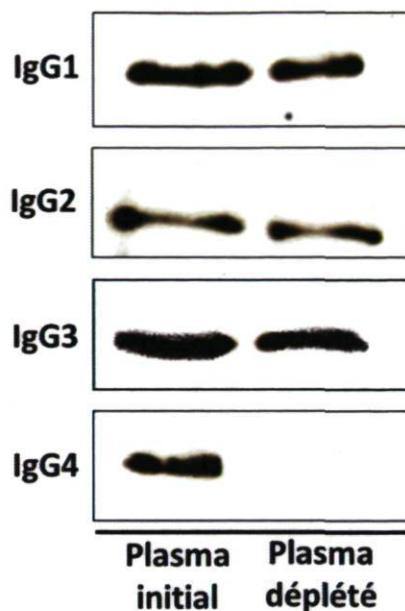
L'amplification et le séquençage du fragment de 623 pb ont été réalisés selon la méthode décrite au point 2.7.3.

### **3. Résultats**

#### **3.1 Élimination des HTLA par déplétion des IgG4**

##### ***3.1.1 Mise au point de la méthode***

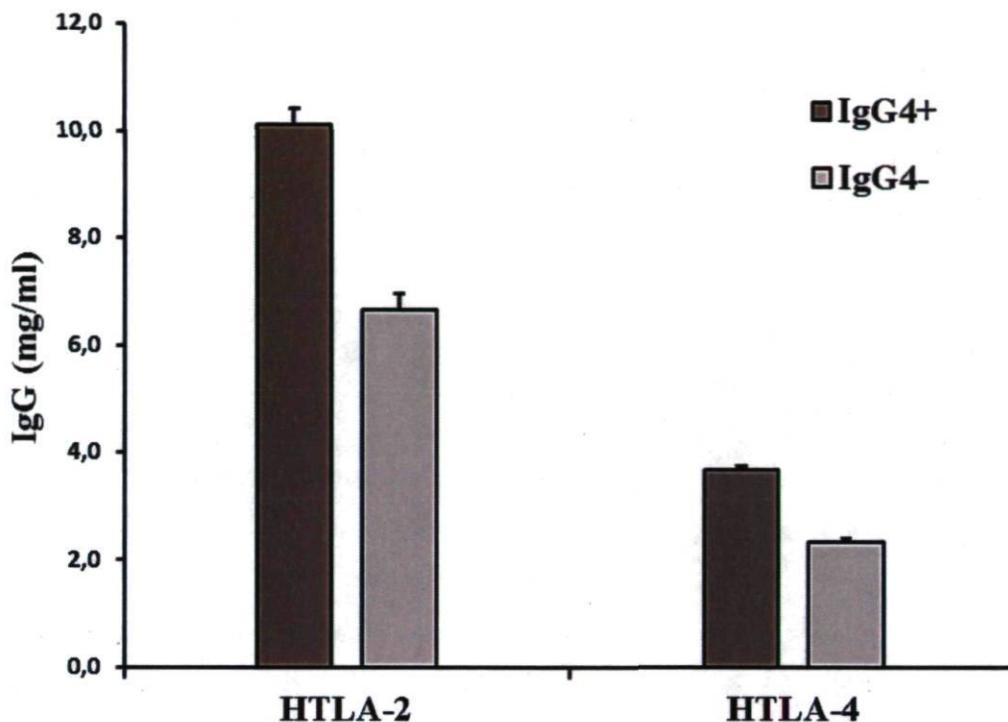
La méthode a été mise au point en utilisant du Seracon I. Différents ratios plasma : anticorps et dilutions ont été testés. Le but était de sélectionner une condition permettant d'éliminer toutes les IgG4 en préservant la réactivité contre les globules rouges du plasma non-déplété, malgré la dilution. Les essais ont démontré que l'utilisation du système dans des conditions (quantité de billes et d'anticorps) trois fois supérieures à celles recommandées par le fabricant permet de dépler 25 µl de plasma pur. Le plasma doit cependant être dilué afin d'obtenir un volume convenable pour réaliser la déplétion. Toutefois, aucune des dilutions utilisées n'a permis de préserver la réactivité contre les globules rouges. L'option d'utiliser le plasma dilué 12 fois et de le concentrer à 25 µl une fois la déplétion terminée a été privilégiée. Des tests en agglutination indirecte avec des plasmas dilués puis concentrés ont confirmé que cette étape permettait de retrouver la réactivité anti-globule rouge (résultats non présentés). Les analyses en immunobuvardage ont également permis de démontrer que ces conditions permettent d'éliminer complètement les IgG4 du plasma tout en n'affectant pas les autres sous-classes d'IgG que l'on veut préserver (Figure 3.1).



**Figure 3.1 : Efficacité et spécificité de la déplétion des IgG4.** Immunobuvardages du Seracon I non déplété et déplété en IgG4. Les échantillons non-déplétés ont été déposés comme suit : 90 ng d'IgG1, 2,5 µg d'IgG2, 500 ng d'IgG3 et 5 ng d'IgG4. La même dilution a été utilisée pour les échantillons déplétés. L'incubation avec les anti-IgG1, IgG2 et IgG3 démontre que la méthode n'affecte pas de manière significative ces trois sous-classes IgG. L'incubation avec l'anti-IgG4 démontre que la sous-classe a été éliminée complètement de l'échantillon.

### 3.1.2 Titrage des échantillons déplétés en IgG4

Lors des essais avec des plasmas contenant des HTLA, le taux d'IgG dans les échantillons traités et non traités a été dosé à titre de contrôle. Comme les résultats au point 3.1.1 l'indiquent, le taux d'IgG totales est demeuré assez stable après le traitement (Figure 3.2). Une perte maximale de 36,2% a pu être observée. Des résultats similaires ont été obtenus pour les IgM.



**Figure 3.2 : Dosage des IgG totales dans les plasmas déplétés et non-déplétés en IgG4.** Dosage réalisé en ELISA présentant le taux initial d'IgG dans les échantillons dilués et concentrés (IgG4+) ainsi que dans les échantillons passés sur colonne d'anti-IgG4 (IgG4-). Le traitement induit une baisse maximale de 36,2%. n=3

Les tests en agglutination n'ont pu être complétés qu'en partie seulement (Tableau 3.1). En raison de la faible quantité de matériel, les titrages ont dû être réalisés à partir de la dilution 1 : 4. Dans le cas de l'échantillon HTLA-2, cette dilution ne permet pas d'observer d'agglutination dans le tube non déplété. Il est donc impossible de déterminer l'effet de la déplétion sur la réactivité de l'échantillon. Toutefois, des essais réalisés antérieurement ont indiqué que le plasma déplété demeure réactif lorsque utilisé pur. Le titre se situerait donc entre 1 et 4. Pour ce qui est de l'échantillon HTLA-4, le plasma non-déplété présente un titre de 4. Le titre de l'échantillon déplété n'a pas pu être déterminé avec précision, mais il est inférieur à 4. Il y a donc eu perte de réactivité.

**Tableau 3.1 : Titrage des échantillons avec et sans IgG4**

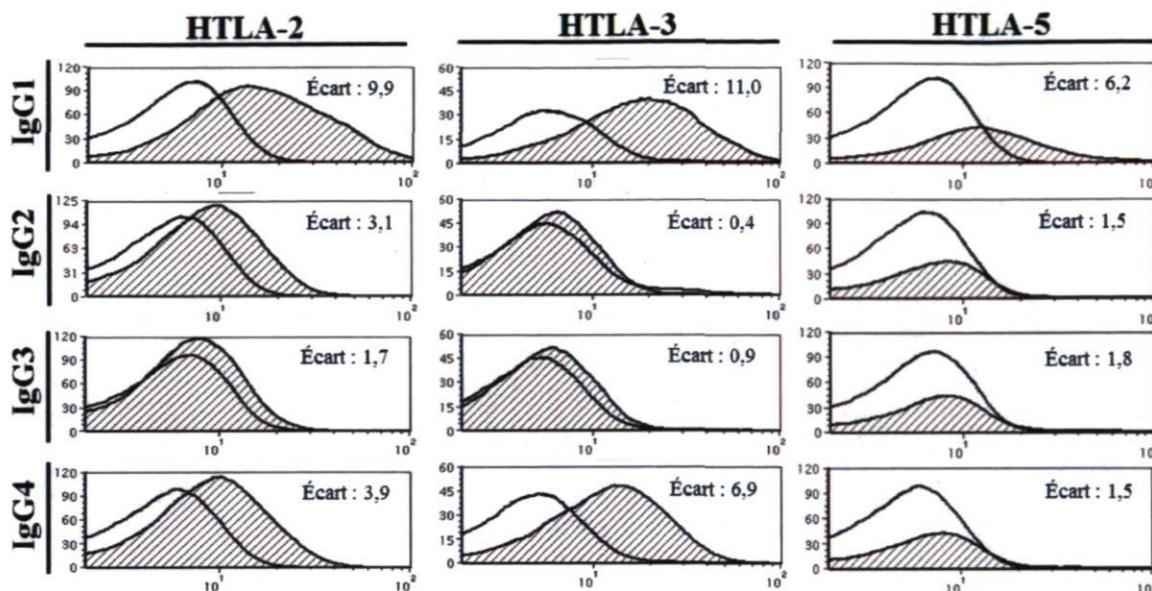
Échantillon	Cellule testée	IgG4+	IgG4-
HTLA-2	JMH+	<4	<4
HTLA-4	Kn <sup>a</sup> +	4	<4

Titration effectuée en gel LISS-IgG. Le titre indiqué correspond à la dernière dilution ayant donné un résultat positif. L'échantillon 2 contient un anti-JMH, l'échantillon 4 contient un anti-Kn<sup>a</sup>. Les échantillons ont été testés sur des cellules exprimant l'antigène cible. Un titre de <4 signifie que le titre n'a pas pu être déterminé précisément.

En raison d'une rupture de stock du produit *NHS SpinTrap HP*, un produit équivalent, soit le *NHS Sepharose 4 Fast Flow* du même fournisseur a été testé dans le but de compléter cette analyse. Les essais de validation ont toutefois démontré que ce produit ne permet pas d'obtenir des résultats similaires au *NHS SpinTrap HP*.

### 3.1.3 Analyse en cytométrie en flux des sous-classes HTLA

Les analyses en cytométrie en flux présentent des résultats variables entre les différents types d'échantillon (Figure 3.3). Tout d'abord, l'écart de fluorescence le plus élevé se trouve au niveau des IgG1 (6,2 à 11), et ce, dans les trois échantillons. Les échantillons avec anti-JMH (HTLA-2 et 3) présentent également une MFI plus élevée au marquage anti-IgG4 (3,9 et 6,9). Cette valeur est presque égale au signal IgG2 dans le cas de l'échantillon HTLA-2. La fluorescence de l'échantillon contrôle demeure constante peu importe la sous-classe testée, indiquant que l'écart de fluorescence est bien dû à la liaison d'anticorps spécifiques à la surface des globules rouges. Les HTLA semblent donc appartenir à plusieurs sous-classes d'IgG différentes.



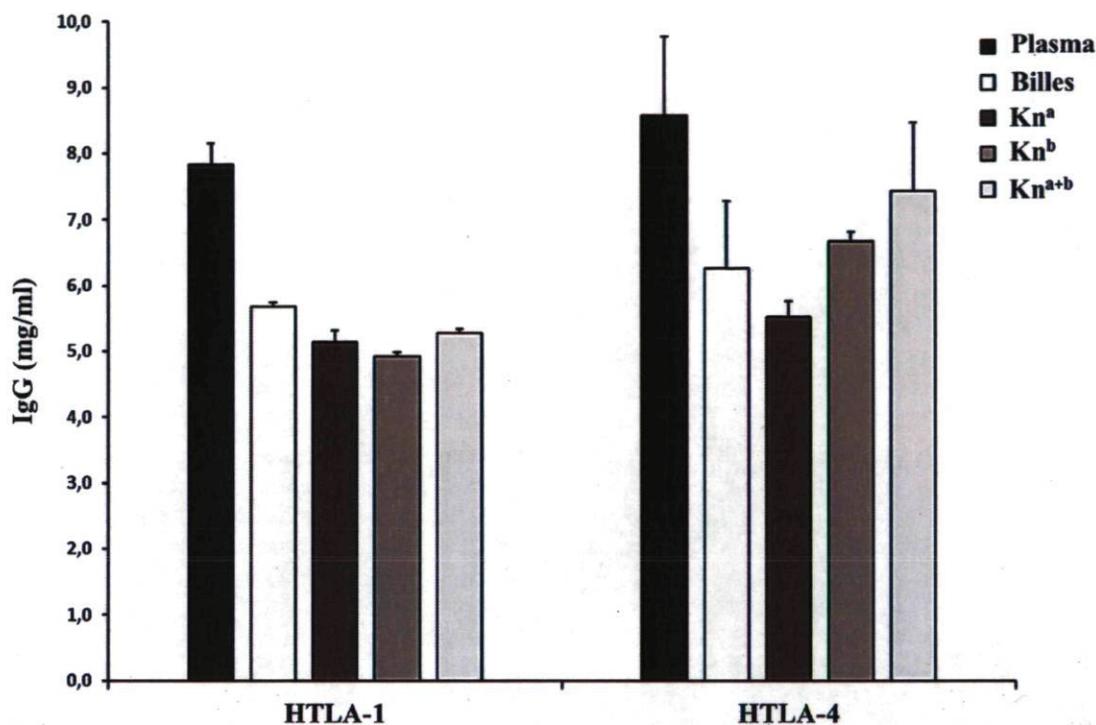
**Figure 3.3 : Analyse des sous-classes HTLA en cytométrie en flux.** Trois échantillons, deux avec anti-JMH et un avec anti-Kn<sup>a</sup>, ont été incubés avec des globules rouges O négatif puis marqués pour détecter la présence de chacune des quatre sous-classes. La courbe blanche représente l'échantillon contrôle testé avec le plasma O- autologue. La courbe hachurée représente l'échantillon avec HTLA. La valeur représente l'écart de fluorescence entre le contrôle autologue et le plasma HTLA. Écart marqué pour les IgG1 dans tous les échantillons. Écart pour les IgG4 dans les échantillons avec anti-JMH Résultats représentatifs de plusieurs essais avec les mêmes échantillons.

### 3.1.4 Dosage des IgG4 totales dans les plasmas HTLA

Les IgG4 ont été dosées dans plusieurs échantillons avec et sans HTLA. Les échantillons contrôles ont été sélectionnés aléatoirement avec comme seule information l'âge et le sexe du donneur. L'historique transfusionnel et des grossesses antérieures est inconnu. Les résultats sont illustrés à la Figure 3.4.

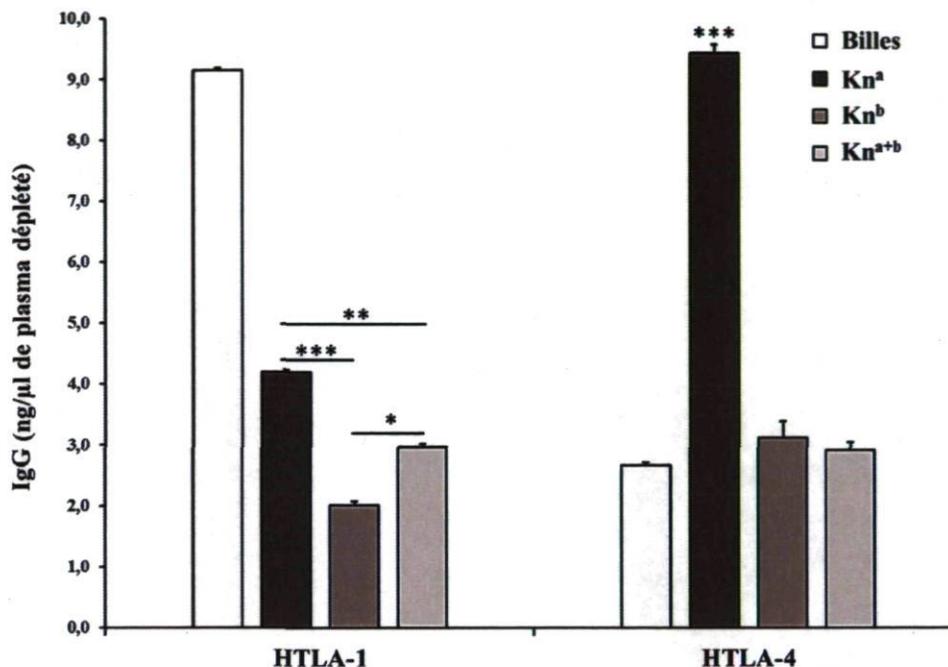


en particulier puisqu'il n'y aucune tendance significative observable chez les deux échantillons. Des tests en agglutination indirecte ont démontré que ce pourcentage d'IgG perdues permettait tout de même d'obtenir des résultats positifs (résultats non présentés).



**Figure 3.5 : Dosage des IgG totales dans les plasmas traités avec peptides de CR1.** Dosage réalisé en ELISA présentant le taux d'IgG initial (plasma) et après traitement. Deux échantillons contenant des anti-Kn<sup>a</sup> ont été utilisés. L'échantillon HTLA-1 contient également un anti-D WinRho (Ig intraveineuses contenant une plus grande proportion d'anti-D, traitement prophylactique chez les femmes enceintes D-). Le dosage a également été réalisé avec les plasmas passés sur billes non-couplées, sur pool de peptides Kn<sup>a</sup>, pool Kn<sup>b</sup> ou pool Kn<sup>a+b</sup>. Résultats représentatifs de plusieurs essais.

Dans un deuxième temps, la quantité d'IgG éluée des billes a été évaluée. Les IgG totales ont été dosées dans les éluats concentrés au même volume que le plasma initial, soit 60  $\mu$ l (Figure 3.6).



**Figure 3.6 : Dosage des IgG totales éluées des billes.** Dosage effectué en ELISA avec les différents éluats issus du traitement des échantillons de la Figure 3.5. Les résultats sont présentés en ng d'IgG éluées par  $\mu$ l de plasma déplété. Les éluats ont été recueillis des billes non-couplées, des billes avec pool de peptide Kn<sup>a</sup>, de Kn<sup>b</sup> ou de Kn<sup>a+b</sup>. Échantillon HTLA-1 : 9,1 ng, 4,2 ng, 2,0 ng, 3,0 ng, et échantillon HTLA-4 : 2,7 ng, 9,4 ng, 3,1 ng et 2,9 ng, respectivement. (\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.01, déterminé par ANOVA-Tukey)

Les billes non-couplées, devant servir de contrôle négatif, semblent retenir une quantité importante d'immunoglobulines dans l'échantillon HTLA-1. Des essais supplémentaires ont été réalisés en utilisant un autre plasma contenant l'anti-D WinRho, du Seracon I additionné de 80 ng/ $\mu$ l d'anti-D WinRho et du Seracon I, tous passés sur des billes non-couplées. Les résultats ont indiqué que cette forte liaison d'anticorps semble due à l'anticorps prophylactique (résultats non présentés) et cette réactivité semble être éliminée lorsque des peptides sont couplés aux billes.

En excluant les billes non-couplées, on note des différences entre la quantité d'IgG retenue par les billes selon les différents peptides utilisés. On constate dans chacun des cas que les peptides Kn<sup>a</sup> semble lier plus d'anticorps que les peptides Kn<sup>b</sup> ou un mélange des deux, qui retiennent un taux semblable à celui des billes non couplées. La différence entre le Kn<sup>a</sup> et les autres échantillons est statistiquement significative. Cela indiquerait donc que les anti-Kn<sup>a</sup> se lient préférentiellement au Kn<sup>a</sup>, tel qu'attendu. En raison de la faible quantité

d'anticorps élue, il est impossible d'associer la quantité d'IgG perdue (Figure 3.5 en mg/ml) à celle récupérée (Figure 3.6 en ng/ $\mu$ l).

### 3.2.2 Titrages et tests en agglutination indirecte

Les échantillons de plasma ont ensuite été testés pour observer leur réactivité. Pour ce faire, un titrage a tout d'abord été effectué afin d'observer une baisse de réactivité dans les échantillons traités par rapport au plasma initial (Tableau 3.2).

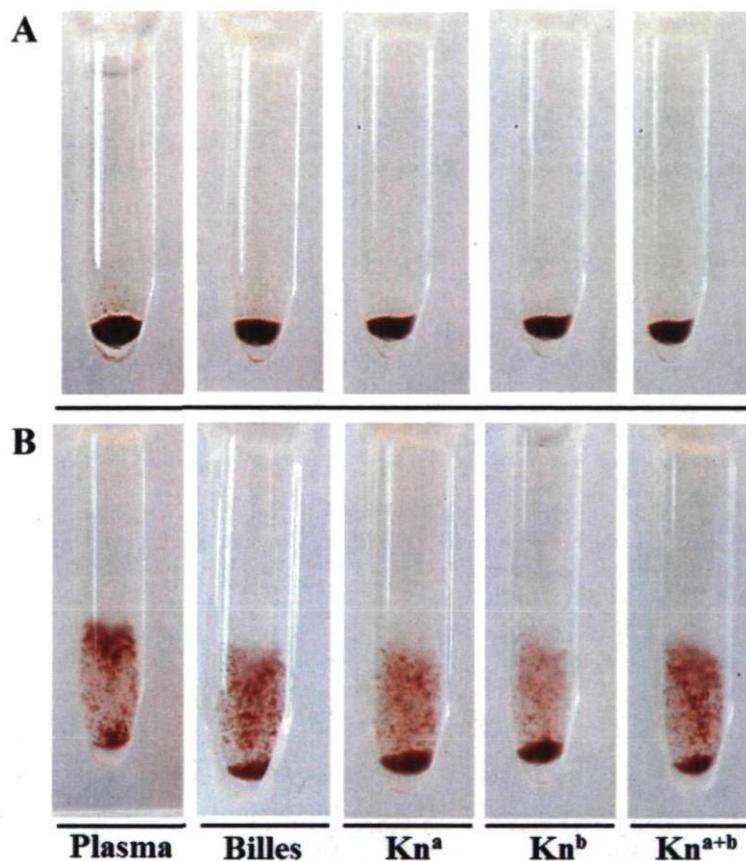
**Tableau 3.2 : Titration des échantillons traités avec peptides de CR1**

	Cellule testée	Plasma	Billes	Kn <sup>a</sup>	Kn <sup>b</sup>	Kn <sup>a+b</sup>
<b>HTLA-1</b>	D-, Kn <sup>a+</sup>	4	2	2	2	2
	D+, Kn <sup>a+</sup>	4	4	4	4	4
<b>HTLA-4</b>	D-, Kn <sup>a+</sup>	4	2	2	2	2
	D+, Kn <sup>a+</sup>	NT	NT	NT	NT	NT

Titration effectué en gel LISS-IgG. Le titre indiqué correspond à la dernière dilution ayant donné un résultat positif. Les échantillons ont tout d'abord été testés sur des cellules D-, Kn<sup>a+</sup>. Le plasma présente un titre de 4, comparativement à un titre de 2 pour les échantillons traités. L'échantillon HTLA-1, contenant un anti-D WinRho a également été testé sur des cellules D+, Kn<sup>a+</sup>, et présente un titre de 4 pour tous les échantillons. NT : non testé.

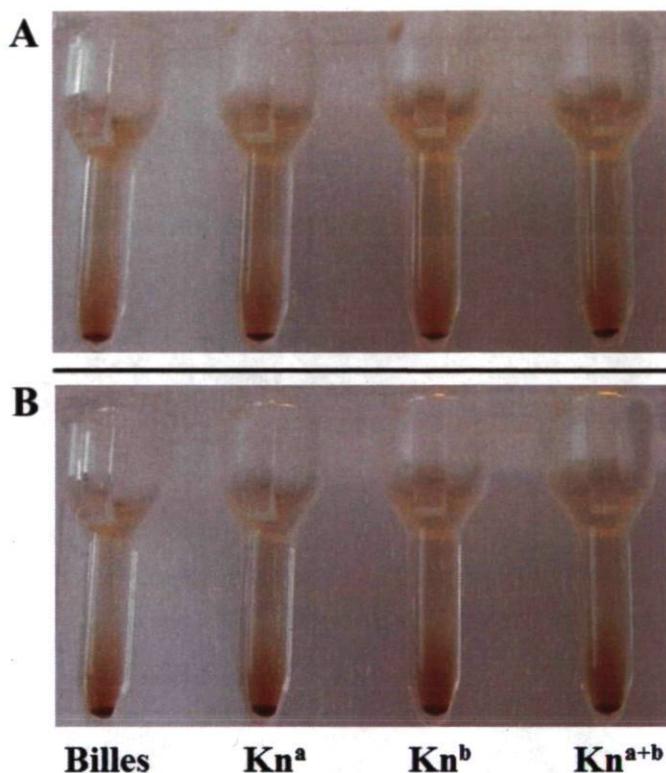
Le titration de l'échantillon HTLA-1 sur cellules D-, Kn<sup>a+</sup> indique que le plasma non traité possède un titre de 4. Le titration des échantillons traités sur billes a donné un titre de 2. Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'HTLA-4. Cette diminution du titre indique une baisse de réactivité. Par contre, la réduction du titre n'est spécifique à aucun peptide. Afin de s'assurer que cette baisse de réactivité n'était pas simplement due à la manipulation des échantillons, un titration de l'échantillon 1 a été effectué sur des cellules D+. Cet échantillon contient un anti-D, c'est donc cet anticorps qui est testé dans ce cas-ci étant donné la force de réaction de cet anticorps par rapport à l'anti-Kn<sup>a</sup>. Les résultats indiquent un titre de quatre pour tous les échantillons. Les échantillons traités se comportent de la même manière que le plasma non traité (Figure 3.7), confirmant ainsi que la réactivité inattendue

de l'anti-D WinRho observée à la Figure 3.6 n'a pas d'impact visible. La réactivité de l'anticorps n'a pas été affectée ou perdue suite aux manipulations.



**Figure 3.7 : Test en agglutination indirecte des échantillons déplétés.** Les échantillons déplétés ont été testés sur différentes cellules. Cette figure représente un exemple du résultat obtenu au titre du plasma initial. A) Test effectué sur cellules D-. À la dilution 1 : 4, l'anti-Kn<sup>a</sup> réagit dans le plasma non-traité et ne réagit plus une fois traité. On note la faible réactivité, typique des HTLA. B) Test effectué sur des cellules D+. À la dilution 1 : 4, l'anti-D possède une réactivité de 2+, que l'échantillon ait été traité ou non.

Par la suite, les éluats issus de ces deux échantillons ont également été testés en agglutination indirecte afin de vérifier si les anticorps retenus par les colonnes possédaient une réactivité contre les globules rouges (Figure 3.8). Tous les échantillons ont donné une agglutination sous forme de trace. Cela indique donc que les immunoglobulines retenues par les colonnes possèdent une réactivité contre les globules rouges. Cependant, elles sont présentes en quantité trop faible pour que l'essai fournisse une sensibilité permettant de mettre en évidence une différence entre les échantillons.



**Figure 3.8 : Test en agglutination indirecte des éluats de billes couplées aux peptides de CR1.** Les échantillons ont été utilisés purs et testés sur des cellules D<sup>-</sup>, Kn<sup>a+</sup>. On observe une agglutination sous forme de trace pour tous les échantillons. A) Échantillon HTLA-1 B) Échantillon HTLA-4.

### 3.3 Analyse de la base moléculaire de l'antigène Yk<sup>a</sup>

#### 3.3.1 Génotypage des antigènes du système Knops

Les résultats obtenus lors du génotypage des antigènes du système Knops sont résumés dans le Tableau 3.3. Tous les échantillons expriment les polymorphismes normaux pour les antigènes Kn, McC et Sl, dont les phénotypes probables sont les plus fréquents au sein de la population. Le génotypage de l'antigène Yk<sup>a</sup> démontre quant à lui que la majorité des échantillons contrôles possèdent le polymorphisme associé à la présence de l'antigène. Deux d'entre eux sont hétérozygotes. Au niveau des échantillons suspectés Yk<sup>a</sup> négatif suite aux analyses sérologiques, quatre individus sur six ont été confirmés Yk<sup>a</sup> négatif au niveau génétique. Les deux autres sont Yk<sup>a</sup> positif homozygote ou hétérozygote.

**Tableau 3.3 : Phénotype attendu suite au génotypage des antigènes du système Knops**

Échantillons	Knops	McC	SI1/2	SI3	KCAM	York a
1	a	a	1	+	+	-
2	a	a	1	+	-	+
3	a	a	1	+	+	-
4	a	a	1	+	+	-
5	a	a	1	+	+	+/-
6	a	a	1	+	+	-
C1	a/b	a	1	+	+	+
C2	a	a	1	+	-	+
C3	a	a	1	+	+	+/-
C4	a	a	1	+	+/-	+/-
C5	a	a	1	+	+	+
C6	a	a	1	+	+	+

Les polymorphismes ont été déterminés par PCR-RFLP ou par séquençage. Les résultats en rouge indiquent l'allèle mutée. Voir le tableau 2.1 pour la description des échantillons. La lettre C représente les contrôles choisis aléatoirement dans la banque de donneurs avec consentement d'Héma-Québec.

### 3.3.2 Analyse des polymorphismes quantitatifs

Les résultats de l'analyse moléculaire des polymorphismes quantitatifs exprimés par le CR1 sont présentés au Tableau 3.4 Les résultats varient entre les échantillons. Tout d'abord, on constate que l'échantillon C2 possède toutes les allèles d'expression faible de la molécule. Cette observation corrèle avec ceux obtenus en cytométrie (section 3.4.3). L'échantillon 2 exprime quant à lui trois allèles d'expression faible de la molécule.

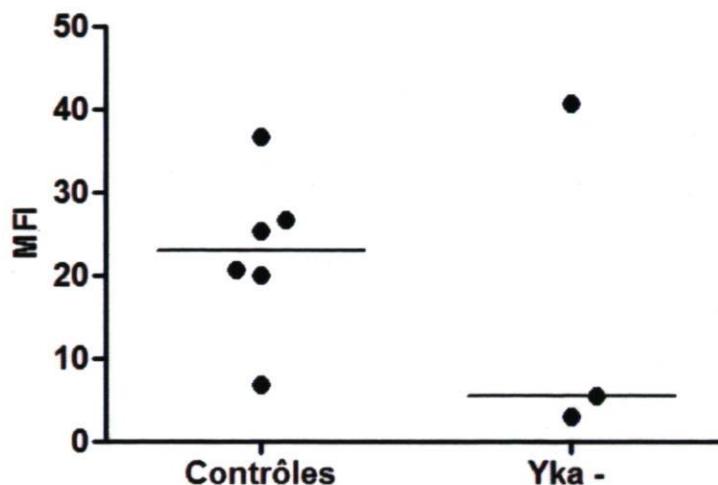
**Tableau 3.4 : Analyse moléculaire des polymorphismes quantitatifs du CR1**

Échantillons	3066G>T	4843A>G	5480C>G	<i>HindIII</i>
1	G	A	C	-
2	G	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>+</b>
3	G	A	C	-
4	G	A	C	-
5	G	A	C	-
6	G	A	C	-
C1	G	A	C	-
C2	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>+</b>
C3	G	A	C	-
C4	G	A	C	-
C5	G	A	C	-
C6	G	A	C	-

Les polymorphismes ont été déterminés par PCR-RFLP ou par séquençage. Les résultats en rouge indiquent l'allèle mutée.

### 3.4.3 Estimation du CR1/E

L'évaluation de la densité de CR1 par érythrocyte des échantillons contrôles et des Yk<sup>a</sup>- a été limitée par la disponibilité des échantillons de globules rouges. Seulement trois des sept Yk<sup>a</sup>- ont pu être testés (Figure 3.9)



**Figure 3.9 : Densité de CR1 par érythrocyte chez les Yk<sup>a</sup>-.** La quantité de CR1 par érythrocyte chez les contrôles et les échantillons Yka- a été évaluée par un marquage anti-CD35 des globules rouges et une analyse en cytométrie en flux. La densité de CR1 est évaluée en fonction de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI). Le trait horizontal représente la médiane pour chaque groupe.

Les échantillons contrôles représentent bien les différents phénotypes faibles, intermédiaires et élevés observables au sein d'une population. L'échantillon C2 est celui présentant la plus faible MFI parmi les contrôles, ce qui corrèle avec les polymorphismes quantitatifs identifiés. La distribution chez les Yk<sup>a</sup>- tend à être semblable. Par contre, deux échantillons sur trois présentent un faible taux de CR1, tandis qu'il s'agit d'un phénotype plus rare chez les échantillons contrôles (un sur six). La disponibilité des échantillons ne permet cependant pas de vérifier la corrélation entre les génotypes et le CR1/E de tous les échantillons. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons serait nécessaire.

### 3.3.4 Allèles F et S

L'ARN nécessaire à l'analyse des allèles F et S n'était disponible que pour les échantillons 1, 2, 3 et 5. De ces quatre individus, deux expriment l'allèle S (échantillons 2 et 3). L'allèle F prévaut au sein des contrôles.

### ***3.3.5 Séquençage du peptide signal***

L'analyse du peptide signal a permis d'identifier plusieurs polymorphismes au niveau de cette séquence. Toutefois, ces variations semblent se retrouver normalement au sein de la population et aucune n'a pu être associée spécifiquement au Yk<sup>a</sup>-. De plus, puisque les variations sont nombreuses, il est difficile de prévoir l'effet réel de ces dernières sur l'expression et le transport du CR1. La traduction des séquences modifiées entraîne la synthèse d'une protéine complète.

## 4. Discussion

### 4.1 Neutralisation des HTLA du plasma

Au début de ce projet de maîtrise, quelques essais visant à produire un fragment soluble de CR1 ont été réalisés, sans succès. Cette constatation peut être liée à plusieurs facteurs intervenant tout au long du processus, dont l'instabilité de l'ARNm du CR1, sa grande taille ainsi que ses motifs répétés. De plus, il est probable que le promoteur du vecteur d'expression eucaryote ait été trop fort pour la lignée cellulaire utilisée, bien que ce système ait démontré son efficacité au cours de travaux précédents [50]. Quoiqu'il en soit, bien que la capacité de fragments solubles de CR1 à neutraliser les anti-Kn ait été démontrée précédemment, son utilisation présente certaines limites, la première étant la nécessité de produire plusieurs clones d'expression stable, un par polymorphisme du système Knops. De plus, le CR1 possède plus de 30 sites de glycosylation potentiels qui peuvent être nécessaires à la reconnaissance des fragments par les anticorps produits *in vivo*. Il est difficile de prévoir ce patron de glycosylation à l'intérieur d'une protéine partielle produite par génie génétique. Finalement, les fragments solubles sont reconnus pour leur capacité à neutraliser les anti-Kn, mais aucune analyse supplémentaire n'a été effectuée afin de démontrer s'il s'agissait d'une neutralisation partielle ou complète. L'utilisation du système *NHS SpinTrap HP* avec les anti-IgG4 ou les peptides de CR1 a donc été privilégiée.

Ces travaux de maîtrise ont permis de mettre au point une méthode fiable et efficace permettant de dépléter les IgG4 du plasma humain tout en conservant les autres immunoglobulines d'intérêt en immunologie érythrocytaire. Les analyses sérologiques des échantillons déplétés ont été réalisées partiellement en raison d'une rupture de stock du système *NHS SpinTap HP*. Des tests réalisés avec les billes *NHS Sepharose 4 Fast Flow* ont démontré qu'elles ne pouvaient pas être utilisées à titre d'équivalent. Cela peut être en partie dû à une différence entre la taille, la matrice ou la molécule d'espacement des billes. Ce système pourrait sans doute être utilisé, mais nécessiterait une mise au point complète. Les analyses sérologiques ont démontré que la déplétion des IgG4 diminuait la réactivité des HTLA, sans toutefois l'éliminer complètement. Ces observations peuvent être interprétées de plusieurs manières. La perte de réactivité peut être due uniquement à la

perte d'immunoglobulines et à la dilution des échantillons. De plus, la réactivité résiduelle peut être due à la présence d'IgG4 non déplétés qu'il est impossible de détecter par les méthodes d'analyses utilisées. Finalement, il est également possible que, contrairement à ce qui est proposé, les HTLA n'appartiennent pas uniquement à la sous-classe 4 des IgG.

Suite à ces observations, les sous-classes IgG des HTLA ont été analysées en cytométrie en flux. Ces essais ont permis de démontrer que les HTLA ne semblent pas appartenir exclusivement aux IgG4. Cependant, il n'en demeure pas moins que des IgG4 ont été élués de globules rouges incubés avec certains anticorps de type HTLA, d'où le fait que certains auteurs les associent [11, 12]. Cette observation s'expliquerait sans doute par l'analyse des étapes de la réponse immunitaire normale. Lors de la première stimulation antigénique, les IgM sont les premières immunoglobulines à être sécrétées. Au fil du temps, la réponse immunitaire évolue selon le type et la nature de la stimulation antigénique perçue par l'organisme. Ainsi, il y a production de différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines selon le type d'antigène. Il est bien connu que les HTLA mènent à la sécrétion d'IgG. Cependant, il est difficile de les associer à une sous-classe en particulier. Les gens produisant des HTLA sont souvent des personnes plus âgées et polytransfusées. La réponse immunitaire dirigée contre ces antigènes évolue donc depuis longtemps. Les IgG4 sont généralement associés aux mécanismes de tolérance, induits par une exposition prolongée à l'antigène. C'est ce qui expliquerait donc le fait que les HTLA et les IgG4 sont souvent associés. Par contre, les échantillons reçus dans les laboratoires d'immunologie érythrocytaire incluent également des femmes enceintes, qui sont au tout début de leur réponse immunitaire. Les immunoglobulines retrouvées dans les échantillons peuvent donc être très variables selon la condition physiologique des individus.

Certaines observations semblaient indiquer que les individus ayant des HTLA possédaient un taux d'IgG4 sérique plus élevé, corrélant ainsi avec la particularité du titre élevé. Les analyses ont toutefois indiqué qu'il n'existait aucune tendance réelle, mais que le taux d'IgG4 était très variable entre les individus, ce qui peut complexifier la méthode de déplétion dans les cas où un individu présenterait un taux d'IgG4 supérieur à la moyenne. D'autant plus que cette méthode ne permet la déplétion que de 25 µl de plasma seulement,

ce qui est largement insuffisant pour procéder à l'analyse sérologique complète d'un échantillon.

Puisque les HTLA ne semblent pas être exclusivement de type IgG4, il est difficile d'expliquer le comportement de ce type d'anticorps. Les IgG sont considérées comme étant des anticorps cliniquement significatifs, c'est-à-dire qu'ils peuvent induire des réactions transfusionnelles ou la maladie hémolytique du nouveau-né. Les HTLA sont de type IgG mais ne présentent aucune de ces propriétés. On pourrait donc supposer que la cause se trouve du côté de l'antigène plutôt que de l'anticorps. On peut notamment suspecter la faible densité antigénique de la majorité des groupes sanguins associés aux HTLA.

Les travaux réalisés ont également permis de tester la capacité de peptides synthétiques de CR1 à neutraliser les anti-Kn<sup>a</sup>. Encore une fois, la méthode mise au point n'affecte pas de manière significative le taux d'IgG totales. Les analyses en ELISA ont quant à elles démontré que les peptides Kn<sup>a</sup> retiennent préférentiellement et significativement les IgG d'un échantillon contenant un anti-Kn<sup>a</sup>. Les tests sérologiques démontrent, quant à eux, que la méthode semble partiellement efficace. En effet, les échantillons présentent encore une réactivité contre les globules rouges en démontrant une force de réaction d'un titre moins élevé que celui du plasma non traité. Il y a donc eu perte de réactivité. Par contre, cette perte de réactivité est identique pour tous les traitements, incluant les billes sans peptides, laissant croire à un effet non spécifique ou à la perte d'immunoglobulines. Cependant, les tests réalisés avec des cellules D positives n'ont montré aucune perte de réactivité significative pour ce type d'anticorps. Les résultats observés semblent donc spécifiques aux anti-Kn<sup>a</sup>. De plus, ce résultat indique que la méthode permet de détecter un anticorps significatif après le traitement.

Les essais réalisés avec les éluats ont quant à eux donné des résultats faiblement positifs dans tous les tubes. On aurait pu s'attendre à une réaction positive dans le tube Kn<sup>a</sup> et un résultat plus faible ou négatif dans les autres. Il est possible que les billes aient toutes adsorbé des anti-Kn<sup>a</sup> de manière non-spécifique. Par contre, on peut davantage soupçonner le processus général faisant intervenir un passage en acide suivi d'une neutralisation. L'acide peut avoir altéré les immunoglobulines, et le Tris-HCl n'est pas une solution utilisée lors des essais en sérologie.

Malgré tout, on ne peut écarter les résultats obtenus en ELISA, démontrant une liaison plus importante des immunoglobulines sur les peptides Kn<sup>a</sup>. Initialement, les plasmas non traités démontrent une faible réactivité, comme c'est souvent le cas avec les HTLA. Par contre, ils ont également présenté des titres faibles, ce qui n'est pas attendu de ce type d'anticorps. Cette observation peut être liée au stade de développement de la réponse immune du sujet, ou encore à l'âge et aux conditions de conservation des échantillons. Puisque les échantillons utilisés réagissent faiblement et à de faibles titres, la marge de manœuvre de la méthode d'analyse est grandement limitée. Un écart d'un titre est considéré comme non significatif en sérologie. Il devient donc difficile de déterminer si les résultats observés sont dus à la perte d'immunoglobulines ou à l'efficacité de la neutralisation. L'ELISA possède une sensibilité de détection qu'il est pratiquement impossible de retrouver en agglutination. C'est pourquoi il peut être complexe de faire correspondre les résultats macroscopiques avec ces données.

Ces observations laissent cependant entrevoir plusieurs options. D'une part, plusieurs passages successifs pourraient être testés afin d'observer une baisse supplémentaire de réactivité. Cette façon de faire est d'ailleurs utilisée pour certains anticorps neutralisés par des substances solubles, comme les anti-P1 ou les anti-Lewis [7, 10, 12]. Les plasmas sont neutralisés, testés de nouveau, et s'ils réagissent toujours, ils sont traités à nouveau. Par contre, des analyses préliminaires semblent démontrer que le taux d'IgG récupéré dans les éluats se stabilise après seulement un passage.

Afin de limiter la perte non spécifique d'immunoglobulines, les billes pourraient être bloquées avant incubation avec le plasma, par exemple avec de l'albumine sérique bovine (BSA). Les *flow through* de lavage pourraient également être récupérés afin de récupérer la plus grande quantité possible d'anticorps et limiter l'impact de la perte d'immunoglobulines sur la réactivité de l'échantillon. Il faudrait cependant considérer la présence d'urée dans l'échantillon. Le contrôle négatif traité avec des billes non-couplées pourrait également être couplé avec la BSA afin de contrer les effets observés chez les patientes ayant reçu l'anti-D WinRho, mais il est difficile d'expliquer avec précision ces observations. Bien qu'il s'agisse d'immunoglobulines humaines, il est possible que le procédé de fabrication induise une réactivité inattendue contre la matrice des billes. Ce

phénomène n'est cependant pas critique puisque l'anti-D est indiqué au dossier de la patiente et qu'il ne fait pas partie de sa propre réponse immunitaire. Un peptide de CR1 sélectionné dans une région non polymorphique du CR1 avait d'abord été envisagé à cette fin, mais il semble que certains individus, avec ou sans HTLA, réagissent fortement contre ce type de peptide.

Afin de faciliter les études sérologiques, des plasmas réagissant plus fortement et à des titres plus élevés pourraient être sélectionnés, mais la disponibilité des échantillons complique cette étape.

Finalement, les tests effectués sur les cellules D positives ont démontré que ce type d'anticorps significatif réagit plus longtemps que l'anti-Kn<sup>a</sup> une fois traité. Dans l'éventualité où les peptides de CR1 ne permettraient pas d'éliminer complètement la réactivité des anti-Kn<sup>a</sup>, une approche appuyée par ces résultats pourrait être envisagée. Il faudrait tout d'abord procéder au titrage des échantillons et utiliser la dilution à laquelle le plasma traité cesse de réagir. Les plasmas pourraient donc être traités, dilués et testés. La réactivité HTLA serait donc éliminée et l'élimination pourrait être effectuée seulement en fonction de l'anticorps significatif. Cette méthode nécessiterait cependant la présence d'un anticorps significatif réagissant fortement. Évidemment, des analyses plus poussées seraient requises afin de déterminer ce qui entraîne réellement la perte de réactivité de l'anticorps : dilution, perte d'immunoglobuline, suspension en TBS, réactivité contre la matrice des billes ou contre les peptides de CR1. Une approche différente de l'agglutination, le MAIEA (*Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Erythrocyte Antigens*), pourrait être utilisée afin d'évaluer la réactivité des anticorps élués. Cette méthode permet d'étudier la liaison spécifique des anticorps aux antigènes de globules rouges en utilisant un principe semblable à l'ELISA, incluant sa sensibilité de détection.

Les HTLA sont généralement considérés comme étant impossible à adsorber. Cela signifie que même après plusieurs rondes en contact avec des globules rouges exprimant leur antigène cible, les anticorps ne sont pas éliminés. L'idée de neutraliser ce type d'immunoglobulines à l'aide d'un support solide soulève donc un certain questionnement. Il serait peut-être préférable d'ajouter directement les peptides de CR1 en solution dans le plasma à neutraliser, comme c'est le cas dans les techniques de neutralisation d'usage en

sérologie. Cela éviterait donc de diluer l'échantillon et éliminerait les nombreuses étapes au cours desquelles les anticorps peuvent se décrocher des billes et retourner dans l'échantillon. Rien n'indique cependant que la liaison entre les anticorps et les peptides peut être suffisamment forte pour demeurer stable au cours des analyses. La synthèse de peptides de plus grande taille ou présentant une séquence différente pourrait être envisagée afin de favoriser une meilleure liaison des anticorps. La méthode des IgG4 a l'avantage d'intervenir au niveau de la portion constante de la molécule au lieu de sa spécificité. Cependant d'autres problèmes surviennent, notamment la grande quantité d'immunoglobulines à déléter et la similarité entre les domaines Fc des quatre sous-classes d'IgG pouvant entraîner des réactions non spécifiques. La méthode utilisant les peptides synthétiques semble donc la plus prometteuse. Néanmoins, la mise au point d'un système de neutralisation efficace sera toujours limitée par les propriétés complexes des HTLA, la disponibilité des échantillons et la grande variabilité entre les individus.

#### **4.2 Analyse de la base moléculaire de l'antigène Yk<sup>a</sup>**

L'analyse des polymorphismes connus du CR1 a permis de dresser un profil complet des individus suspectés Yk<sup>a</sup> négatif dans le but d'identifier la base moléculaire de cet antigène. Le génotypage des antigènes Kn, McC, S1 et KCAM a démontré que ces individus expriment les polymorphismes les plus fréquemment retrouvés au sein de la population caucasienne. La même distribution est retrouvée au sein des contrôles. Les individus Yk<sup>a</sup>-ne présentent donc aucune caractéristique particulière à ce niveau.

Pour ce qui est des polymorphismes quantitatifs, on constate que la majorité des individus expriment des polymorphismes d'expression élevée. Il n'existe cependant pas de statistiques publiées concernant la prévalence de ces différents génotypes au sein de la population. Le point le plus intéressant se trouve au niveau de la correspondance entre le génotype et les résultats obtenus en cytométrie. L'échantillon contrôle C2 possède toutes les allèles d'expression faible de la molécule sous forme homozygote. Cette observation corrèle avec le résultat obtenu en cytométrie. Cette méthode permet donc d'observer les différences au niveau de l'expression de la molécule. Par contre, certains échantillons contrôles ont présenté des fluorescences intermédiaires, et ce malgré la présence des allèles

d'expression élevée sous forme homozygote. D'autres polymorphismes pourraient donc être impliqués dans la régulation de l'expression du CR1. Les résultats obtenus avec les échantillons Yk<sup>a</sup>- ne corrèlent cependant pas tous. En effet, l'échantillon 3 possède toutes les allèles d'expression élevée du CR1, mais présentent un faible taux de CR1 en cytométrie. L'échantillon 2, quant à lui, exprime quelques-unes des allèles d'expression faible du CR1, ce qui peut justifier le faible taux de CR1 détecté en cytométrie. Par contre, on aurait pu s'attendre à détecter un niveau intermédiaire étant donné la présence de certaines allèles d'expression élevée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations. Tel que mentionné ci-haut, il est possible que d'autres polymorphismes soient associés au niveau d'expression de la molécule. Il est également possible qu'une mutation soit survenue dans la région reconnue par l'anti-CD35 monoclonal utilisé pour les marquages. Cependant, cet anticorps est jusqu'à maintenant reconnu pour ne pas être influencé par les différents polymorphismes du CR1. Il est également possible que des mutations soient survenues au niveau des régions promotrices et du peptide signal, influençant ainsi l'expression ou le transport de la molécule. Ce type de mutation est connu pour certains groupes sanguins, le cas de la boîte *GATA* du système Duffy en est un exemple [7].

L'hypothèse du peptide signal a donc mené à l'analyse de ce fragment par séquençage. Les séquences obtenues ont démontré plusieurs polymorphismes au niveau de cette section. Par contre, les variations sont distribuées sans préférence entre les individus contrôle et Yk<sup>a</sup>-. De plus, la traduction des séquences modifiées indique la production d'une protéine complète. Bien que quelques acides aminés soient modifiés, il ne semble y avoir aucun effet puisque les analyses en cytométrie ont démontré que la majorité des échantillons contrôles expriment un niveau intermédiaire à élevé de CR1.

Afin de compléter le profil du CR1, les allèles de taille F et S ont été analysées. Deux des quatre échantillons testés expriment l'allèle S. Par contre, plusieurs ouvrages ont affirmé que la taille du CR1 n'avait aucune influence sur les groupes sanguins du système Knops [23]. Il est donc difficile d'y voir une piste plausible.

La publication des travaux de Veldhuisen *et al.* rapportant l'association du polymorphisme 4223C>T au phénotype Yk<sup>a</sup>- négatif a permis de compléter le profil du CR1. Ainsi, tel que

l'indique les statistiques, la prévalence de ce phénotype est rare au sein des échantillons contrôles. Pour ce qui est des échantillons Yk<sup>a</sup> négatif sélectionnés, quatre ont été confirmés, justifiant ainsi la détection de l'anticorps en sérologie. Par contre, deux échantillons n'ont pas été confirmés négatifs. L'échantillon 5 est polymorphique, mais il est peu probable qu'il ait développé un anticorps en raison de la présence des deux allèles. Il est donc impossible pour le moment d'identifier l'anticorps détecté en sérologie.

Deux cas demeurent non expliqués, et il existe peu d'indice au niveau des différents génotypes de ces individus. Le séquençage de l'ARNm du CR1 aurait pu permettre d'obtenir d'autres informations et d'identifier le polymorphisme du York a. Des travaux ont été entrepris à cet égard, mais la grande instabilité de l'ARNm du CR1 et sa grande taille complexifient grandement les analyses. D'autant plus qu'il est difficile d'obtenir les échantillons immédiatement après le prélèvement.

Le séquençage des deux individus non confirmés demeure la principale option. L'absence de concordance entre l'anticorps observé en sérologie et le résultat du séquençage du polymorphisme publié peut s'expliquer de plusieurs manières. D'abord, il est possible que l'antigène York a soit déterminé par plus d'un polymorphisme. Il est connu que certains phénotypes, le S13 par exemple, soit associé à la présence de deux polymorphismes conjointement [23]. Cette nécessité peut même aller au niveau des positions *cis* et *trans* pour certains antigènes érythrocytaires. Il est également possible que ces individus possèdent un autre antigène du CR1 inconnu à ce jour. À ce sujet, il serait intéressant de croiser les différents plasmas et globules rouges des six individus testés afin d'observer des différences dans la réactivité des anticorps développés. La piste de l'antigène inconnu demeure la principale à considérer. D'ailleurs, un échantillon qui nous a été référé a été identifié Yk<sup>a+</sup>, mais a présenté deux polymorphismes hétérozygotes inconnus dans l'exon 26 du *CR1* (résultats non présentés).

Pour ce qui est de l'échantillon 2 plus spécifiquement, la production d'anticorps pourrait également s'expliquer par le faible taux de molécule à la surface des globules rouges. Le système aurait donc considéré cette molécule comme étant étrangère et aurait induit une réponse malgré le fait qu'il s'agisse d'une molécule exprimée par l'individu. Cependant, les analyses sérologiques ont indiqué qu'il ne s'agissait pas d'un autoanticorps. Si l'individu

exprimait un phénotype normal, des anticorps auraient été détectés à la surface de ses globules rouges.

Plusieurs facteurs sont donc à considérer lors de l'analyse des antigènes du système Knops. Cependant, il est difficile d'évaluer l'impact réel de chacun de ces éléments sur l'antigène exprimé à la surface des globules rouges. La production d'anticorps implique nécessairement qu'une immunisation soit survenue. L'origine ethnique, la condition physique, les polymorphismes, tant au niveau de l'expression que de la constitution même de l'antigène, sont tous des facteurs pouvant influencer le développement d'un tel anticorps. C'est ce qui justifie que les phénotypes déterminés en laboratoire de référence ne concordent pas toujours avec ceux prédits en génotypage.

## 5. Conclusion

Ces travaux de maîtrise ont permis de tester plusieurs méthodes de neutralisation des anticorps HTLA. La méthode utilisant des peptides synthétiques semble être la plus prometteuse. La mise au point d'une technique de neutralisation efficace des anti-Kn<sup>a</sup> pourrait par la suite s'appliquer aux autres HTLA connus, tels le JMh et le Chido-Rodgers. Un pool de peptides anti-HTLA pourrait ainsi être développé et faciliterait grandement la tâche du personnel en laboratoire d'immunologie érythrocytaire.

Les travaux sur l'antigène Yk<sup>a</sup> ont quant à eux permis de dresser un profil général des individus identifiés Yk<sup>a</sup>- au cours des analyses sérologiques. Bien que résolue en partie, l'analyse de la base moléculaire des antigènes portés par le CR1 demeure incomplète.

Ces travaux démontrent toute la complexité de ce type de système sanguin et ont mis en évidence tout le mystère au sujet des HTLA. Beaucoup d'interrogations demeurent quant à leur nature et leur fonctionnement pour le moins singuliers. Sous ces réponses se trouvent peut-être la clé menant à une meilleure prise en charge des échantillons contenant des HTLA. L'identification constante de la base moléculaire d'antigènes érythrocytaires contribue grandement au développement d'outils permettant de contourner les problèmes engendrés par ces échantillons et demeure nécessaire. Néanmoins, bien que le génotypage représente un outil précieux et fort utile, les analyses sérologiques demeurent essentielles au typage sécuritaire des échantillons de sang.

## Bibliographie

1. Logdberg, L., M.E. Reid, and T. Zelinski, Human blood group genes 2010: chromosomal locations and cloning strategies revisited. *Transfus Med Rev.* **25**(1): p. 36-46.
2. Daniels, G., Human Blood Groups. 2nd ed. 2002, Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. 560 p.
3. Sjöberg Wester, E., Characterisation of weak and null phenotypes in the KEL and JK blood group systems. 2010, Lund: Lund University. 53 p.
4. Banks, A.A.o.B., AABB Technical Manual. 15th ed. 2005, United States: AABB. 906 p.
5. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
6. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, Basic Immunology : Functions and Disorders of the Immune System. 3rd ed. 2009, Philadelphia: Saunders Elsevier. 311 p.
7. Reid, M.E. and C. Lomas-Francis, The Blood Group Antigen FactsBook. 2nd ed. 2004, London: Academic Press.
8. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, Janeway's Immunobiology. 7th ed. 2008, New York: Garland Science. 887 p.
9. Aalberse, R.C., R. van der Gaag, and J. van Leeuwen, Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol*, 1983. **130**(2): p. 722-6.
10. Issitt, P.D. and D.J. Anstee, Applied Blood Group Serology. 4th ed. 1998, Durham: Montgomery Scientific Publications.
11. Ballas, S.K., E. Viggiano, and E.K. Draper, Survival of Kn(a+) McC(a+) red cells in a patient with anti- "Kna/McCa". *Transfusion*, 1984. **24**(1): p. 22-4.
12. Reid, M.E. and C. Lomas-Francis, Blood group antigens and antibodies: A guide to clinical relevance and technical tips. 2007, New-York: SSB Books. 214 p.
13. Aalberse, R.C. and J. Schuurman, IgG4 breaking the rules. *Immunology*, 2002. **105**(1): p. 9-19.
14. Rispens, T., T.H. den Bleker, and R.C. Aalberse, Hybrid IgG4/IgG4 Fc antibodies form upon 'Fab-arm' exchange as demonstrated by SDS-PAGE or size-exclusion chromatography. *Mol Immunol*, 2010. **47**(7-8): p. 1592-4.
15. Schuurman, J., G.J. Perdok, A.D. Gorter, and R.C. Aalberse, The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol Immunol*, 2001. **38**(1): p. 1-8.
16. Aalberse, R.C., S.O. Stapel, J. Schuurman, and T. Rispens, Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*, 2009. **39**(4): p. 469-77.
17. van der Zee, J.S., P. van Swieten, and R.C. Aalberse, Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J Immunol*, 1986. **137**(11): p. 3566-71.
18. Cosio, F.G., D.J. Birmingham, D.J. Sexton, and L.A. Hebert, Interactions between precipitating and nonprecipitating antibodies in the formation of immune complexes. *J Immunol*, 1987. **138**(8): p. 2587-92.

19. Burton, D.R. and I.A. Wilson, Immunology. Square-dancing antibodies. *Science*, 2007. **317**(5844): p. 1507-8.
20. Moulds, J.M., J.J. Moulds, M. Brown, and J.P. Atkinson, Antiglobulin testing for CR1-related (Knops/McCoy/Swain-Langley/York) blood group antigens: negative and weak reactions are caused by variable expression of CR1. *Vox Sang*, 1992. **62**(4): p. 230-5.
21. Moulds, J.M., M.W. Nickells, J.J. Moulds, M.C. Brown, and J.P. Atkinson, The C3b/C4b receptor is recognized by the Knops, McCoy, Swain-langley, and York blood group antisera. *J Exp Med*, 1991. **173**(5): p. 1159-63.
22. Vik, D.P. and W.W. Wong, Structure of the gene for the F allele of complement receptor type 1 and sequence of the coding region unique to the S allele. *J Immunol*, 1993. **151**(11): p. 6214-24.
23. Moulds, J.M., The Knops blood group system: a review. *Immunoematology*, 2010. **26**(1): p. 2-7.
24. Yazdanbakhsh, K., Review: complement receptor 1 therapeutics for prevention of immune hemolysis. *Immunoematology*, 2005. **21**(3): p. 109-18.
25. Moulds, J.M., P.A. Zimmerman, O.K. Doumbo, D.A. Diallo, J.P. Atkinson, M. Krych-Goldberg, D.E. Hourcade, and J.J. Moulds, Expansion of the Knops blood group system and subdivision of SI(a). *Transfusion*, 2002. **42**(2): p. 251-6.
26. Klickstein, L.B., W.W. Wong, J.A. Smith, J.H. Weis, J.G. Wilson, and D.T. Fearon, Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins. *J Exp Med*, 1987. **165**(4): p. 1095-112.
27. Klickstein, L.B., T.J. Bartow, V. Miletic, L.D. Rabson, J.A. Smith, and D.T. Fearon, Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. *J Exp Med*, 1988. **168**(5): p. 1699-717.
28. Hamer, I., J.P. Paccaud, D. Belin, C. Maeder, and J.L. Carpentier, Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain. *Biochem J*, 1998. **329** ( Pt 1): p. 183-90.
29. Gasque, P., Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*, 2004. **41**(11): p. 1089-98.
30. Krych-Goldberg, M., R.E. Hauhart, V.B. Subramanian, B.M. Yurcisin, 2nd, D.L. Crimmins, D.E. Hourcade, and J.P. Atkinson, Decay accelerating activity of complement receptor type 1 (CD35). Two active sites are required for dissociating C5 convertases. *J Biol Chem*, 1999. **274**(44): p. 31160-8.
31. Sadallah, S., C. Hess, M. Trendelenburg, C. Vedeler, M. Lopez-Trascasa, and J.A. Schifferli, Autoantibodies against complement receptor 1 (CD35) in SLE, liver cirrhosis and HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*, 2003. **131**(1): p. 174-81.
32. Horrocks, P., R.A. Pinches, S.J. Chakravorty, J. Papakrivos, Z. Christodoulou, S.A. Kyes, B.C. Urban, D.J. Ferguson, and C.I. Newbold, PfEMP1 expression is reduced on the surface of knobless Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 11): p. 2507-18.
33. Williams, T.N., Red blood cell defects and malaria. *Mol Biochem Parasitol*, 2006. **149**(2): p. 121-7.

34. Sinha, S., G.N. Jha, P. Anand, T. Qidwai, S.S. Pati, S. Mohanty, S.K. Mishra, P.K. Tyagi, S.K. Sharma, V. Venkatesh, and S. Habib, CR1 levels and gene polymorphisms exhibit differential association with falciparum malaria in regions of varying disease endemicity. *Hum Immunol*, 2009. **70**(4): p. 244-50.
35. Bellamy, R., D. Kwiatkowski, and A.V. Hill, Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998. **92**(3): p. 312-6.
36. Cockburn, I.A., M.J. Mackinnon, A. O'Donnell, S.J. Allen, J.M. Moulds, M. Baisor, M. Bockarie, J.C. Reeder, and J.A. Rowe, A human complement receptor 1 polymorphism that reduces Plasmodium falciparum rosetting confers protection against severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(1): p. 272-7.
37. Nagayasu, E., M. Ito, M. Akaki, Y. Nakano, M. Kimura, S. Looareesuwan, and M. Aikawa, CR1 density polymorphism on erythrocytes of falciparum malaria patients in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 2001. **64**(1-2): p. 1-5.
38. Pascual, M., M.A. Duchosal, G. Steiger, E. Giostra, A. Pechere, J.P. Paccaud, C. Danielsson, and J.A. Schifferli, Circulating soluble CR1 (CD35). Serum levels in diseases and evidence for its release by human leukocytes. *J Immunol*, 1993. **151**(3): p. 1702-11.
39. Reinagel, M.L., M. Gezen, P.J. Ferguson, S. Kuhn, E.N. Martin, and R.P. Taylor, The primate erythrocyte complement receptor (CR1) as a privileged site: binding of immunoglobulin G to erythrocyte CR1 does not target erythrocytes for phagocytosis. *Blood*, 1997. **89**(3): p. 1068-77.
40. Moulds, J.M., P.A. Zimmerman, O.K. Doumbo, L. Kassambara, I. Sagara, D.A. Diallo, J.P. Atkinson, M. Krych-Goldberg, R.E. Hauhart, D.E. Hourcade, D.T. McNamara, D.J. Birmingham, J.A. Rowe, J.J. Moulds, and L.H. Miller, Molecular identification of Knops blood group polymorphisms found in long homologous region D of complement receptor 1. *Blood*, 2001. **97**(9): p. 2879-85.
41. Veldhuisen, B., P.C. Ligthart, G. Vidarsson, I. Roels, C.C. Folman, C.E. van der Schoot, and M. de Haas, Molecular analysis of the York antigen of the Knops blood group system. *Transfusion*, 2011. **51**(4).
42. Moulds, J.M., B.J. Thomas, O. Doumbo, D.A. Diallo, K.E. Lyke, C.V. Plowe, J.A. Rowe, and D.J. Birmingham, Identification of the Kna/Knb polymorphism and a method for Knops genotyping. *Transfusion*, 2004. **44**(2): p. 164-9.
43. Zimring, J.C., L. Welniak, J.W. Semple, P.M. Ness, S.J. Slichter, and S.L. Spitalnik, Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI working group. *Transfusion*, 2011. **51**(2): p. 435-441.
44. Moulds, J.M. and K.E. Rowe, Neutralization of Knops system antibodies using soluble complement receptor 1. *Transfusion*, 1996. **36**(6): p. 517-20.
45. Race, R.R. and R. Sanger, Some very frequent antigens, in *Blood group in man*. 1975, Blackwell Scientific Publications: Oxford. p. 410-30.
46. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
47. Health, C. *ID-Microtyping Systems*. [cited Page consultée le 19 avril 2011]; Available from:

<http://www.cardinal.com/us/en/distributedproducts/ASP/SPMTS4024.sap?cat=laboratory>.

48. Pham, B.N., A. Kisserli, B. Donvito, V. Duret, B. Reveil, T. Tabary, P.Y. Le Pennec, T. Peyrard, P. Rouger, and J.H. Cohen, Analysis of complement receptor Type 1 expression on red blood cells in negative phenotypes of the Knops blood group system, according to CR1 gene allotype polymorphisms. *Transfusion*, 2010. **50**(7): p. 1435-43.
49. Cornillet, P., F. Philbert, M.D. Kazatchkine, and J.H. Cohen, Genomic determination of the CR1 (CD35) density polymorphism on erythrocytes using polymerase chain reaction amplification and HindIII restriction enzyme digestion. *J Immunol Methods*, 1991. **136**(2): p. 193-7.
50. Richard, M., J. St-Laurent, J. Perreault, A. Long, and M. St-Louis, A new SEMA7A variant found in Native Americans with alloantibody. *Vox Sang*, 2011. **100**(3): p. 322-6.

