

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour obtenir le titre de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Option Immunologie

par

Thierry DUCROT

Sujet :

Evaluation *in vitro* de l'activité biologique d'anticorps anti-Rh(D) utilisés dans la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle : application à la sélection d'anticorps monoclonaux humains en substitution des immunoglobulines polyclonales spécifiques anti-D.

Soutenue le : 05 novembre 1996

Membres du jury

Professeur	A. VERBERT	Président
Professeur	A. BLANCHER	Rapporteur
Docteur	J.L. TEILLAUD	Rapporteur
Professeur	J.P. DESSAINT	Examineur
Professeur	G. SPICK	Examineur
Docteur	D. BOUREL	Directeur de thèse

Je remercie vivement Monsieur le Dr J.J. Huart, Directeur de l'Etablissement de Transfusion Sanguine du Nord-Pas de Calais, de m'avoir accueilli au sein d'une de ses équipes de recherche et Monsieur L. Levasseur, Directeur du site LFB de Lille, d'avoir permis que ce travail soit poursuivi dans de bonnes conditions.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'appui scientifique de Monsieur le Dr D. Bourel, responsable du Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire et Moléculaire du LFB Lille, qui m'a offert l'opportunité de découvrir ce domaine de recherche passionnant que représente l'immunologie.

Je remercie Monsieur le Dr. A. Verbert, directeur du laboratoire de chimie biologique de l'UST de Lille I, de l'honneur qu'il me manifeste en acceptant de présider le jury de cette thèse.

J'exprime à Monsieur le Dr J.L. Teillaud et à Monsieur le Pr A. Blancher ma reconnaissance pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu témoigner pour ce travail en acceptant d'être rapporteur.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Pr J.P. Dessaint et à Madame le Pr G. Spick d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie chaleureusement Messieurs les Dr R. Béliard et A. Glacet pour leur aide scientifique et technique ainsi que l'ensemble du personnel du Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire et Moléculaire pour sa coopération et sa gentillesse. Je remercie plus particulièrement Madame I. Dévèque et M^{lle} S. Harbonnier pour leur aide inestimable dans la réalisation des tests biologiques et Messieurs S. Moitel et P. Klein pour leur aide dans la réalisation du travail de biologie moléculaire.

Je remercie également Madame L. Mannessier du service Immunologie Receveurs, Madame C. Sartiaux du laboratoire de Cytométrie en Flux ainsi que Monsieur J. Descamps du laboratoire de Biochimie de l'ETS du Nord-Pas de Calais pour leur participation à ce travail

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué par leur humour, leur gentillesse et leurs conseils, à rendre ce travail agréable et enrichissant....Merci.

A ma femme Bénédicte,

A mon fils Martin et à ma fille Alice,

A mes parents, frères et soeur,

A toute ma famille,

A toutes les personnes et amis,

qui m'ont transmis le savoir qui n'est pas écrit dans les livres.



TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
ABREVIATIONS et ANGLICISMES.....	11
RESUME.....	13
INTRODUCTION.....	15
1. Le système Rhésus.....	17
1.1. les différents antigènes.....	17
1.1.1. L'antigène D.....	17
1.1.2. Les antigènes C et E associés à D.....	18
1.1.3. Les antigènes c et e antithétiques de C et E.....	18
1.2. Biochimie des antigènes Rhésus.....	18
1.3. Les phénotypes Rh complets.....	19
1.4. Nombre de sites D sur la membrane du globule rouge.....	20
1.5. Variations liées au polymorphisme génétique	20
1.5.1. Antigènes D faible.....	20
1.5.2. Antigènes D partiel.....	20
2. La maladie hémolytique néo-natale par allo-immunisation foeto-maternelle aux antigènes du système Rhésus.....	21
2.1. Mécanismes physiopathologiques de la MNHH.....	21
2.1.1. Formation des anticorps chez la mère.....	21
2.1.1.1. Le passage d'hématies foetales.....	21
2.1.1.2. La réponse primaire maternelle.....	22
2.1.1.3. La réponse secondaire et le passage des anticorps à travers le placenta	23
2.1.2. Mode d'action des anticorps au cours de la MHNN	24
2.2. Aspects cliniques.....	25
2.2.1. Les accidents néo-nataux.....	25
2.2.2. Les accidents prénataux : la mort foetale.....	27
2.3. Diagnostic et orientations thérapeutiques.....	27
2.3.1. Diagnostic prénatal.....	27
2.3.1.1. La mise en évidence de l'allo-immunisation maternelle..	27
2.3.1.2. La mise en évidence de l'atteinte de l'enfant.....	28
2.3.1.3. La détermination du phénotype et du génotype probable du père (dans le cas de femmes de Rhésus négatif).....	29
2.3.2. Diagnostic à la naissance.....	29
2.3.2.1. Examen du sang du nouveau-né.....	29
2.3.2.2. Examen du sang de la mère.....	29
2.3.3. Orientations thérapeutiques.....	29
2.4. Prévention de l'allo-immunisation à l'antigène Rh(D) standard.....	30
2.4.1. Les immunoglobulines anti-D.....	30
2.4.2. Indications.....	30
2.4.2.1. Traitement <i>post-partum</i>	30
2.4.2.2. Traitement <i>post-abortionum</i>	31
2.4.2.3. Traitement <i>ante-partum</i>	31
2.4.3. Modalités.....	31
2.5. Conclusions concernant la prévention de l'immunisation anti-Rhésus...	32
3. Les Ac monoclonaux anti-D dans la prévention de la MHNN.....	33
4. Evaluation des Acm anti-D en vue d'une prévention de la MHNN.....	34
4.1. Etude <i>in vitro</i> du mécanisme d'action des Ac anti-D - état des connaissances.....	34

	<u>Pages</u>
4.2. Etude <i>in vivo</i> de l'efficacité des Acm anti-D à induire l'élimination d'hématies Rh(D) positif.....	36
4.2.1. Chez le chimpanzé.....	36
4.2.2. Chez l'homme.....	37
5. Objectifs de l'étude.....	38
MATERIELS ET MÉTHODES.....	40
A) <u>Ingénierie Cellulaire</u>	41
1. Anticorps anti-D.....	41
1.1. Sérums anti-D.....	41
1.2. Ac Polyclonaux anti-D.....	41
1.3. Ac monoclonaux anti-D.....	41
2. Culture cellulaire.....	42
2.1. Culture cellulaire en vue d'une production d'anticorps.....	42
2.1.1. Culture cellulaire en flacons.....	42
2.1.2. Culture cellulaire en suspension.....	43
2.1.3. Production d'Ac.....	43
2.2. Culture cellulaire pour une extraction d'ARN.....	43
2.3. Conservation des hybridomes.....	43
2.3.1. Congélation des hybridomes.....	43
2.3.2. Décongélation des hybridomes.....	44
2.4. Clonage par dilutions limites.....	44
3. Purification des surnageants de culture et dosage des Ac.....	44
3.1. Purification des Ac.....	44
3.2. Concentration des échantillons.....	45
3.3. Dialyse.....	45
3.4. Détermination de la concentration des échantillons.....	45
3.4.1. Mesure de DO à 280 nm.....	45
3.4.2. Dosage ELISA des IgG humaines et bovines	46
3.4.3. Dosage pondéral d'anti-D sur autoanalyseur à flux continu.....	47
3.5. Conservation des Acm.....	47
4. Analyse de la réactivité des Ac.....	47
4.1. Test de Coombs indirect.....	47
4.1.1. Lavages des hématies.....	47
4.1.2. Sensibilisation et étape d'agglutination.....	48
4.1.3. Lecture de l'agglutination.....	48
4.1.4. Détermination du titre et du score.....	48
4.2. Test d'agglutination à la papaïne.....	48
4.2.1. Sensibilisation et étape d'agglutination.....	49
4.2.2. Lecture de l'agglutination et détermination du titre et du score..	49
4.3. Test d'agglutination sur des hématies D partiel.....	49
4.4. Etude de la sensibilisation des hématies.....	49
4.4.1. Etude de la sensibilisation en Sol-ELISA.....	49
4.4.1.1. Sensibilisation des hématies.....	49
4.4.1.2. Lyse des hématies sensibilisées.....	50
4.4.1.3. Quantification des IgG par ELISA.....	50
4.4.2. Etude de la sensibilisation en microscopie à fluorescence.....	50
4.4.3. Etude de la sensibilisation en cytométrie en flux.....	51

	<u>Pages</u>
5. Analyse des propriétés fonctionnelles des Ac.....	51
5.1. Test d'adhérence sur monocytes activés.....	51
5.1.1. Préparation des cellules mononucléées sur gradient de densité..	51
5.1.2. Sensibilisation des hématies.....	51
5.1.3. Activation des monocytes.....	51
5.1.4. Test d'adhérence.....	52
5.2. Test d'ADCC et de phagocytose par coloration au DAF.....	52
5.2.1. Préparation des cellules effectrices.....	52
5.2.2. Sensibilisation des hématies.....	53
5.2.3. Test d'ADCC par coloration au DAF.....	53
5.2.4. Test de phagocytose par coloration au DAF.....	53
5.2.5. Lecture au DAF.....	54
5.3. Test d'activation du complément.....	54
5.3.1. Lots de complément et dosage.....	54
5.3.2. Obtention de la fraction C3b par la technique "Fruitstone".....	55
5.3.3. Agglutination des hématies par un anti-C3d.....	55
5.3.4. Essai d'activation du complément par les Ac.....	56

B) Ingénierie Moléculaire

1. Clonage des chaînes légères et lourdes des Ig anti-D.....	56
1.1. Souche bactérienne et culture.....	56
1.1.1. Génotype.....	56
1.1.2. Milieux et conditions de culture.....	56
1.2. Vecteur de clonage.....	57
1.3. Préparation d'oligonucléotides.....	57
1.3.1. Synthèse d'oligonucléotides.....	57
1.3.2. Dosage et pureté des oligonucléotides synthétisés.....	58
1.3.3. Amorces synthétisées.....	58
1.3.3.1. Amorces s'hybridant sur PT7T3.....	58
1.3.3.2. Amorces s'hybridant sur les chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines humaines.....	58
1.3.3.3. Amorces biotynilées.....	60
1.3.3.4. Amorces fluorescentes.....	60
1.4. Synthèse d'ADNc.....	60
1.4.1. Extraction des ARN totaux.....	60
1.4.2. Dosage et pureté des ARN.....	60
1.4.3. Synthèse du premier brin d'ADN.....	62
1.5. Technique PCR.....	62
1.6. Vérification sur gel d'agarose.....	63
1.7. Etape de ligation.....	63
1.8. Electrotransformation.....	63
1.8.1. Préparation des cellules électrocompétentes.....	63
1.8.2. Protocole d'électrotransformation.....	63
1.9. Sélection des colonies transformées.....	64
1.9.1. Sélection par coloration.....	64
1.9.2. Vérification des colonies recombinantes.....	64
1.9.3. Conservation des colonies recombinantes.....	65
2. Séquençage.....	65
2.1. Obtention de l'ADN à séquencer.....	65
2.2. Préparation d'ADN simple brin.....	65
2.2.1. Préparation à partir des produits de PCR.....	65
2.2.2. Préparation à partir des autres préparation d'ADN plasmidique.....	66
2.3. Réactions de séquençage et séquençage.....	66
2.4. Elaboration des séquences consensus par chaîne d'Ig et analyse.....	66

	<u>Pages</u>
RESULTATS	67
<u>PARTIE A</u>	
Production et dosage des anticorps monoclonaux anti-D	
1. Obtention des Acm anti-D.....	68
2. Purification des surnageants de culture.....	68
3. Dosage des Acm purifiés.....	69
<u>PARTIE B</u>	
mise au points des différents tests <i>in vitro</i>	
1. Mise au point des tests d'ADCC et de phagocytose par coloration au DAF.....	71
1.1. Sensibilité de la coloration au DAF.....	71
1.2. Etude de l'hémolyse spontanée des hématies.....	72
1.3. Préparation des cellules effectrices.....	73
1.4. Etude cinétique de la sensibilisation.....	73
1.5. Etude de la conservation des suspensions d'hématies sensibilisées à +4°C.....	74
1.6. Etude de la fixation des IgG bovines sur les hématies Rh(D) positif humaines.....	76
1.7. Mise au point du test d'ADCC par coloration au DAF.....	76
1.7.1. Concentration en cellules effectrices.....	76
1.7.2. Etude du ratio cellules mononucléées/hématies.....	77
1.7.3. Etude cinétique du test d'ADCC.....	78
1.7.4. Hétérogénéité de la réponse ADCC par rapport aux donneurs de cellules effectrices.....	79
1.7.5. Validation du test d'ADCC.....	79
1.8. Mise au point du test de phagocytose par coloration au DAF.....	82
1.8.1. Concentration en cellules effectrices.....	82
1.8.2. Elimination des hématies fixées aux cellules effectrices.....	82
1.8.3. Etude cinétique du test de phagocytose.....	83
1.8.4. Validation du test de phagocytose.....	84
1.8.5. Essai de phagocytose en milieu DMEM sans SVF.....	84
1.9. Etude de la stabilité de la solution mère de DAF en test d'ADCC.....	85
2. Quantification du nombre d'hématies par coloration au DAF.....	86
2.1. Existe-t-il une corrélation entre la quantité d'hématies et les valeurs de DO après coloration au DAF?.....	86
2.2. Etude de la stabilité de solutions standards d'hémoglobine.....	87
3. Mise au point du test SOL-ELISA.....	89
3.1. Quantification du taux d'anti-D fixés sur les globules rouges.....	89
3.2. Détermination de la concentration spécifique en Ac anti-D par Sol-ELISA.....	92
3.2.1. Obtention de la linéarité pour la gamme étalon.....	92
3.2.2. Détermination de la concentration-comparaison avec la technique autoanalyseur.....	93
4. Mise au point du test d'activation du complément par les Ac.....	94
4.1. Obtention et dosage du complément.....	94
4.2. Test de "Fruitstone".....	95
4.3. Test d'activation du complément par l'Acm anti-Jk ^b	95

PARTIE C

Etude de la réactivité des Ac polyclonaux et monoclonaux anti-D sur les hématies

1. Etude de la réactivité des Ac polyclonaux anti-D.....	96
1.1. Etude en test Sol-ELISA.....	96
1.2. Etude en cytométrie de flux.....	97
2. Etude de la réactivité des Ac monoclonaux anti-D.....	99
2.1. Détermination de la quantité d'anti-D fixés sur les globules rouges.....	99
2.1.1. Différences de fixation des Ac sur l'antigène D en fonction du donneur d'hématies.....	99
2.1.2. Comparaison des quantités d'anti-D fixés sur les globules rouges obtenues avec les Ac monoclonaux anti-D.....	99
2.2. Etude en test d'agglutination.....	102
2.2.1 Test de Coombs indirect.....	102
2.2.2. Test d'agglutination après traitement des hématies à la papaïne.	103
2.2.3. Test d'agglutination sur hématies D partiel.....	103
2.2.3.1. Résultats d'agglutination avec les hématies D partiel traitées à la papaïne.....	103
2.2.3.2. Résultats d'agglutination avec les hématies D partiel en réaction de Coombs indirect.....	104
2.2.3.3. Epitopes reconnus par les Acm anti-D.....	104

PARTIE D

Etude de l'activité fonctionnelle des Ac polyclonaux et monoclonaux anti-D

1. Activité biologique des Ac polyclonaux anti-D	106
1.1. Etude en test d'ADCC.....	106
1.1.1. Evaluation d'Ac polyclonaux et de sérums anti-D.....	106
1.1.2. Etude cinétique de l'ADCC avec les Ac polyclonaux anti-D et les sérums	108
1.1.3. Etude de la concentration de sensibilisation en test d'ADCC	109
1.2. Etude en test phagocytose.....	110
1.2.1. Evaluation d'Ac polyclonaux et de sérums anti-D.....	110
1.2.2. Etude cinétique de la phagocytose avec des polyclonaux anti-D.	112
1.2.3. Etude de la concentration de sensibilisation en test phagocytose	113
1.3. Etude de l'activation du complément par les Ac polyclonaux.....	114
1.3.1. Etude en test d'agglutination.....	114
1.3.2. Etude en cytométrie de flux.....	115
2. Evaluation des Ac monoclonaux anti-D	115
2.1. Evaluation des Acm en test d'adhérence sur monocytes activés.....	115
2.2. Evaluation des Acm anti-D en test d'ADCC.....	116
2.2.1. Etude cinétique.....	116
2.2.2. Etude de la concentration de sensibilisation des hématies Rh(D) positif en test d'ADCC.....	117
2.2.3. Comparaison des Acm en test d'ADCC sur cellules mononucléées.....	118
2.2.4. Comparaison de l'activité ADCC des Acm en fonction du pourcentage de lymphocytes.....	120
2.2.5. Comparaison des Acm AD1 et AD3 et du polyclonal anti-D P1 en test d'ADCC sur cellules U937 activées	122
2.2.6. Etude du ratio cellules mononucléées/hématies.....	123
2.2.7. Inhibition de l'ADCC en présence d'IgG humaines.....	124
2.2.8. Comparaison de l'activité ADCC de 2 lots différents des anticorps AD1 et AD3.....	126

	<u>Pages</u>
2.3. Evaluation des Acm en test de phagocytose.....	127
2.3.1. Etude de la concentration de sensibilisation des hématies Rh(D) positif en test de phagocytose.....	127
2.3.2. Comparaison des Acm en test de phagocytose sur monocytes activés.....	128
2.3.3. Etude du ratio monocytes activés/hématies.....	130
2.3.4. Inhibition de la phagocytose en présence d'IgG polyvalentes...	130
2.3.5. Comparaison de l'activité de phagocytose de 2 lots différents des Ac AD1 et AD3.....	131
2.4. Activation du complément par les Ac anti-D.....	132
2.4.1. Observation de la fixation de la fraction C3b sur les hématies en test d'agglutination.....	132
2.4.2. Observation de la fixation de la fraction C3b sur les hématies en test cytométrique.....	132

PARTIE E

Relation entre la réactivité des Ac anti-D et leur activité fonctionnelle

1. Test d'ADCC et quantification des anti-D fixés	134
1.1. Réalisation des tests aux concentrations de sensibilisation de 50 et 100 ng/ml.....	134
1.2. Réalisation des tests aux concentrations de sensibilisation de 100 et 500 ng/ml.....	136
1.3. Réalisation des tests aux concentrations de sensibilisation de 500 et 1000 ng/ml.....	137
1.4. Relation entre la quantité d'IgG fixées sur les hématies et la réponse en ADCC pour le polyclonal anti-D P1 par rapport aux Acm anti-D.....	138
2. Test de phagocytose et quantification des anti-D fixés sur les hématies.....	140

PARTIE F

Etude de différentes combinaisons de deux Acm

1. Etude en test d'ADCC.....	142
1.1. Test d'ADCC avec des cellules mononucléées comme cellules effectrices.....	142
1.1.1. Mélange de deux Acm en quantités égales.....	142
1.1.2. Mélange de deux Acm en quantités variables.....	146
1.2. Test d'ADCC avec des monocytes activés comme cellules effectrices.....	148
2. Etude en test de phagocytose.....	149
2.1. Mélange de deux Acm en quantités égales.....	149
2.2. Mélange de deux Acm en quantités variables.....	150

PARTIE G

Troisième atelier international sur les anticorps monoclonaux. Evaluation
fonctionnelle en tests d'ADCC et de phagocytose d'Acm anti-D

1. Evaluation des Ac monoclonaux anti-D en test d'ADCC.....	152
2. Evaluation des Ac monoclonaux anti-D en test de phagocytose.....	154

PARTIE H
Ingénierie Moléculaire

	<u>Pages</u>
1. Clonage des chaînes lourdes et légères des IgG anti-D.....	156
1.1. Extraction des ARN totaux.....	156
1.2. Amplification enzymatique des séquences correspondantes aux chaînes lourdes et légères des immunoglobulines.....	157
1.3. Clonage des produits amplifiés.....	159
2. Séquençage des chaînes lourdes et légères.....	159
2.1. Séquençage du transcrit lambda de AD3.....	159
2.2. Analyse des séquences des différentes chaînes d'Ac.....	160
2.2.1. Analyse de la séquence des parties variables des Ac.....	160
2.2.1.1. Analyse des familles des gènes VL.....	160
2.2.1.2. Analyse des familles des gènes VH.....	161
2.2.2. Analyse de la séquence des parties constantes des chaînes lourdes.....	163
3. Analyse des Ac recombinants en test d'ADCC et de phagocytose.....	165
DISCUSSION - CONCLUSION.....	168
1 Production, purification et dosage des anti-D.....	170
2. Mise au point des techniques.....	173
2.1. Mise au point du test d'ADCC.....	175
2.2. Mise au point du test de phagocytose.....	176
2.3. Mise au point du test de Sol-ELISA.....	178
2.4. Mise au point du test d'activation du complément.....	179
3. Etude du mécanisme d'action des anti-D.....	180
3.1. Etude de la réactivité des anti-D.....	181
3.1.1. Etude avec les Ac polyclonaux anti-D.....	181
3.1.2. Etude avec les Ac monoclonaux anti-D.....	182
3.2. Etude des propriétés fonctionnelles des anti-D.....	184
3.2.1. Etude avec les polyclonaux et les sérums anti-D.....	184
3.2.1.1. Etude en test d'ADCC.....	184
3.2.1.2. Etude en test de phagocytose.....	185
3.2.1.3. Rôle du complément.....	186
3.2.2. Etude avec les Ac monoclonaux anti-D.....	187
3.2.2.1. Formation de rosettes.....	187
3.2.2.2. Etude en test d'ADCC.....	189
3.2.2.3. Etude en test de phagocytose.....	195
3.2.2.4. Rôle du complément.....	198
3.3. Analyse de la relation entre la réactivité, l'activité fonctionnelle et la structure des anti-D.....	198
3.3.1. Etude avec les Ac polyclonaux anti-D.....	198
3.3.2. Etude avec les Ac monoclonaux anti-D.....	199
3.4. Etude de différentes combinaisons de deux Acm.....	204
4. Analyse des résultats dans le contexte de la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle.....	206
PUBLICATION ET POSTERS.....	212
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	215

**ABREVIATIONS
ET
ANGLICISMES**

- aa	Acide aminé
- Ac	Anticorps
- Acm	Anticorps monoclonal
- ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
- Ag	Antigène
- anti-D	Anticorps anti Rhésus D
- ATCC	American Type Culture Collection
- BET	Bromure d'éthidium
- BSA	Bovine Serum Albumin
- CD	Cluster of Differentiation
- Cr	Chrome
- CRTS	Centre Régional de Transfusion Sanguine
- DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
- dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
- D.O.	Densité optique
- <i>E. coli</i>	Escherichia coli
- EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique
- ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- ETS	Etablissement de Transfusion Sanguine
- FcR	Récepteur Fc des immunoglobulines
- FcγR	Récepteur Fc des immunoglobulines de classe G
- FITC	Fluorescéine Isothiocyanate
- HnS	Hématie non sensibilisée
- Ig	Immunoglobuline
- IgG	Immunoglobuline de classe G
- IgM	Immunoglobuline de classe M
- im	Intra musculaire
- iv	Intra veineux
- kDa	kiloDalton
- L.F.B.	Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies
- MHNN	Maladie Hémolytique du Nouveau-Né
- M.M.	Matériels et Méthodes
- MMA	Monocyte Monolayer Assay
- OPD	O-phénylaminodiamine
- pb	paire de base
- PBS	Phosphate Buffer Saline
- PCR	Polymerase Chain Reaction
- Poly	Polyclonal
- Rh	Rhésus
- Rh(D)	rhésus D
- tpm	tours par minute
- SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
- SVF	Sérum de Veau Foetal
- UV	Ultra Violet



RESUME

Malgré l'efficacité des Ig polyclonales spécifiques anti-Rh(D) à prévenir l'allo-immunisation foeto-maternelle, il est nécessaire de rechercher un produit de substitution en raison de nombreux problèmes liés à leur préparation. Les Ac monoclonaux anti-Rh(D) devraient pouvoir être utilisés mais actuellement la méconnaissance du mode d'action des anti-D ne permet pas de définir de façon sûre des critères de sélection. Plusieurs mécanismes faisant intervenir différentes catégories de cellules effectrices peuvent être impliqués comme, par exemple, une lyse cellulaire anticorps dépendante (ADCC), une phagocytose.

Un travail de base a donc été entrepris avec plusieurs Acm humains anti-D dans le but de définir les paramètres importants pour la sélection de tels Ac anti-D. Ainsi, différents tests *in vitro*, notamment des tests colorimétriques au diaminofluorène permettant de quantifier l'ADCC et la phagocytose induites par les Ac et un test Sol-ELISA, ont été développés afin d'élargir au maximum la gamme des critères d'étude. L'activité biologique des anticorps monoclonaux anti-D a toujours été comparée à des Ig polyclonales anti-D de référence qui sont reconnues comme efficaces dans la prévention de la MHNN. L'analyse détaillée des résultats obtenus a montré des différences d'activité fonctionnelle non seulement entre les IgG1 et les IgG3, comme cela a déjà été décrit plusieurs fois, mais aussi entre les différentes IgG1 testées. Il ressort également de ces travaux que la réactivité des anti-D vis à vis des hématies Rh positif est également un des paramètres importants à prendre en considération. Une étude comparative entre la réactivité des anti-D et leurs propriétés fonctionnelles a donc été réalisée. De plus, des essais de mélange de 2 Acm ont montré qu'il était possible d'obtenir une potentialisation de l'activité de phagocytose. Toutefois, il reste difficile de trouver des anticorps possédant simultanément les deux critères d'efficacité : réactivité et activité fonctionnelle.

Une des voies d'approche pour essayer de contourner cette limite, essentiellement due au nombre restreint d'anticorps anti-D disponibles, consiste à préparer des anti-D par recombinaison génétique. L'objectif de ces recherches est, principalement, de construire des anticorps recombinés qui présenteront une réactivité et une activité fonctionnelle optimales par association de parties variables et de parties constantes sélectionnées par avance. D'autre part, cette approche moléculaire a permis de connaître la séquence nucléotidique des Ac et donc d'aborder une étude structure-fonction.



INTRODUCTION

Chez une femme en fin de grossesse, et plus particulièrement au moment de l'accouchement, des hématies foetales peuvent passer dans la circulation maternelle et provoquer, dans certains cas, une allo-immunisation maternelle vis à vis des antigènes Rhésus, Kell, Duffy ou Kidd. En moyenne, 2 à 4% des femmes pourraient présenter une immunisation après grossesse pouvant être à l'origine d'une maladie hémolytique chez le fœtus ou le nouveau né (MHNN). Dans plus de 95% des cas où la mère est Rhésus négatif et le fœtus Rhésus positif, la MHNN résulte d'une immunisation contre l'antigène D. Une injection d'Ac polyclonaux anti-D est alors effectuée à la mère présentant ces risques en prévention d'une éventuelle immunisation.

Compte tenu des difficultés d'approvisionnement en plasmas spécifiques anti-D, quelques équipes essayent de trouver des produits de substitution. Les Ac monoclonaux sont susceptibles de remplacer les polyclonaux anti-D mais après plus de 10 ans de travaux, les résultats sont toujours peu convaincants. Les questions concernant la connaissance du mode d'action des Ac polyclonaux anti-D injectés ainsi que l'évaluation des Acm en vue d'une action prophylactique sont toujours d'actualité.

Les travaux présentés dans ce travail ont eu pour but d'essayer de mieux comprendre les mécanismes d'action des anti-D de façon à pouvoir définir des critères de sélection d'anticorps monoclonaux humains anti-D pour un usage thérapeutique. Il convient donc, en introduction, de préciser quelques notions sur le système Rhésus et notamment sur l'Ag D ainsi que les connaissances actuelles sur le mode d'action des anti-D au cours de la MHNN. Les mesures prises pour prévenir cette allo-immunisation seront énoncées mais les aspects cliniques de la MHNN ainsi que son diagnostic ne seront abordés que très brièvement. Il sera, de plus, question du mode de préparation des Ac polyclonaux anti-D ainsi que des possibilités d'évaluation des propriétés fonctionnelles des Acm anti-D en vue du remplacement des Ac polyclonaux dans la prévention de la MHNN.

1. Le système Rhésus

Les antigènes de groupes sanguins sont classés en plusieurs systèmes selon la nature des molécules membranaires exprimées à la surface des hématies. Le système Rhésus comprend 5 antigènes : D, C, c, E, e (Issitt, 1988) (Figure I.1). Ces antigènes apparaissent dès le 2^{ème} mois de la vie embryonnaire.

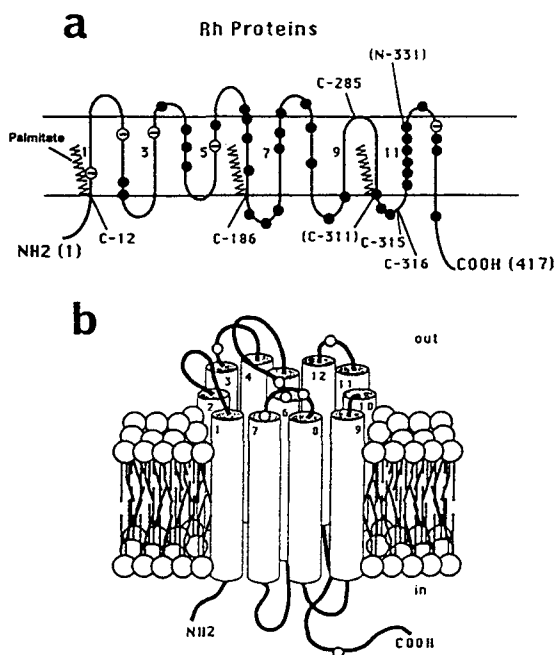


Fig 1. Topological arrangement of Rh polypeptides in the membrane. (A) The predicted topology of Rh proteins (D and CcEe) within the membrane lipid bilayer is based on hydrophathy analysis^{6,21,71} and Western blot analysis with peptide antibodies.^{7,54} Amino acid positions are numbered with respect to the initiating methionine which is removed from the mature protein. Closed symbols (●) refer to the 36 amino acid substitutions that distinguish D from CcEe proteins, including the potential N-glycosylation site (N-331) and the C-311 > Y-311 exchange within the D protein. Locations of selected amino acid positions are indicated including intracellular cysteines thought to be palmitylation sites (C-12, -186, -311, -315-6 in CcEe protein, although C-311 is replaced in the D protein, the common exofacial cysteine (C-285), and negatively charged residues located within the first, second, third, and fifth bilayer spanning domains (-) of the D and CcEe proteins. The D protein carries an additional negative charge (D-350) within the 12th membrane spanning domain. (B) Hypothetical arrangement of the hydrophobic transmembrane α -helices (cylinders) of the Rh protein within the phospholipid bilayer schematically showing the few amino acid substitutions (○) present on extracellular loops which may be involved in the D/CcEe polymorphism.

Figure I.1 : d'après Cartron, 1993.

1.1. Les différents antigènes

1.1.1. L'antigène D

L'antigène D est connu comme étant la plus immunogène de ces molécules (Salmon, 1991) même si ce phénomène n'est pas encore parfaitement compris (Agre, 1991). On dit alors, d'une personne qu'elle est Rhésus positif quand ses hématies expriment l'antigène D. A l'inverse, on dira que les personnes sont Rhésus négatif si leurs hématies ne portent pas l'antigène D (Bloy, 1988a). En effet, l'antigène antithétique de D (d) n'est pas immunologiquement détectable et n'est pas, par conséquent, exprimé chez les individus Rh négatif (Agre, 1991).

Les deux gènes D et non D (ou d) sont transmissibles selon les lois de Mendel (Tableau I.1).

Phénotypes Rhésus standard	Génotypes	Fréquence
Rh positif (ou D positif)	DD (homozygote) Dd (hétérozygote)	85%
Rh négatif (ou D négatif)	dd (homozygote)	15%

Tableau I.1 : les phénotypes Rh(D) standard avec les génotypes possibles et la fréquence dans la population blanche (Goudemand, 1980).

1.1.2. Les antigènes C et E associés à D

Au sein de la population blanche, l'antigène C est retrouvé chez 70% des personnes, tandis que l'antigène E n'est présent qu'à une fréquence de 30%. Il s'agit, néanmoins, d'antigènes associés à l'antigène D initial. En effet, les antigènes C et E ne sont pas distribués de manière équivalente chez les sujets Rh positif et Rh négatif et des associations de fréquence variable sont observées entre D, C et E (Tableau I.2). Ainsi, l'antigène C et E se rencontrent beaucoup plus fréquemment lorsque D est présent.

Haplotypes	Fréquence (%)
fréquents DCe (R ¹)	42,527
DcE (R ²)	13,043
dce (r)	39,011
rare Dce (R ⁰)	2,86
dCe (r')	1,339
dcE (r'')	0,583
très rares DCE (R ^Z)	0,373
DC ^W _e	0,264
dCE (r ^Y)	0

Tableau I.2 : fréquence des haplotypes Rhésus en France (Goudemand, 1980).

1.1.3. Les antigènes c et e antithétiques de C et E.

Toute hématie C négatif est nécessairement c positif, et toute hématie c négatif nécessairement C positif. Même chose pour les antigènes E et e.

1.2. Biochimie des antigènes Rhésus

Les antigènes Rhésus sont portés par des polypeptides membranaires hydrophobes de 28-34 kDa (Gahmberg, 1982 ; Saboori, 1988 ; Salmon, 1991 ; Cartron, 1993). Ces

polypeptides ne sont ni glycosylés (Gahmberg, 1983 ; Moore, 1987) ni phosphorylés de manière significative (Cartron, 1993), mais il a été démontré qu'ils étaient associés au squelette membranaire (Gahmberg, 1984 ; Ridgwell, 1984 ; Bloy, 1988b ; Issitt, 1988). Pour certains auteurs, les Ag D et les Ag c et E sont portés par deux polypeptides différents (Moore, 1987 ; Cartron, 1993) alors que pour d'autres les Ag Rh D, c et E sont portés par trois molécules distinctes (Bloy, 1988a).

1.3. Les phénotypes Rh complets

Les phénotypes Rh expriment en fait les antigènes produits par l'association deux par deux, sur le plan génomique, des divers haplotypes (voir tableau I.2 - Introduction 1.1.2.).

Il n'est pas possible de déterminer avec une absolue certitude le génotype Rhésus à partir du phénotype dans la mesure où il n'existe pas d'anticorps anti-d. De ce fait, pour un même phénotype donné, il peut exister plusieurs combinaisons génotypiques possibles que seule une étude familiale complète pourrait éventuellement résoudre (Tableau I.3).

Phénotypes	Génotypes probables	Fréquence en France (%)
DCcee (R ₁ r)	DcE/dce	34,39
DCCee (R ₁ R ₁)	DcE/DcE	19,94
DccEe (R ₂ r)	DcE/dce	12,24
DccEE (R ₂ R ₂)	DcE/DcE	0,95
DCcEe (R ₁ R ₂)	DcE/DcE	12,87
ddccee (rr)	dce/dce	15,4
Dccee (R ₀ r)	Dce/dce	2,32
ddCcee (r'r)	dCe/dce	0,95
ddCCee (r'r')	dCe/dCe	
ddccEe (r''r)	dcE/dce	0,42
ddccEE (r''r'')	dcE/dcE	
ddCcEe (r'r''')	dCe/dcE	0,1
DCCee (R ₁ R ₂)	DcE/DcE	0,42
DCcEE (R ₂ R _{1z})	DcE/DcE	rarissime
DCCEE (R ₂ R ₂)	DCE/DCE	"
ddCCee (r _y r')	dCE/dCe	"
ddCcEE (r _y r'')	dCE/dcE	"
ddCCEE (r _y r _y)	dCE/dCE	"

Tableau I.3 : génotype probable et fréquence dans la population française par rapport au phénotype (Goudemand, 1980 ; Salmon, 1991).

1.4. Nombre de sites D sur la membrane du globule rouge

Le nombre de sites D présents sur la membrane du globule rouge varie en fonction du phénotype (Tableau I.4).

Phénotypes	Estimation du nombre de sites (x 10 ³)
R ₁ R ₁	11,5 - 19,5
R ₁ r	10 - 15
R ₂ R ₂	16 - 33,5
R ₂ r	14 - 16,5
R ₁ R ₂	23 - 31
R ₀ r	12 - 20
rr	0

Tableau I.4 : nombre de sites D sur la membrane du globule rouge pour chaque phénotype (Salmon, 1991).

1.5. Variations liées au polymorphisme génétique

L'expression des antigènes D présente certaines variantes qui peuvent être liées soit à une faible densité antigénique, on parle alors d'antigène D faible, soit à une antigénicité différente ou partielle, on parle alors d'antigènes D partiels.

1.5.1. Antigènes D faible (Goudemand 1980 ; Salmon, 1991)

Différentes réactivités affaiblies de D sont appelées "D^U" ou "D faible". Dans cette catégorie d'hématies, il ne s'agit pas d'antigènes qualitativement différents de D, mais d'un affaiblissement de la réactivité des anticorps anti-D, c'est à dire d'un faible taux d'expression des antigènes D sur la membrane des hématies.

1.5.2. Antigènes D partiel

L'antigène D normal peut-être considéré comme une mosaïque de sous-unités toutes présentes chez les sujets Rh positif et toutes absentes chez les sujets Rh négatif. Il existe cependant quelques exceptions à cette règle chez qui il manque une ou plusieurs sous-unités Rh. On parle alors d'hématies D partiel qui peuvent être regroupées dans au moins 9 catégories différentes (Tippett, 1962 ; Lomas, 1989 ; Lomas, 1993). Les catégories IV, V et VI ne sont pas reconnues par tous les anticorps anti-D (96, 74 et 35% respectivement) (Goudemand 1980 ; Salmon, 1991). De ce fait certains globules Rh partiel (en particulier ceux de la catégorie VI) qui ne sont révélés que par certains anticorps, peuvent simuler des D faibles. L'utilisation d'un

panel d'hématies Rh(D) partiel en test d'agglutination permet de connaître plus précisément l'épitope de l'Ag D reconnu par les Ac monoclonaux anti-D selon un tableau de correspondance entre les catégories d'hématies Rh(D) partiel et les épitopes exprimés sur ces hématies (Tableau I.5).

	Catégories						
	DIII	DIVa	DIVb	DVa	DVc	DVI	DVII
epD1	+	-	-	-	-	-	+
epD2	+	-	-	+	-	-	+
epD3	+	-	-	+	-	+	+
epD4	+	+	-	+	-	+	+
epD5	+	+	+	-	+	-	+
epD6/7	+	+	+	+	+	-	+
epD8	+	+	+	+	+	-	-

Tableau I.5 : tableau de correspondance entre les 7 catégories de D partiels et les 8 épitopes de l'antigène D actuellement décrits (Lomas, 1989 ; 1993).

2. La maladie hémolytique néo-natale par allo-immunisation foeto-maternelle aux antigènes du système Rhésus

2.1. Mécanismes physiopathologiques de la MHNN

2.1.1. Formation des anticorps chez la mère

2.1.1.1. Le passage d'hématies foetales

Le passage d'hématies foetales dans la circulation sanguine maternelle est principalement dû à des hémorragies transplacentaires occasionnées essentiellement au moment de la délivrance. Mais il arrive que dans certains cas, un transfert significatif d'hématies foetales s'opère de façon spontanée durant le 3^{ème} trimestre de gestation.

Le transfert d'hématies foetales dans l'organisme maternel, après un accouchement normal, est loin d'être constant : il n'existe que dans un peu plus de 50% des cas (Goudemand, 1980 ; Salmon, 1991) et il est de faible volume, inférieur à 0,25 ml en moyenne (volume correspondant, lors du test de Kleihauer, à la présence d'une hématie foetale sur 10⁴ hématies dénombrées). Des volumes plus élevés (supérieur à 10 ml) s'observent dans moins de 1% des accouchements normaux (Goudemand, 1980 ; Salmon, 1991). Par contre, après des accouchements difficiles comportant des manoeuvres obstétricales (forceps, version, délivrance artificielle, césarienne, ...) l'hémorragie de sang foetal dans l'organisme maternel peut être plus importante (25-30 ml et plus). Les IVG peuvent induire également des transferts d'hématies, surtout après curetage.

La mise en évidence des hématies foetales dans la circulation maternelle est possible en se basant sur la présence d'hémoglobine foetale, acido-résistante. La méthode de Kleihauer consiste à dénaturer l'hémoglobine adulte, sur des frottis de sang maternel, par mise en contact avec une solution tamponnée d'acide citrique ; les hématies foetales restant intactes peuvent être facilement dénombrées après coloration au colorant May-Grünwald-Giemsa.

2.1.1.2. La réponse primaire maternelle

En principe, la mère développe un état de tolérance immunologique spécifique vis-à-vis des antigènes foetaux ce qui explique la survie du fœtus qui n'est autre qu'une greffe semi-allogénique. Elle est donc incapable de produire une réponse primaire contre les antigènes incompatibles et en particulier ceux portés par les hématies foetales. Toutefois, cet état de tolérance est rompu après l'accouchement ou après un avortement ce qui implique que les hématies foetales, étrangères à l'organisme maternel et reconnues comme telles, vont donner lieu à une réponse immunitaire faible et tardive. Les anticorps ne sont décelables dans le sérum de la mère que plusieurs semaines après la naissance du premier enfant. Il a été démontré que le risque d'immunisation est en corrélation étroite avec le nombre de globules rouges foetaux présents dans le sang de la mère (Mollison, 1968). Ces premiers anticorps, découverts quelques semaines ou quelques mois après la stimulation primaire, sont déjà des IgG, ce qui n'est pas classique pour beaucoup d'autres antigènes où il s'agit généralement d'IgM (Salmon, 1991).

La survenue de l'allo-immunisation dépend de nombreux facteurs dont beaucoup sont mal connus. L'un d'entre eux, cependant, a été bien analysé : la fréquence de l'immunisation est très significativement différente entre les femmes dont le fœtus est compatible dans le groupe ABO (10%) et celles dont le fœtus est incompatible (1%), par exemple dans le premier cas : mère O, enfant O, et dans le second cas : mère O, enfant A. Cette différence est due à la destruction des hématies ABO incompatibles par des Ac anti-A ou des Ac anti-B avant qu'elles ne puissent immuniser la mère. Il est probable que la séquestration hépatique (et non splénique) des hématies foetales ABO incompatibles liées aux IgM fixant le complément prévient toute immunisation contre des antigènes portés par les hématies foetales.

2.1.1.3. La réponse secondaire et le passage des anticorps à travers le placenta

Si, lors d'une nouvelle grossesse, le fœtus est Rhésus négatif, aucune réactivation du système immunitaire ne se produit de par l'absence de l'Ag D sur les hématies et par conséquent le taux des Ac ne varie pas (une légère augmentation paradoxale peut cependant être observée (Goudemand, 1980)). Par contre, si le fœtus est à nouveau Rhésus positif, les hématies traversant le placenta vont induire une réponse immunitaire secondaire mais cette fois plus rapide et plus massive. La mère produit des anticorps en grande quantité qui peuvent être dosés et qui se retrouveront dans la circulation sanguine du fœtus après transfert de la barrière placentaire.

Ce transfert transplacentaire des IgG n'est pas encore clairement défini bien qu'il soit possible de dire que c'est un phénomène actif (Morell, 1971 ; Contreras, 1994) dépendant de la présence de récepteurs Fc exprimés sur le versant maternel du syncytiotrophoblaste (Salmon, 1991 ; Dooren, 1993b ; Contreras, 1994). Le transfert unidirectionnel (mère --> fœtus) commence dès la sixième semaine de gestation pour augmenter exponentiellement du sixième mois jusqu'à la délivrance (Morphis, 1970). Les IgG, une fois fixées aux récepteurs Fc, entrent dans les cellules par pinocytose et sont ensuite déchargées dans la circulation sanguine fœtale (Dooren, 1993b). En règle générale, les quatre sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) peuvent traverser la barrière placentaire et sont observées dans le sérum fœtal à des concentrations identiques en IgG, au terme des 9 mois de grossesse, que dans le sérum maternel (Morell, 1971).

Cependant, il s'avère qu'au cours d'une MHNN, le rapport anti-D maternel/anti-D fœtal diminue à cause de l'augmentation du transport actif des IgG durant la gestation mais aussi de l'augmentation des anti-D libres dans le sérum fœtal due à la saturation des sites antigéniques (Economides, 1993).

Les sous-classes d'anti-D essentiellement retrouvées au cours d'une MHNN sont de type IgG1 et IgG3 avec peut-être une possibilité pour les anticorps de type IgG1 de traverser le placenta 2 mois plus tôt que les IgG3 (Parinaud, 1985).

Plusieurs équipes ont par ailleurs observé que les sérums de femmes Rh négatif alloimmunisées contenaient principalement la combinaison IgG1 et IgG3 (64%), que la

fréquence de sérums ne contenant que des IgG1 était plus faible (33%) et que très peu de sérums ne possédaient que des IgG3 (3%) (Pollock, 1990 ; Garner, 1992). D'autre part, au cours d'une grossesse dans laquelle seules les anti-D IgG1 ont été détectées, il a été possible de mettre en évidence, ultérieurement, des Ac anti-D de sous-classe IgG3 (Pollock, 1990).

Du fait de mécanismes génétiques complexes encore mal élucidés, les réponses immunitaires des femmes au cours de leur grossesse sont très variables. C'est généralement après la naissance du premier enfant Rhésus positif, à la rigueur après la deuxième, qu'apparaissent les anticorps. Par contre, si une femme Rh négatif n'a pas été immunisée après deux grossesses d'enfant Rhésus positif, il est très peu probable qu'elle le devienne ultérieurement (Goudemand, 1980 ; Salmon, 1991).

Chez les femmes qui répondent à la sollicitation antigénique, l'intensité de la réponse immunitaire est également variable. Chez certaines, celle-ci est grave d'emblée, avec des taux élevés d'anticorps aboutissant à des formes mortelles de MHNN dès les premiers enfants. Chez d'autres, au contraire, elle reste faible, leur permettant d'avoir des enfants Rhésus positif relativement peu atteints.

2.1.2. Mode d'action des anticorps au cours de la MHNN

Dans un premier temps, les anticorps d'origine maternelle se fixent sur les sites antigéniques Rh présents à la surface des hématies foetales. Cette fixation sera prouvée à la naissance par la réaction de Coombs directe, ainsi que par l'élution des anticorps à partir des hématies (Goudemand, 1980). Puis, dans un deuxième temps, une destruction de ces hématies sensibilisées va s'opérer par interaction de la partie Fc des Ac avec les récepteurs Fc des IgG (Fc γ R) exprimés par les cellules capables d'induire une phagocytose ou une lyse extracellulaire (Engelfriet, 1992 ; Contreras, 1994). Cette destruction aurait lieu au niveau du système réticulo-histiocytaire, en particulier de la rate (Jandl, 1957 ; Crome 1964 ; Woodrow, 1975 ; Ekdahl, 1989 ; Dooren, 1993a) et du foie (Goudemand, 1980). Toutefois, une détection d'IgG sur les hématies foetales, par tests de Coombs par exemple, n'est pas synonyme d'une MHNN dans la mesure où il est possible de n'avoir qu'un faible taux de sensibilisation, ou de n'avoir que des IgG de faible affinité pour les Fc γ R. De plus, une autre possibilité est que la mère

développe des Ac bloquants (Contreras, 1994). En effet, il a été décrit que, dans certains cas, une protection contre la MHNN pouvait être due à un transport placentaire imparfait (Dooren, 1993b ; Grozdea, 1995) ainsi qu'à la présence d'Ac bloquant les Fc γ R (anti-HLA-DR) inhibant la destruction des hématies sensibilisées par les anti-D (Dooren, 1993a). Par conséquent, la sévérité de la MHNN due à l'Ag D présente une grande variation puisque tous les enfants Rh(D) positif nés de mère possédant des anti-D dans leur sérum ne sont pas forcément atteints par la maladie.

Malgré de nombreux travaux de recherche, le mécanisme d'action précis des Ac anti-D n'est pas encore expliqué. Une des voies d'approche consiste à analyser les aspects cliniques de la MHNN.

2.2. Aspects cliniques

L'incompatibilité foeto-maternelle se révèle sous des aspects divers témoignant d'une atteinte plus ou moins grave de l'enfant.

2.2.1. Les accidents néo-nataux

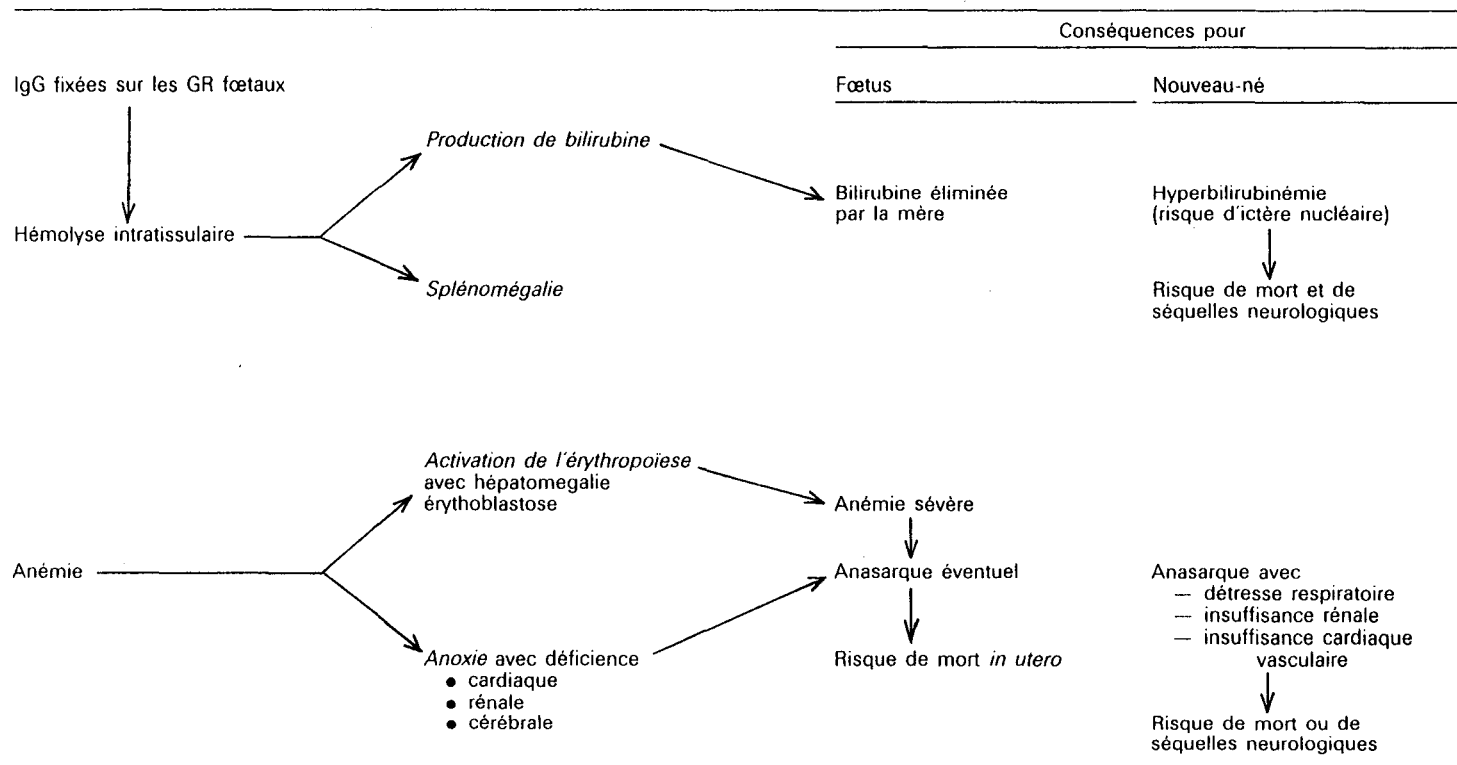
C'est après la naissance (et le plus souvent dès les premières heures) qu'il est possible d'observer les premiers signes de la MHNN. En fonction des manifestations, plusieurs formes ont été décrites (Tableau I.6) :

- une forme bénigne, caractérisée par la survenue progressive d'une anémie intense dans les premiers jours ou les premières semaines de la vie, disparaissant ultérieurement de façon spontanée,

- plus sévèrement atteints sont les enfants présentant une hyperbilirubinémie dont l'imprégnation des centres nerveux (en particulier des noyaux gris centraux) par la bilirubine libre provoque des lésions neurologiques presque toujours irréversibles conduisant, en cas de survie, à des séquelles neuropsychiques graves,

- une forme très grave de la maladie, l'anarsaque foeto-placentaire où l'enfant apparaît dès la naissance (presque toujours prématurée) infiltré d'oedème et d'une pâleur intense. La mort survient par insuffisance cardiaque, le plus souvent dans les minutes ou les heures qui suivent l'accouchement.

TABLEAU 28.V. — Principales conséquences potentielles de l'hémolyse chez le fœtus et le nouveau-né



2.2.2. Les accidents prénataux : la mort foetale

Les cas les plus sévères de MHNN induisent une profonde anémie développée *in utero* dès la 18^{ème} semaine de gestation. L'hyperhémolyse chez le fœtus peut être suffisamment grave pour induire la mort *in utero* du fœtus dans les derniers mois de la grossesse ou à l'accouchement prématuré d'un enfant mort-né en état d'anarsaque foeto-placentaire.

Toutefois la mort de l'enfant *in utero* est rare même dans les cas où l'anémie est importante. Plus généralement, le fœtus survit et au moment de la naissance se développe une hémolyse intense avec anémie et augmentation importante de la bilirubinogénèse.

2.3. Diagnostic et orientations thérapeutiques

2.3.1. Diagnostic prénatal

Un dépistage d'anticorps irréguliers est désormais obligatoire au cours de la grossesse. En fonction de l'apparition d'anticorps, un traitement préventif est alors appliqué dans les meilleures conditions de rapidité et d'efficacité.

Par ailleurs, l'atteinte de l'enfant par les Ac maternels s'aggravant progressivement au cours de la grossesse et surtout dans les dernières semaines, il est parfois indispensable de provoquer l'accouchement avant le terme et ainsi éviter l'apparition de lésions irréversibles. Ce diagnostic comporte plusieurs étapes :

2.3.1.1. La mise en évidence de l'allo-immunisation maternelle

Le dépistage systématique de l'allo-immunisation a été rendu obligatoire par un arrêté ministériel en date du 19 avril 1985 relatif à la protection maternelle et infantile qui impose :

- un phénotypage systématique ABO, Rhésus et Kell de toutes les femmes enceintes lors du premier examen prénatal (troisième mois),

- une recherche systématique de l'ensemble des Ac irréguliers chez toutes les femmes enceintes quelque soit leur groupe Rhésus. Chez la femme enceinte Rhésus négatif cette recherche s'effectue avant la fin du troisième mois, au cours du sixième mois, au cours du huitième mois et à l'accouchement ou dans les huit semaines suivantes.

La présence d'Ac irréguliers dans le sérum de la mère permet d'affirmer l'allo-immunisation. Il convient ensuite de préciser le type d'Ac agglutinants, le titre et leur spécificité. Cette recherche est réalisée par trois techniques d'agglutination : milieu salin ; technique enzymatique ; réaction de Coombs indirecte.

2.3.1.2. La mise en évidence de l'atteinte de l'enfant

La mise en évidence d'Ac anti-D chez une femme enceinte ne signifie pas que le fœtus est Rh positif dans la mesure où ces Ac peuvent provenir d'une grossesse et/ou d'une transfusion antérieures. Il faut donc pour cela prouver que l'enfant possède l'antigène D et préciser la gravité de la maladie hémolytique dont il est atteint. Il a été montré que le degré de l'anémie foetale était en fait plus en corrélation avec les concentrations d'anti-D dans le sérum maternel et le liquide amniotique qu'avec la concentration en anti-D dans le sérum foetal. En effet, les anti-D présents dans le liquide amniotique ne sont pas fixés aux hématies foetales contrairement aux anti-D du sérum foetal (Nicolaidis, 1992 ; Economides, 1993). Cette sévérité de la MHNN peut également, dans une grande majorité des cas, être prédite par l'étude de l'activité fonctionnelle des Ac anti-D, avec une indication plus fiable que celle donnée par le titre de l'Ac (Urbaniak, 1991 ; Garner, 1992 ; Dooren, 1993a ; Noble 1995). Plusieurs tests fonctionnels ont été développés : la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC) sur cellules lymphoïdes et/ou monocytes, la phagocytose et la chemiluminescence (Urbaniak, 1979a ; 1979b ; 1984 ; Hadley, 1988 ; Nance, 1989 ; Zupanska, 1989 ; Dooren, 1992 ; 1993a ; 1993b ; Garner, 1992 ; Hadley, 1992b ; 1993 ; Contreras, 1994 ; Engelfriet, 1995 ; Garner, 1995). D'autres équipes ont étudié la possible corrélation entre la sévérité de la MHNN et le type d'Ac retrouvés. Certains résultats ont ainsi montré une relation entre la gravité de la MHNN et la présence simultanée d'IgG1 et d'IgG3 (Zupanska, 1989 ; Pollock, 1990 ; Garner, 1992 ; Iyer, 1992) alors que les IgG3 seules sont le moins souvent liées avec une MHNN sévère (Zupanska, 1989 ; Pollock, 1990 ; Alie-Daran, 1992), les IgG1 étant toujours retrouvées à tous les degrés de sévérité de la maladie (Pollock, 1990). Certaines équipes ont pu mettre en évidence une corrélation entre la sévérité de la MHNN et la présence d'IgG1 de même qu'avec l'allotype de ces Ac (Parinaud, 1985 ; Alie-Daran, 1992). Parinaud *et al* (Parinaud,

1985) parlent également d'un rôle protecteur possible de l'IgG3 au niveau du transfert placentaire de l'IgG1, seulement si l'hémolyse due à l'IgG1 est modérée.

2.3.1.3. La détermination du phénotype et du génotype probable du père (dans le cas de femmes Rhésus négatif)

- Si le père est Rhésus négatif, l'enfant possèdera alors le même phénotype Rhésus négatif et sera donc indemne.

- Si le père est de Rhésus positif, il convient de déterminer son génotype probable (Tableau I.3) : s'il est homozygote probable, l'enfant sera Rhésus positif ; s'il est hétérozygote, l'enfant possède une chance sur deux d'être Rhésus négatif.

2.3.2. Diagnostic à la naissance (Goudemand, 1980)

2.3.2.1. Examen du sang du nouveau-né

Deux types d'examens sont réalisés sur le sang du nouveau-né prélevé au niveau du cordon au moment de la naissance :

- des tests hématologiques, c'est à dire le taux d'hémoglobine, le taux de bilirubine, les signes de régénération globulaire (taux de réticulocytes),

- des tests immunologiques, qui consistent à déterminer les Ag rhésus du nouveau-né (le groupage est parfois difficile du fait de la saturation des sites antigéniques D par les Ac maternels anti-D) et à effectuer une réaction de Coombs directe, ce qui permet de mettre en évidence des allo-anticorps maternels fixés sur les hématies de l'enfant.

2.3.2.2. Examen du sang de la mère

Il convient de vérifier la présence dans son sérum d'agglutinines anti-Rh(D).

2.3.3. Orientations thérapeutiques (Rock, 1981)

Les analyses biologiques décrites précédemment permettent de guider l'action thérapeutique basée sur l'exosanguino-transfusion. Celle-ci doit se faire de façon précoce afin de pouvoir stopper le processus hémolytique, d'épurer la bilirubine libre et de diminuer le

risque d'ictère nucléaire en substituant aux hématies Rh positif de l'enfant des hématies Rh négatif insensibles à l'action des Ac maternels.

2.4. Prévention de l'allo-immunisation à l'antigène Rh(D) standard

2.4.1. Les immunoglobulines anti-D

La prévention de l'allo-immunisation à l'Ag D consiste à injecter aux femmes Rhésus négatif non préalablement immunisées des Ig polyclonales anti-D après l'accouchement d'un enfant Rhésus positif. Ces Ac sont actuellement obtenus par fractionnement de Cohn de plasmas riches en anti-D et d'un traitement à la pepsine en milieu acide.

Au début de la prévention, ces plasmas provenaient des femmes immunisées par leur grossesse mais avec le succès de cette prévention, ce type de plasma *post-partum* s'est raréfié (Urbaniak, 1985). Pour pallier à ce manque, des immunisations ont été effectuées en injectant des hématies Rh(D) positif à des sujets volontaires Rh(D) négatif sains (Gibson, 1973 ; Gunson, 1974 ; Urbaniak, 1981). Cependant, les risques liés à la transmission d'agents infectieux lors des immunisations de personnes saines et le problème d'ordre éthique lié à l'immunisation de volontaires en vue d'une simple production de matériel biologique sans aucun bénéfice direct pour la personne, ont fait que les immunisations ne sont pratiquement plus réalisées. Toutefois, un texte officiel est en cours de rédaction afin de relancer les immunisations d'anti-D chez les volontaires selon un protocole très précis axé principalement sur la sécurité des hématies Rh positif.

Actuellement, la préparation des Ig spécifiques anti-D ne se fait plus, en France, que grâce à un petit nombre de donneurs immunisés qui acceptent de donner leur plasma en plasmaphérèse. La majorité des anti-D prescrits est importée des USA.

2.4.2. Indications

2.4.2.1. Traitement *post-partum*

Le traitement préventif doit être appliqué lorsque les conditions suivantes sont réunies :

- mère de groupe Rhésus négatif

- absence d'anticorps maternels anti-rhésus
- enfant de groupe Rhésus positif.

L'injection doit être faite dans les 72 heures après l'accouchement avec une prévention à renouveler à chaque grossesse ultérieure incompatible. Les doses injectées peuvent être modulées en fonction du volume d'hématies foetales détectées chez les mères (tests de Kleihauer).

2.4.2.2. Traitement *post-abortum*

L'immunisation pouvant survenir après un avortement, une fausse couche ou une mort *in utero*, la prévention est par conséquent à pratiquer chez les femmes de groupe Rhésus négatif.

2.4.2.3. Traitement *ante-partum*

Certains auteurs ont montré que l'immunisation peut, chez une femme Rhésus négatif, apparaître au cours de la première grossesse incompatible. Les anticorps sont décelés avec une fréquence de l'ordre de 1% au terme de cette première grossesse et apparaissent généralement à partir de la 28^{ème} semaine. Cette immunisation est sans grande conséquence sur l'enfant, car trop faible et trop tardive pour provoquer une hémolyse importante, mais constitue une cause d'échec à la prophylaxie faite après un accouchement. Une injection *ante-partum* permettrait de bloquer ces immunisations.

Par contre, l'injection d'Ig anti-D s'impose en cours de grossesse à la suite d'une amniocentèse, de toute autre intervention intra-utérine (cerclage, ...) ou de grossesse extra-utérine, en raison du risque élevé de passage d'hématies foetales dans la circulation maternelle.

2.4.3. Modalités

La dose à injecter par voie intraveineuse est calculée en fonction du résultat du test de Kleihauer. L'injection est généralement de 100 µg, soit 500 UI, pour un volume de sang

foetal inférieur à 5 ml (Lee, 1993). Dans les heures qui suivent l'injection, il faut impérativement vérifier que la dose injectée est suffisante en recherchant :

- la présence d'hématies foetales par le test de Kleihauer,
- la présence d'Ac anti-D résiduels.

2.5. Conclusions concernant la prévention de l'immunisation anti-Rhésus

L'administration passive d'Ig polyclonales anti-D a donc fait la preuve de son efficacité dans la prévention de l'allo-immunisation Rh(D) et par conséquent dans la prévention de la MHNN dûe à l'Ag D (Mollison, 1968 ; Bowman 1978 ; Urbaniak, 1985 ; Thomson, 1990 ; Contreras, 1994). En effet les injections d'anti-D dans les conditions précédemment citées ont permis de réduire de façon très significative le nombre des immunisations maternelles.

Certaines erreurs, d'ordre essentiellement humaines, peuvent conduire à un échec de la prévention de l'allo-immunisation Rh(D) comme par exemple ne pas injecter une dose d'anti-D suffisante ou de l'injecter trop tard. Un risque résiduel d'allo-immunisation anti-Rh(D) existe également en raison du passage d'hématies foetales pendant la grossesse (Urbaniak, 1985 ; Contreras, 1994).

D'autres problèmes liés à l'injection d'un produit préparé à partir de plasmas humains sont à l'ordre du jour avec les risques potentiels de contamination virale (Foster, 1995). Cependant, toutes les mesures nécessaires pour diminuer au maximum ce risque sont prises comme la sélection des donneurs immunisés ainsi que la validation des procédés d'inactivation virale. Le risque de transmission de l'agent responsable de la maladie de Creutzfeldt-Jakob est presque nul (Brossard, 1995 ; Combourieu, 1995).

La prophylaxie de l'immunisation Rhésus étant actuellement réalisée de façon systématique en France, un autre problème est lié à la quantité d'Ig disponibles. En effet, les besoins annuels pour la France sont estimés à environ 120 000 - 140 000 doses de 100 µg. Actuellement l'approvisionnement en plasma anti-D n'est pas suffisant et la France doit, de ce fait, importer 70% des IgG anti-D nécessaires à la prophylaxie de l'allo-immunisation à l'Ag D. Les quantités d'Ig anti-D disponibles ne permettent donc pas de prévoir une prévention en

cours de grossesse. Une telle prophylaxie nécessiterait des volumes de plasmas beaucoup plus importants. De plus, l'absence de programme pour l'obtention de plasmas riches en Ac anti-D entraîne une hétérogénéité de la qualité des plasmas anti-D.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-D devrait permettre de répondre aux différentes limites exposées ci-dessus. En effet, grâce à l'évolution des techniques du génie cellulaire, il est désormais possible de préparer des anticorps monoclonaux humains utilisables en thérapeutique.

3. Les Ac monoclonaux anti-D dans la prévention de la MHNN

Par des techniques de génie cellulaire, et notamment par la technique des hybridomes murins (Köhler, 1975), il est possible d'obtenir un hybridome, en fusionnant des cellules de myélome avec des cellules lymphoïdes, capable de se diviser et de produire un Ac. La capacité de prolifération des hybridomes permet de les cloner et par conséquent de les sélectionner en fonction de la spécificité des Ac sécrétés. Un hybridome cloné produit alors une quantité d'Ac tous identiques appelés Ac monoclonaux. De plus, la grande majorité des Ac monoclonaux murins peut être produite en grande quantité et de façon stable.

Pour deux raisons principales, cette technologie des hybridomes murins n'a pu être utilisée pour préparer des Ac monoclonaux anti-D. La première est liée à la non immunogénicité de l'Ag D chez les souris. En effet, il n'a jamais été possible d'obtenir des Ac monoclonaux murins anti-D alors que des Ac anti-e ont été produits. La deuxième raison est due à l'origine murine des anticorps. En effet, l'injection à l'homme de protéines hétérologues entraîne une réponse immune humaine contre cette protéine (Kozbor, 1983 ; Winter, 1991 ; Parren, 1992). D'autre part, l'activité fonctionnelle des anticorps murins est différente de celle des Ac humains essentiellement à cause de différences dans la reconnaissance des récepteurs Fc.

Pour contourner ces problèmes, des techniques ont été développées pour préparer des Ac monoclonaux d'origine humaine :

- la fusion des lymphocytes B humains avec des cellules myélomateuses humaines ou murines ;

- l'immortalisation des lymphocytes B humains par le virus Epstein Barr (EBV) (Steinitz, 1977);

- l'immortalisation par EBV suivie d'une fusion cellulaire.

La mise en oeuvre de ces techniques est plus délicate que dans le cas des hybridomes murins. En effet la technique des hybrides homme-homme n'a pas réellement fait la preuve de son efficacité (Salmon, 1991). Avec les hétérohybrides homme-souris, il a été constaté une perte préférentielle des chromosomes humains, conduisant ainsi à une instabilité de production des cellules (Steinitz, 1977 ; Kozbor, 1983 ; Winter, 1991 ; Parren, 1992). L'immortalisation de cellules humaines par le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Goossens, 1987 ; Winter, 1991 ; Parren, 1992) a donné de bons résultats bien que certains problèmes de croissance cellulaire, de clonage et d'instabilité de production ont été décrits (Melamed, 1985 ; Mc Donald, 1987 ; Mc Cann, 1988 ; Winter, 1991 ; Prince, 1994). Cependant par cette technique, certains clones ont été maintenus en culture et des productions stables ont été obtenues pendant plusieurs années (Koskimies, 1980 ; Goossens, 1987 ; Hadley, 1989b). Pour tenter de stabiliser les clones EBV producteurs, il est possible de les fusionner soit avec une cellule myélomateuse de souris (Goossens, 1987 ; Mc Donald, 1987 ; Melamed, 1987), soit avec une cellule myélomateuse humaine (Goossens, 1987 ; Mc Donald, 1987), soit avec un hétéromyélome homme-souris (Salmon, 1991).

Plusieurs laboratoires ont obtenu des clones producteurs d'Acm anti-D à partir de lymphocytes B prélevés chez des donneurs sains immunisés contre l'Ag D, soit par immortalisation EBV (Koskimies, 1980 ; Paire, 1986 ; Goossens, 1987 ; Kumpel, 1989) soit par immortalisation EBV suivie d'une fusion (Bron, 1984 ; Melamed, 1985 ; 1987 ; Goossens, 1987).

4. Evaluation des Acm anti-D en vue d'une prévention de la MHNN

4.1. Etude du mécanisme d'action des Ac anti-D - état des connaissances

Le mode d'action des Ac polyclonaux anti-D au cours d'une prévention de la MHNN n'est pas encore clairement défini (Woodrow, 1975 ; McCann, 1988 ; Kumpel,

1990a ; Contreras, 1994 ; Kumpel, 1995a) et différents mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode d'action de ces Ac.

La reconnaissance des hématies foetales par les Ac et, de ce fait, la fixation des anti-D sur les sites antigéniques D semblent être un fait établi. Toutefois, la simple fixation des Ac anti-D sur le globule rouge ne serait être suffisante pour éviter l'allo-immunisation. En effet, il a été montré qu'avec une dose d'Ac capable de prévenir l'immunisation, tous les sites antigéniques D exprimés sur les hématies n'étaient pas masqués (Bowman, 1988).

L'immuno-suppression semblerait par contre être le fait d'une élimination des hématies foetales, induisant ainsi une absence de la reconnaissance de l'Ag D par les cellules immunocompétentes. Le mécanisme de cette élimination reste encore à définir mais plusieurs observations ont été faites. Il a été montré que des hématies sensibilisées *in vitro* par des Ac polyclonaux anti-D et réinjectées *in vivo* étaient parfaitement éliminées (Jandl, 1957), alors que la réinjection d'hématies sensibilisées avec des fragments F(ab')₂ d'Ac anti-D n'avait pas permis leur élimination (Sinclair 1969 ; Borne, 1977). De plus, une absence de réponse immunitaire à l'Ag D a pu être obtenue par élimination des hématies par un Ac polyclonal anti-Kell (Woodrow, 1975) ce qui montre le rôle essentiel de la partie Fc des Ac (Borne, 1977 ; Meulen, 1978 ; Kumpel, 1990a ; Engelfriet, 1992) dans les mécanismes de l'immuno-suppression (Woodrow, 1975 ; McCann, 1988 ; Gorick, 1991). L'élimination des hématies ne serait donc pas forcément spécifique à l'Ag D (Heyman, 1990) et s'effectuerait par séquestration des hématies sensibilisées principalement dans la rate (Hughes-Jones, 1957 ; Jandl, 1957 ; Bowman, 1988 ; Ekdahl, 1989 ; Halma, 1992).

La destruction des hématies foetales serait effectuée par des mécanismes de lyse extra et/ou intra-cellulaire (Engelfriet, 1992) induits par les macrophages maternels (Bowman, 1988 ; McCann, 1988).

Toutefois, les mécanismes de l'immuno-suppression semblent être plus complexes. En effet, en 1971, Jouvenceaux *et al.* (Jouvenceaux, 1971) montraient qu'une dose d'Ac polyclonal anti-D suffisante pour éliminer en 72 heures des hématies Rh(D) positif ne prévenait pas forcément l'immunisation. Mollison (Mollison, 1968) avait par ailleurs précisé qu'une

administration passive d'Ig supprimait l'immunisation primaire plus par fixation des Ac sur l'Ag que par destruction de celui-ci.

Un autre mécanisme proposé était le résultat d'une suppression de l'activité des lymphocytes B possédant à leur surface des récepteurs à l'antigène (BcR) capables de fixer l'Ag D (Gorick, 1991). Cette suppression serait réalisée par un mécanisme de "cross-linking" entre les BcR et les FcR des lymphocytes B quand il y a contact avec un anti-D fixé sur une hématie. Ce "cross-linking" délivrerait un signal négatif au lymphocyte empêchant ainsi sa stimulation (Heyman, 1990 ; Daëron, 1995).

Des observations réalisées chez des malades atteints de PTI (purpura thrombopénique immun) ont montré qu'il n'y avait, même si le contexte est différent, qu'une très faible hémolyse après injection d'Ac polyclonal anti-D chez des sujets Rh(D) positifs (Salama, 1986 ; Boughton, 1988 ; Bussel, 1991).

En conclusion, il semblerait, comme le souligne Contreras *et al* (Contreras, 1994), que, même si l'élimination des hématies Rh(D) positif n'est pas la cause directe de l'immunosuppression, une corrélation peut quand même être clairement établie entre ces deux phénomènes.

4.2. Etude de l'efficacité des Acm anti-D à induire *in vivo* l'élimination d'hématies Rh(D) positif

Des essais *in vivo* en vue d'étudier l'élimination d'hématies D positif sensibilisées par des Acm anti-D ont été réalisés chez le chimpanzé et l'homme.

4.2.1. Chez le chimpanzé

Une étude chez des chimpanzés R^c négatif (Blancher, 1992) a été effectuée par Blancher *et al.* (Blancher, 1993) en vue d'étudier l'élimination d'hématies humaines R₁r injectées au jour J₀, par des Acm anti-D (de classes IgG1 et IgG3) administrés à J₀ + 1. Cette étude a permis de montrer que ces deux Acm accélèrent la disparition des hématies humaines de la circulation du chimpanzé et qu'une plus grande efficacité avec l'Acm de classe IgG1 avait été observée par rapport à l'IgG3. Il en a été conclu que les Acm anti-D possédaient un réel effet sur la clairance des hématies Rh(D) positif *in vivo* chez le chimpanzé malgré la présence

d'autoanticorps ou d'allo-anticorps sériques reconnaissant les hématies Rh(D) positif humaines.

4.2.2. Chez l'homme

Un essai clinique a été réalisé en 1990 en injectant une IgG1 anti-D de l'INTS (H2D5D2 - Goossens, 1987) à des sujets volontaires Rh(D) négatif qui avaient reçu au préalable des hématies Rh(D) positif. L'essai a montré l'absence d'efficacité de cet Ac à éliminer les hématies Rh(D) positif (Bourel - Communication personnelle).

Un autre essai réalisé par Thomson *et al.*, a permis d'étudier chez des sujets volontaires Rh(D) positif l'élimination d'hématies Rh(D) positif sensibilisées *in vitro* avec les Acm anti-D BRAD-3 de sous-classes IgG3 et FOG-1 de sous-classe IgG1 (Thomson, 1990). Cette étude a permis de montrer une élimination de ces hématies Rh(D) positif sensibilisées. Une plus grande efficacité de l'Ac de classe IgG3 a été observée par rapport à l'IgG1 tant au niveau de la rapidité de l'élimination des hématies sensibilisées que de la quantité d'Ac nécessaire pour induire une même élimination. Ces observations sont à rapprocher des résultats *in vitro* obtenus par Wiener *et al.* (Wiener, 1988) qui indiquent une meilleure activité cytolytique de l'IgG3 par rapport à l'IgG1.

L'Acm BRAD-3 a de nouveau été testé *in vivo* ainsi que l'IgG1 BRAD-5 (Kumpel, 1995a). Les Acm ont été injectés à des volontaires Rh(D) négatif par voie intra-musculaire suivie d'une injection, 48 heures après, d'hématies D positif. Les résultats de cet essai ont permis de montrer une efficacité des deux Acm à induire l'élimination des hématies avec toutefois une activité plus rapide de l'IgG1 par rapport à l'IgG3 mais similaire à l'action du polyclonal utilisé (Kumpel, 1995a). Des injections d'hématies Rh(D) positif ont été réalisées 6 et 9 mois après l'essai pour étudier la susceptibilité des personnes à s'immuniser contre l'Ag D. Ce travail a permis de montrer que ces deux Acm étaient capables de prévenir une immunisation à l'Ag D et par conséquent d'être efficace pour la prophylaxie contre la MHNN (Kumpel, 1995a).

5. Objectifs de l'étude

Les premiers essais cliniques ont montré que certains Ac monoclonaux pouvaient induire *in vivo* une clairance d'hématies Rh(D) positif (Thomson, 1990 ; Kumpel, 1995a). Bien que très prometteurs, ces résultats n'ont pas encore permis d'obtenir un produit susceptible de se substituer aux Ig polyclonales anti-D. De plus, la sélection d'Ac monoclonaux demeure relativement empirique comme en témoignent les critères d'évaluation qui diffèrent d'une équipe à une autre.

Il est donc difficile actuellement d'avoir une idée précise des critères à prendre en considération pour dire qu'un anticorps est meilleur qu'un autre.

Partant de ces constatations, un travail de base a été entrepris avec plusieurs Acm humains anti-D dans le but de définir les paramètres importants à étudier pour sélectionner des Ac anti-D en vue de la réalisation d'essais cliniques. Ainsi, différents tests *in vitro* ont été développés afin d'élargir au maximum la gamme des critères d'étude. Les anticorps monoclonaux anti-D ont ensuite été comparés à des Ig polyclonales anti-D de référence qui sont reconnues comme efficaces dans la prévention de la MHNN. L'analyse détaillée des résultats obtenus montrera des différences d'activité fonctionnelle non seulement entre les IgG1 et les IgG3, comme cela a déjà été décrit plusieurs fois, mais aussi entre les différentes IgG1 testées. Il ressort également de ces travaux que la réactivité des anti-D vis à vis des hématies Rh positif est également un des paramètres importants à prendre en considération.

Toutefois, il est difficile de trouver des anticorps possédant simultanément les deux critères d'efficacité : réactivité et activité fonctionnelle. Des mélanges d'Ac ont ainsi été réalisés pour tenter d'associer plusieurs activités biologiques. Une autre voie d'approche pour essayer de contourner cette limite, essentiellement due au nombre restreint d'anticorps anti-D disponibles, consiste à préparer des anti-D par recombinaison génétique. Seules les premières étapes de la préparation d'anticorps recombinants seront présentées, le reste du travail étant actuellement bien maîtrisé au laboratoire d'ingénierie cellulaire et moléculaire. L'objectif de ces recherches est de construire des anticorps recombinés qui présenteront une réactivité et une activité fonctionnelle optimales par association de parties variables et de parties constantes sélectionnées par avance.

Enfin, les différents résultats obtenus au cours de ce travail seront commentés par rapport aux travaux déjà publiés sur le sujet. De plus, une analyse critique des principales données acquises sera réalisée avec comme objectif de réorienter et de poursuivre les recherches sur le mécanisme d'action des anti-D.

MATERIELS ET METHODES

A- INGENIERIE CELLULAIRE

1. Anticorps anti-D

1.1. Sérums anti-D

Des sérums de sujets hyperimmunisés en anti-D (possédant un taux d'anti-D supérieur à 100 µg/ml) ont été sélectionnés par le Laboratoire de Contrôle des Groupes Sanguins du CRTS Lille. Cinq sérums ont été recueillis : S1, S2, S3 correspondant à un même donneur prélevé respectivement à t_0 , $t_0 + 15$ jours, $t_0 + 2$ mois et S4 et S5 correspondant à des donneurs différents. Les dosages en Ig spécifiques anti-D ont été réalisés selon la technique autoanalyseur (M.M. A-3.4.3.).

1.2. Ac Polyclonaux anti-D

Plusieurs Ig polyclonales anti-D ont également été utilisées : P1 = "Ig spécifiques anti-D" produit au LFB Lille et réservé à l'usage de laboratoire (Lot n° 54050051) ; P2 = HypRho-D (Cutter - Lot n° 0290491) ; P3 = Rhesogam S (Behring - Lot n° 022021) ; P4 = Rhesonativ 300 (Kabi - Lot n° 64001A51) ; P5 = Partobulin s (Immuno Ag - Lot n° 18139011F/02) ; P6 = "Ig humaines spécifiques anti-D (Rho)" (Biotransfusion - Lot n° 54000011). Les dosages en Ig anti-D spécifiques ont été réalisés selon la technique autoanalyseur (M.M. A-3.4.3.).

1.3. Ac monoclonaux anti-D

Les Ac utilisés dans les différents travaux ont été produits à partir d'hybridomes déjà établis au laboratoire par fusion de lymphocytes humains provenant de donneurs Rhésus négatif immunisés par des hématies RhD positif avec soit la lignée de cellules myélomateuses murines P3X63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) soit un hétérohybridome homme x souris SHM D33 (ATCC CRL 1668).

Les lymphocytes fusionnés avec P3X63Ag8.653 ont donné les hybridomes :

- P3X229 14 (IgG3) : donneur A
- P3X229 24 (IgG3) : donneur A
- P3X83 (IgG1) : donneur B
- P3X212 (IgG1) : donneur C
- P3X35 (IgG1) : donneur C

Les lymphocytes fusionnés avec SHM D33 ont donné les hybridomes :

- 190/31 (IgG1) : donneur D
- HM16 (IgG1) : donneur E

Plusieurs lots d'Acm anti-D purifiés avaient déjà été produits au laboratoire, purifiés et conditionnés en tampon phosphate contenant 1% d'albumine humaine :

<u>Hybridomes</u>	<u>Dénomination des lots</u>
P3X229 14	C79 et AD3
190/31	C77 etAD1

2. Culture cellulaire

Des cultures cellulaires ont également été effectuées à partir des différents hybridomes pour d'une part assurer une production d'Acm anti-D en vue de connaître leurs caractéristiques sérologiques et fonctionnelles (M.M. A-2.1.) et d'autre part pour récupérer les cellules produisant ces Acm afin d'en extraire l'ARN pour la préparation d'anticorps recombinants (M.M. B-1.4.).

2.1. Culture cellulaire en vue d'une production d'anticorps

2.1.1. Culture cellulaire en flacons

Après décongélation (M.M. A-2.3.2.) et clonage (M.M. A-2.4.) des différents hybridomes producteurs d'anti-D (P3X83 ; P3X212 ; P3X35 ; HM16), les cultures ont été effectuées successivement en plaque de 96 et de 24 puits, puis en flacon de 25, 80 et 175 cm² en milieu DMEM (Dulbecco), additionné de SVF (Hyclone) (tableau M.1). Les cultures ont été placées en incubateur à 37°C et à 5% de CO₂.

Le dénombrement cellulaire a été effectué par la technique classique de la coloration au bleu trypan et du comptage sur cellule de Mallassez.

Acm	SVF (en %)
HM16	10
P3X83	10
P3X212	10
P3X35	1

Tableau M.1 : pourcentage de SVF additionné au milieu de culture.

2.1.2. Culture cellulaire en suspension

Des cultures en suspension d'un litre (spinner) ont été effectuées à partir d'inoculation par flacons de 175 ml.

De plus, une culture en cytotuteur de 2 litres puis de 10 litres a été réalisée pour l'hybridome P3X212 à partir d'une inoculation par spinner.

2.1.3. Production d'Ac

A partir d'une certaine concentration cellulaire, les cultures ont été ensuite laissées quelques jours sans renouvellement de milieu afin de permettre une excrétion d'Ac plus abondante. Le surnageant de culture est enfin récupéré par centrifugation à 1700 tpm pendant 10 min et congelé à -80°C sans conservateur.

2.2. Culture cellulaire pour une extraction d'ARN

Les 4 hybridomes décrits précédemment ainsi que les hybridomes P3X229 14 et P3X229 24 ont été cultivés dans les mêmes conditions. La récupération des cellules a été par contre effectuée en phase de croissance, puis après deux lavages en PBS, des échantillons de 10^7 cellules en culot ont été congelés à -80°C.

2.3. Conservation des hybridomes

2.3.1. Congélation des hybridomes

La conservation des hybridomes a été réalisée par congélation en azote liquide. Pour cela, les cellules ont été récupérées par centrifugation à 1700 tpm pendant 5 minutes puis ont été remises en suspension à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml en SVF avec 10% de

DMSO. Les cryotubes ont été ensuite placés durant 16 à 24 heures à -80°C dans une boîte de congélation contenant de l'alcool isopropylique, puis stockés dans l'azote liquide.

2.3.2. Décongélation des hybridomes

Après avoir sorti les cryotubes de l'azote liquide, le contenu des tubes a été rapidement décongelé par aspiration/refoulement de 7 ml de milieu DMEM + 10% de SVF. Après centrifugation à 1700 rpm pendant 5 min, le culot a été repris par 10 ml de milieu DMEM + 10% de SVF. Les cellules décongelées ont été ensuite réparties en plaque de 96 puits et la présence d'anti-D dans les surnageants de culture a été évaluée en test d'agglutination en papaine (M.M. A-4.2.).

2.4. Clonage par dilutions limites

Le clonage a été effectué par la technique des dilutions limites afin d'obtenir statistiquement de 0,2 à 1 cellule/puits dans les plaques 96 puits. Pour cela, 400 cellules en suspension cellulaire dans 4,5 ml de milieu de culture ont été réparties dans les trois premières rangées d'une plaque 96 puits à raison d'une goutte par puits. Ensuite, 4 ml de milieu de culture ont été additionnés à la suspension cellulaire et répartis de la même façon dans les trois rangées suivantes de la plaque 96. Enfin, 1 ml de milieu de culture est rajouté et distribué dans les deux dernières rangées.

Les nouveaux clones ont également été testés avec la technique d'agglutination en papaine (M.M. A-4.2.) et ceux retenus ont été mis en culture en flacons de 25, 80 puis 175 cm^2 pour congélation et culture cellulaire.

3. Purification des surnageants de culture et dosage des Ac

3.1. Purification des Ac

Pour éviter toutes interférences possibles avec les différents composants du milieu de culture (notamment le SVF), les Acm ont été purifiés sur une colonne de protéine A (Affi-Prep Gibco BRL Lot 43876A) montée sur un appareil BioRad Econo System. La protéine A possède la propriété de fixer les IgG avec une capacité de 3 à 6 mg d'Ac par ml de gel. Le

lavage de la colonne avant utilisation a été réalisé par un passage, équivalent à 2 volumes de gel, d'un tampon citrate tri-sodique 0,1 M pH 2,8 puis la colonne a été équilibrée en tampon glycine 1 M, NaCl 1 M pH8.

Après décongélation des surnageants de culture et dilution au 1/2 dans le tampon d'équilibration, ceux-ci ont été passés sur la colonne à un débit de 2 ml/min. La fraction retenue par la protéine A (c'est à dire les Ac) a été éluée en tampon citrate tri-sodique 0,1 M pH 4,0, puis en tampon citrate tri-sodique 0,1 M pH 2,8 afin de tout éluer. L'éluat a été ensuite tamponné à un pH 7 par du Tris 1M pH 9.

Le nettoyage de la colonne a été réalisé par des passages successifs de PBS tween 20 à 6% ; de PBS ; de tris 0,1 M pH 8,5, NaCl 0,5 M ; d'acétate de sodium 0,112 M pH 4,5, NaCl 0,1 M ; de PBS azide 0,1% ; d'éthanol 20%. Enfin, la conservation de la colonne a été réalisée en PBS azide 0,1% à 4°C.

3.2. Concentration des échantillons

La concentration des échantillons a été réalisée par ultrafiltration en cellule Amicon 8050 sur membrane 50 kDa (XM50 43 mm Diaflo - Amicon) jusqu'à des volumes évitant la précipitation des Ac. Pour chaque Ac, une membrane différente a été utilisée afin d'éviter les éventuelles contaminations entre les échantillons.

3.3. Dialyse

Pour homogénéiser les tampons contenant les Ac, des dialyses ont été effectuées en boudins de dialyse MW 12-14 000, diamètre 6,4 mm (Spectra/por) sous agitation à 4°C contre du PBS dans les proportions de 1 volume d'échantillon pour 100 volumes de PBS.

3.4. Détermination de la concentration des échantillons

Le dosage des Ac purifiés a été réalisé par trois techniques différentes.

3.4.1. Mesure de DO à 280 nm

Le dosage des Ig par mesure de l'absorbance à 280 nm repose sur la loi de Beer-Lambert : $Abs = e(c)L$ avec "Abs" pour absorbance, "e" pour coefficient d'absorption

molaire, "c" pour la concentration en protéines (exprimée en mol/l), "L" pour la longueur du champ optique (exprimée en cm). Dans les conditions utilisées, le coefficient d'absorption molaire pour une IgG à 1 mg/ml est de 1,4 à 280 nm.

3.4.2 Dosage ELISA des IgG humaines et bovines

Des dosages d'IgG humaines par la technique ELISA ont été effectués sur des surnageants de culture ainsi que sur des Ac purifiés.

Pour cela, une anti-IgG humaine (Calbiochem) a été fixée sur une plaque ELISA (Nunc-Immuno module) à raison d'1 µg/puits dans un tampon carbonate 0,05 M, bicarbonate 0,05 M (8ml pour 2ml pH 9,4). Après une incubation d'une heure à température ambiante et d'une nuit à 4°C, les sites libres ont été saturés par 100 µl de BSA 3% en PBS pendant 1 heure à température ambiante. Cent µl d'échantillon par puits ont ensuite été déposés (avec une éventuelle dilution dans du PBS tween à 0,05%) et laissés incuber à température ambiante pendant 90 minutes. Cent µl d'un anti-IgG humain couplé à la peroxydase (Diagnostics Pasteur) ont ensuite été ajoutés à une dilution de 1/5 000 dans du PBS tween 0,05% pendant 45 minutes. La réaction a été révélée par 100 µl/puits de substrat chromogénique (orthophénylènediamine : OPD) à 0,5 mg/ml en tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,5 + 4 µl d'H₂O₂ jusqu'à l'obtention d'une coloration. Puis la réaction enzymatique a été arrêtée avec 100 µl d'HCl 1 N et la lecture a été effectuée à 492 nm sur un lecteur de plaque ELISA (Spectra - SLT).

Entre chaque étape, sauf pour la dernière, 3 lavages ont été effectués avec de l'eau physiologique 0,05% Tween 20 par un laveur automatique (Dynatech MRW).

Des standards de type monoclonal (IgG1 : AD1) et de type polyclonal (Poly-G : IgG humaines polyclonales) ont été utilisés pour la détermination de la quantité d'Ig.

Des dosages d'IgG bovines par la technique ELISA ont également été effectués. Le protocole est le même que le précédent avec comme différences une fixation d'anti-IgG bovines spécifiques (produites au laboratoire) sur une plaque ELISA et une saturation avec du tween 20 à 1% en PBS. La révélation des IgG bovines fixées est effectuée avec un anti-IgG bovine

biotinylé (Sigma) et une streptavidine peroxidase (Pierce). Le standard utilisé est composé d'IgG bovines purifiés à partir du SVF.

Une validation de ces tests avait été réalisée par le laboratoire

3.4.3. Dosage pondéral d'anti-D sur autoanalyseur à flux continu (Gunson, 1972)

L'estimation de la concentration des anti-D par autoanalyseur a été réalisée par le Laboratoire de Contrôle des Groupes Sanguins du CRTS de Lille. Brièvement, la technique consiste à injecter des Ac anti-D dans un flux continu de liquide dans lequel des hématies circulent. Comme le liquide utilisé contient une enzyme protéolytique (bromeline) et différents réactifs facilitant l'agglutination, les hématies vont alors être sensibilisées et s'agglutiner plus ou moins fortement selon la concentration de l'Ac. Les agglutinats sont ensuite éliminés par décantation et la suspension d'hématies restantes subit une hémolyse dont l'intensité est mesurée par un photomètre donnant donc un résultat indirect de la concentration des échantillons en Ac anti-D par comparaison à un standard.

3.5. Conservation des Acm

Pour une meilleure conservation, les Acm purifiés ont été congelés à -20°C et répartis en petite quantité afin d'éviter les décongélations et congélations successives.

4. Analyse de la réactivité des Ac

4.1. Test de Coombs indirect

Le test de coombs permet la détection d'Ac non-agglutinants grâce à l'action d'Ac anti-Ig qui provoquent l'agglutination.

4.1.1. Lavages des hématies

Le lavage des hématies a été généralement effectué en NaCl 0,9% et par centrifugation à 2 000 tpm. Ces opérations ont été répétées trois fois avec une dernière centrifugation de 3000 tpm pendant 5 minutes pour l'obtention d'un culot d'hématies.

4.1.2. Sensibilisation et étape d'agglutination

Cent µl d'une suspension à 3% en NaCl 0,9% d'hématies lavées ont été incubés avec 200 µl d'Ac dilué dans du PBS, BSA 1% pendant 45 minutes à 37°C. Après 3 lavages en NaCl 0,9%, 100 µl d'antiglobulines humaines (Diagast-Laboratoires) ont été ajoutés au culot cellulaire, puis centrifugés à 1 000 tpm.

4.1.3. Lecture de l'agglutination

Après centrifugation, la lecture a été effectuée par agitation et les résultats ont été codifiés selon les critères suivants :

- 1 seule pastille avec surnageant clair :	+++
- 1 pastille + quelques petits amas :	++'
- quelques gros amas globulaires avec surnageant clair :	++
- petits amas globulaires avec surnageant clair :	+'
- petits amas globulaires avec surnageant rose :	+
- quelques petits amas globulaires avec surnageant rose :	+/-
- aucun amas visible :	-

4.1.4. Détermination du titre et du score

Le titre correspond à l'inverse de la dernière dilution correspondant au résultat d'agglutination +/- et le score se calcule de la façon suivante :

+++ = 10 points ; ++' et ++ = 8 points ; +' et + = 5 points ; +/- = 2 points ; - = 0 point

4.2. **Test d'agglutination à la papaïne**

Le principe de l'agglutination est le même qu'avec le test de Coombs indirect avec, en plus, un traitement des hématies à la papaïne. Ce traitement enzymatique enlève de larges fractions glycoprotéiques à la surface des membranes entraînant ainsi une diminution de la densité des charges à la surface du globule rouge et en même temps une meilleure accessibilité de certains épitopes aux Ac.

4.2.1. Sensibilisation et étape d'agglutination

Un volume de culot globulaire lavé a été au préalable incubé avec un volume de papaïne reconstituée pendant 7 minutes à 37°C. Les étapes de sensibilisation et d'agglutination ont été réalisées comme précédemment décrits (M.M. A-4.1.2.).

4.2.2. Lecture de l'agglutination et détermination du titre et du score

La lecture et la détermination du score ont été évaluées comme précédemment décrit (M.M. A-4.1.3. et A-4.1.4.).

4.3. Test d'agglutination sur hématies D partiel

Il a été possible de connaître plus précisément la spécificité des différents Acm par des tests d'agglutination sur un panel d'hématies D partiel. La réactivité des Acm a été testée selon les protocoles décrits pour les tests de coombs et à la papaïne excepté que les hématies utilisées appartiennent à des catégories bien précises (Introduction 1.5.2.). Les tests d'agglutination ont été effectués au Laboratoire d'Immunologie Erythrocytaire du CRTS de Lille. La réactivité des Ac a été transcrite selon le barème suivant :

- +++ : réaction positive
- + : réaction faiblement positive
- : réaction négative

4.4. Etude de la sensibilisation des hématies

4.4.1. Etude de la sensibilisation en Sol-ELISA

La technique de Sol-ELISA (Kumpel, 1990c) permet, après sensibilisation des hématies et lyse de celles-ci, de mesurer la quantité d'immunoglobulines fixées sur la membrane des globules rouges.

4.4.1.1. Sensibilisation des hématies

Des hématies de groupe O et de phénotype R1r ont généralement été utilisées. Après 3 lavages en NaCl 0,9%, les hématies ont été mises en suspension à 3% en

PBS/BSA 3%. La sensibilisation des hématies a été réalisée en incubant 1 volume de la suspension d'hématies à 2 volumes d'Ac pendant 45 minutes à 37°C. Le surplus d'Ac a été ensuite éliminé par trois lavages en NaCl 0,9% à 2000 tpm/5 min. La dernière centrifugation des lavages a été réalisée à 3000 tpm/5 min pour l'obtention d'un culot bien tassé.

4.4.1.2. Lyse des hématies sensibilisées

Vingt μl du culot d'hématies sensibilisées ont été ensuite lysés dans 100 μl d'une solution de lyse (Triton X-100 5% V/V en tampon PBS, phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) 2 mM et EDTA 2 mM) pendant 50 min à température ambiante sous agitation.

4.4.1.3. Quantification des IgG par ELISA

La détermination de la quantité d'IgG a été réalisée par ELISA (M.M. A-3.4.2.) avec une anti-IgG humaine (Jackson). Le lysat d'hématies a donc été réparti aux dilutions finales de 1/60, 1/120, 1/240 et 1/480 en tampon PBS tween à 0,05%. Chaque échantillon a été testé 2 fois aux 4 dilutions. L'Ac conjugué ainsi que les standards utilisés pour la quantification ont été les mêmes que dans la technique ELISA.

4.4.2. Etude de la sensibilisation en microscopie à fluorescence

Afin de pouvoir visualiser la sensibilisation des hématies par les Ac anti-D, un protocole de marquage fluorescent a été établi. Pour cela, 680 μl d'une suspension d'hématies à 0,22% ont été centrifugés à 2 000 tpm, puis 100 μl d'Ac à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ont été ensuite ajoutés à ce culot d'hématies. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, 3 lavages ont été effectués en NaCl 0,9%, puis 100 μl d'Ac anti-IgG humaines marqués au FITC (F(ab)'₂ anti-human IgG (H+L) FITC - TEBU) dilués au 1/20 dans du PBS (Gibco BRL) ont été ajoutés au culot et incubés pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Après deux lavages en PBS, le culot a été repris dans 200 μl de PBS. Une goutte de cette suspension a été placée entre lame et lamelle et observée sous microscope à fluorescence (Zeiss).

4.4.3. Etude de la sensibilisation en cytométrie en flux

Après lavage et sensibilisation des hématies avec les anti-D, celles-ci ont été de nouveau lavées et remises en suspension à 3 % en PBS. Puis, 50 µl de cette suspension ont été incubés avec 100 µl d'Ac anti-IgG humaines marqués au FITC (F(ab)'₂ anti-human IgG (H+L) FITC - TEBU) au 1/20. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, les hématies ont été lavées et reprises dans 1 ml de tampon PBS. La lecture a été effectuée au cytomètre en flux (FACScan) par le Laboratoire de cytométrie en flux du CRTS de Lille.

5. Analyse des propriétés fonctionnelles des Ac

5.1. Test d'adhérence sur monocytes activés

Il a été possible de visualiser la formation de rosettes résultant de l'adhérence de globules rouges sensibilisés à la surface de monocytes activés.

5.1.1. Préparation des cellules mononucléées sur gradient de densité

Des buffy-coats préparés à partir de dons de sang de personnes Rh(D) négatif ont été dilués dans du PBS jusqu'à un volume de 200 ml, puis 25 ml de sang dilué ont été déposés dans des tubes de 50 ml contenant 15 ml de Percoll (densité 1,077 - Biochrom KG). Après centrifugation à 1440 tpm pendant 25 minutes sans accélération ni frein, l'anneau de cellules mononucléées a été récupéré, puis dilué dans 50 ml de PBS. Après centrifugation à 1000 tpm pendant 15 minutes toujours sans accélération ni frein (afin d'éliminer le maximum de plaquettes), le culot cellulaire a été repris dans 20 ml de solution d'hémolyse NH₄Cl pendant 10 minutes. Les cellules ont été ensuite lavées deux fois en PBS par centrifugation.

5.1.2. Sensibilisation des hématies

Des hématies de groupe O et de phénotype R1r ont été utilisées pour ces tests. La sensibilisation a été réalisée suivant le protocole M.M. A-4.4.2.1.

5.1.3. Activation des monocytes

Après séparation des cellules mononucléées sur gradient de percoll, celles-ci ont été reprises dans 50 ml de DMEM + 20% SVF, puis $1,5 \cdot 10^4$ cellules mononucléées ont été

déposées sur une lamelle de verre préalablement stérilisée à la flamme et placée dans une boîte de pétri. Les lamelles ont ensuite été lavées avec du DMEM préchauffé après une incubation d'une nuit à 37°C.

5.1.4. Test d'adhérence

Deux ml d'une suspension à 3% en NaCl 0,9% d'hématies sensibilisées ont été ensuite déposés sur des lamelles et laissés incuber pendant 1 heure à 37°C. Puis les lamelles ont été lavées avec du DMEM et recouvertes de ce milieu pour la lecture. La lecture a été effectuée sous microscope par un comptage des monocytes activés formant des rosettes (c'est à dire ayant fixé au moins 3 hématies) ainsi que du nombre de cellules négatives (c'est à dire ayant fixé moins de deux hématies). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de formation de rosettes après comptage de plus de 100 monocytes activés.

5.2. Test d'ADCC et de phagocytose par coloration au DAF

L'objectif de ces tests est de pouvoir quantifier la lyse extra-cellulaire des hématies sensibilisées par les cellules effectrices (test d'ADCC) ainsi que l'internalisation de ces hématies par le phénomène de phagocytose.

5.2.1. Préparation des cellules effectrices

Des cellules effectrices ont été préparées à partir de buffy-coats issus de personnes Rh(D) négatif selon le protocole précédemment cité (M.M. A-5.1.1.). Chaque suspension de cellules effectrices sera constituée d'un mélange de 3 échantillons provenant de 3 donneurs différents. Les pourcentages de monocytes et de lymphocytes dans les différentes suspensions de cellules effectrices ont été déterminés par la technique de la coloration au bleu trypan et du comptage sur cellule de Mallassez. Une vérification de ce dénombrement a été réalisée avec une observation microscopique après coloration au May-Grünwald-Giemsa.

La lignée monocyttaire U937 (ATCC CRL 1593) a également été utilisée comme cellules effectrices pour le test d'ADCC. Pour cela, les cellules ont été cultivées en milieu RPMI + 10% de SVF et une suspension de $3 \cdot 10^5$ cellules/ml a été incubée avec 100 U/ml d'IFN- γ (Sigma) en milieu RPMI + 2% de SVF pendant 72 heures à 37°C.

5.2.2. Sensibilisation des hématies

La sensibilisation des hématies pour les tests d'ADCC et de phagocytose a été effectuée selon le protocole précédemment cité (M.M. A-4.4.2.1.) avec des hématies fraîches et stériles dont le lavage final a été effectué en DMEM au lieu de NaCl 0,9%.

5.2.3. Test d'ADCC par coloration au DAF

Après séparation des cellules mononucléées sur gradient de percoll, le culot cellulaire a été repris dans du DMEM afin d'obtenir une suspension cellulaire de $8,3 \cdot 10^6$ cellules/ml. Cent cinquante μ l/puits de cette suspension cellulaire ont été ensuite répartis en plaques 96 puits à fond plat, ainsi que 80 μ l/puits d'hématies sensibilisées pour un ratio généralement de 5 hématies pour 1 cellule mononucléée. Après une nuit d'incubation à 37°C, 100 μ l de surnageant ont été délicatement prélevés et déposés en plaque 96 puits à fond rond. Une centrifugation à 2000 tpm pendant 5 min à température ambiante a permis d'éliminer les éventuelles hématies entraînées lors du prélèvement avant la lecture.

5.2.4 Test de phagocytose par coloration au DAF

Après séparation des cellules mononucléées sur gradient de percoll, le culot cellulaire a été repris dans du DMEM + 20% SVF puis placé en flacon de 175 cm². Après une nuit d'incubation à 37°C, les monocytes activés ont adhéré au plastique du flacon et la récupération des monocytes activés a été effectuée en ajoutant 40 ml par flacon d'une solution phosphate (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, tampon phosphate 7 mM, pH 7,4) stérile et froide (Cannon, 1992). Après 30 minutes à +4°C les monocytes activés ont été récoltés par pipetage et remis en suspension à raison de $2 \cdot 10^6$ monocytes activés / ml en DMEM + 10% SVF. La répartition a été effectuée en plaque de 24 puits à raison de 1 ml par puits. Après 1 h 30 d'incubation à 37°C, 500 μ l d'hématies sensibilisées ont été additionnés par puits en respectant généralement un ratio de 5 hématies pour 1 monocyte activé. Après 1 h 30 d'incubation à 37°C, le surnageant a été enlevé et les monocytes activés ont été récupérés par décollement avec la solution de phosphate précédemment citée. Les hématies non phagocytées ont été hémolysées en tube par 4 lavages en NaCl 0,2%. Le culot de monocytes activés a été enfin récupéré par

centrifugation à 2000 rpm/min pendant 5 minutes puis lysé pendant 15 minutes par 200 µl de Tris-HCl 0,2M urée 6M pH 5,3-5,5 avant la lecture.

5.2.5. Lecture au DAF

La réaction colorée utilisée a été décrite par Gebran *et al.* (Gebran, 1992). Pour cela, une solution mère de 2,7 diaminofluorène (DAF) a été préparée avec 100 mg de DAF (Sigma) dans 10 ml d'acide acétique glacial (Codex) à 90%. A chaque lecture, une solution de DAF comprenant 1 ml de la solution mère a été mélangée avec 9 ml de Tris-HCl 0,2 M, urée 6M et 100 µl de peroxyde d'hydrogène à 30%.

Les lectures des tests d'ADCC ont été effectuées en mélangeant 60 µl de surnageant à tester avec le même volume de la solution de DAF. La lecture en densité optique a été ensuite effectuée sur lecteur ELISA à 620 nm après 5 minutes d'incubation à l'obscurité.

Les lectures des tests de phagocytose ont été effectuées avec 100 µl de cellules lysées et incubées pendant 15 minutes avec 100 µl de la solution DAF.

Chaque résultat obtenu, pour l'ADCC, correspond à la moyenne des valeurs de 8 puits de plaque 96 puits et de 4 puits de plaque 24 puits pour la phagocytose.

5.3. **Test d'activation du complément**

Le complément est un système enzymatique complexe de protéines plasmatiques susceptibles d'être activées notamment par la formation de complexes immuns (voie classique). La possibilité d'activation du complément par les Ac anti-D a donc été étudiée par l'intermédiaire d'un test d'agglutination des hématies ayant fixées la fraction C3d du complément. Un contrôle positif d'agglutination a été réalisé avec un anticorps monoclonal anti-Jk^b (M.M. A-5.3.2. et A-5.3.3.) ainsi que des essais d'activation du complément avec les anti-D (M.M. A-5.3.4.).

5.3.1. Lots de complément et dosage

Des lots de complément issus de sérums de lapins ont été récupérés. Pour cela, du sang artériel ainsi que du sang veineux de lapin ont été prélevés sur pot en verre et après rétraction du caillot, les sérums ont été récupérés et stockés à -20°C.

Une deuxième source de complément provenant de sérum humain a été utilisée. Pour cela, quatre prélèvements de groupe AB Rh(D) négatif récupérés en poche sans anticoagulant ont été fournis par le service Cession du CRTS de Lille. La rétraction du caillot a été effectuée à 37°C pendant 30 minutes directement dans la poche de prélèvement pour une des poches, tandis que pour les autres poches la rétraction a été effectuée en flacon de verre. Après rétraction du caillot, le sérum a été récupéré par centrifugation à 2 000 tpm pendant 5 minutes à +4°C et stocké en tubes de 1 ml à -80°C. Un dosage de complément a été effectué sur ces deux sérums AB+ par le laboratoire de Biochimie du CRTS de Lille selon la technique de Vargues.

5.3.2. Obtention de la fraction C3b par la technique "Fruitstone"

La préparation du C3b par la méthode en solution de basse force ionique a été réalisée à partir du protocole décrit lors de l'Atelier International sur les AcM de 1990 (Workshop, 1990). Pour cela, il a été préparé une solution B de tampon sucrose (PBsuc) (1,1 ml de KH_2PO_4 1 M, 5,25 ml de Na_2EDTA 0,2 M, 23,1 g de sucrose pour un volume total de 250 ml) ajustée à pH 5,1 avec une solution A (1,25 ml de K_2HPO_4 1 M, 5,25 ml de Na_2EDTA 0,2 M, 23,1 g de sucrose pour un volume total de 250 ml). Puis 19,8 ml de ce tampon ont été mis sous agitation à une température entre 0 et 1°C avant d'ajouter 0,5 ml d'hématies lavées 3 fois, 0,5 ml de sérum AB au 1/50 et 0,1 ml de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 0,4 M. Après une incubation de 30 min à la même température, les hématies ont été reprises et lavées en PBsuc avant d'effectuer une suspension à 3% en PBsuc.

5.3.3. Agglutination des hématies par un Ac anti-C3d

Il a été possible d'agglutiner les hématies exprimant la fraction C3d sur leur membrane avec un Ac anti-C3d (Diagast - Laboratoires). Pour cela, 100 µl d'hématies à 3% ont été placés dans un tube en verre ainsi que 100 µl du réactif anti C3d. Après la centrifugation d'une minute à 1 000 tpm, la lecture a été effectuée de la même manière que pour un test d'agglutination (M.M. A-4.1.3.).

5.3.4. Essai d'activation du complément par les Ac

Des essais d'activation du complément par les Ac anti-D ont été effectués. Pour cela, 100 µl d'une solution à 3% d'hématies lavées ont été placés dans un tube en verre avec 180 µl d'Ac et 20 µl d'EDTA pendant 45 minutes à 37°C. Après 3 lavages en NaCl 0,9%, 400 µl de complément ont été incubés avec le culot d'hématies pendant 20 min à 37°C. La détection de la fraction C3d susceptible d'être fixée sur les hématies a été effectuée d'une part par agglutination avec un Ac anti-C3d et d'autre part en cytométrie en flux en incubant les hématies, après fixation de l'anti-C3d, avec un Ac anti-IgG murin marqué au FITC. Il a été, de plus, possible de tester ces hématies sensibilisées en tests fonctionnels d'ADCC et de phagocytose.

B- INGENIERIE MOLECULAIRE

1. Clonage des chaînes légères et lourdes des Ig anti-D

1.1. Souche bactérienne et culture

1.1.1. Génotype

La souche bactérienne *Escherichia coli* NM522 (hsdΔ5, Δ(lac-pro), [F', pro⁺, lacIqZΔM15]) (Pharmacia) a été utilisée au cours de ce travail.

1.1.2. Milieux et conditions de culture

Différents milieux de culture liquides ont été utilisés :

- le milieu M9 pour la préparation de cellules électrocompétentes : 9% de M9 base (6% Na₂HPO₄.7H₂O, 3% KH₂PO₄, 0,5% NaCl, 1% NH₄Cl), 1% d'hydrolysate d'acide de caséine, 1 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂, 1% de glucose, 0,002% de thiamidine,
- le milieu LB pour la propagation bactérienne : bacto-tryptone 1%, bacto-yeast extract 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0,
- le milieu SOC pour la culture après électroporation : bacto-tryptone 2%, bacto-yeast extract 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM et, après stérilisation, ajout de MgCl₂ 10 mM et de glucose 20 mM.

Les cultures de NM 522 ont été réalisées en flacons de verre de 500 ml et de 125 ml en bain marie agité à la température de 37°C.

Pour des cultures sur milieu solide (en boîte de pétri), du LB agar 1,2% a également été préparé.

1.2. Vecteur de clonage

Le vecteur plasmidique PT7T3 18U (Pharmacia) a été utilisé pour le clonage des chaînes légères et lourdes des Ig. Ce vecteur est décrit à la figure M.1.

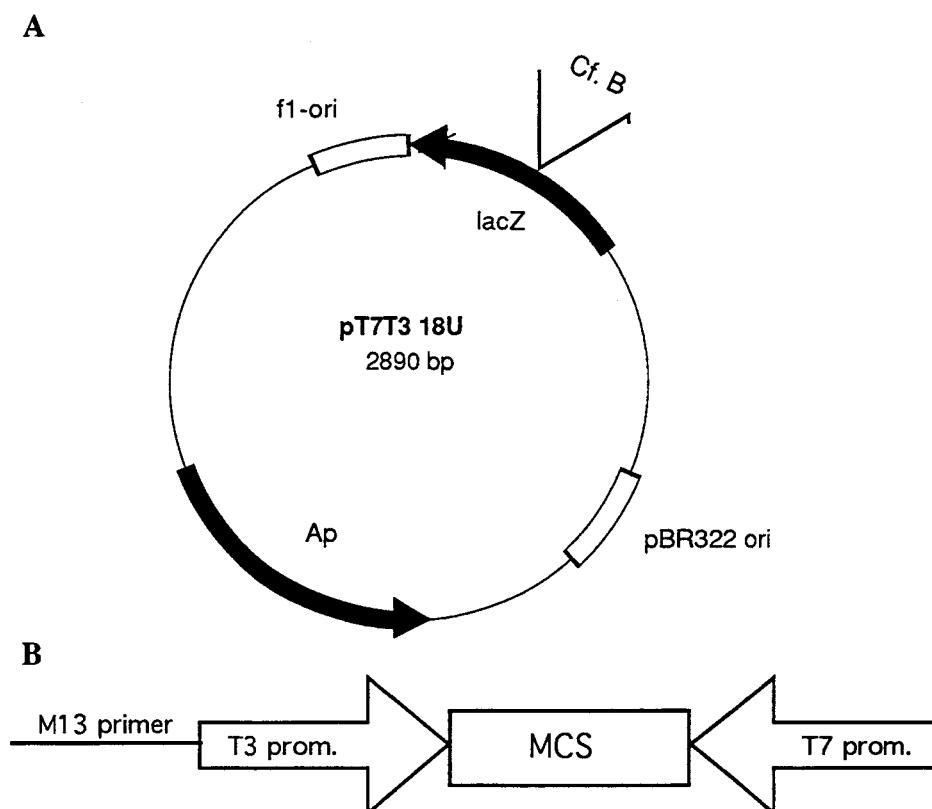


Figure M.1 : le vecteur de clonage PT7T3 18U (A) contient une origine de réplication du phage f1 (f1-ori), une origine de réplication du plasmide pBR322 (pBR322 ori), un gène de résistance à l'ampicilline (Ap), un gène codant pour une β-galactosidase déléetée (LacZ) à l'intérieur duquel se situe un polylinker de pUC18 (MCS) (B), les promoteurs T3 et T7 (T3 prom. et T7 prom.) et un site d'hybridation pour l'amorce universelle M13 (M13 primer).

1.3. Préparation d'oligonucléotides.

1.3.1. Synthèse d'oligonucléotides

Des oligonucléotides ont été synthétisés avec l'appareil Gene Assembler (Pharmacia) selon la méthode des phosphoramidites pour des utilisations d'amplification enzymatique ou de réaction de séquençage.

1.3.2. Dosage et pureté des oligonucléotides synthétisés

La pureté des oligonucléotides synthétisés après précipitation a été estimée en lecture spectrophotométrique par des rapports de DO 260 nm / 280 nm et 230 nm /260 nm, ainsi que la quantité obtenue par estimation à 260 nm.

1.3.3. Amorces synthétisées

1.3.3.1. Amorces s'hybridant sur PT7T3.

Plusieurs amorces s'hybridant sur le vecteur de clonage PT7T3 18U de part et d'autre du polylinker (figure M.2) ont été synthétisées (tableau M.2).

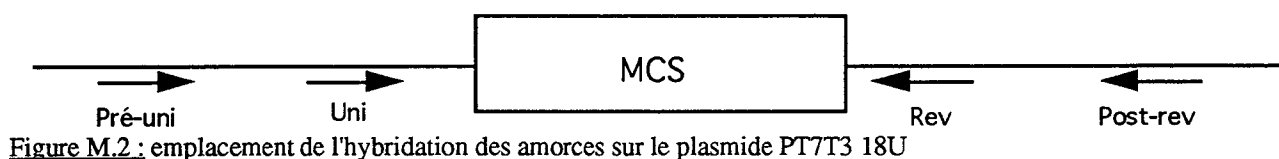


Figure M.2 : emplacement de l'hybridation des amorces sur le plasmide PT7T3 18U

Amorces	Séquence
uni	5' -CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT- 3'
rev	5' -CAG GAA ACA GCT ATG AC- 3'
Pré-uni	5' -GTG CTG CAA GGC GAT TAA GTT GG- 3'
post-rev	5' -GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA AC- 3'

Tableau M.2 : séquences des amorces s'hybridant sur PT7T3 18U.

1.3.3.2. Amorces s'hybridant sur les chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines humaines.

Différentes amorces ont été synthétisées en vue d'une amplification enzymatique par PCR des chaînes lourdes et légères des Ig humaines (tableau M.3). Les amorces 5' s'hybrident au niveau du peptide signal alors que les amorces 3' s'hybrident à l'extrémité de la région constante des chaînes lourdes et légères. D'autres amorces ont également été synthétisées pour permettre l'amplification enzymatique de portions de chaînes lourdes des Ig humaines (tableau M.4). La position relative d'hybridation sur l'ADN a été indiquée en figure M.3

Chaînes	Amorces
5' Gamma 1 : 5'RECG	5' -TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC- 3'
3' Gamma 1 : 3'INTG	5' -AGG GCT TTG TTG GAG ACC TT- 3'

Tableau M.4 : amorces internes pour l'amplification des chaînes entières lourdes d'immunoglobulines humaines.

Chaînes	Amorces
5' kappa : K5'L	5' -GTA CGT TAG AAT CTG <u>GAA TTC</u> ATG GAC ATG (AG)(AG)(AG) (AGT)(CT)C C(ACT)(ACG) G(CT)(GT) CA(CG) CTT- 3'
3' kappa : K3'L	5' -GTA CGT TAG ATA ATG <u>GAA TTC</u> ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT- 3'
5' Lambda : LamH5'L	5' -AGT CAT <u>GAA TTC</u> ATG (AG)CC TG(CG) (AT)C(CT) CCT CTC (CT)T(CT) CT(CG)(AT) (CT)C- 3'
3' Lambda : LamH3'L	5' -GTT AAC <u>GAA TTC</u> TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TGT CTT- 3'
5' Gamma 1et 3 : HS1-5'L	5' -GTT AAC <u>GAA TTC</u> ATG GAC TGG ACC TGG AGG (AG)TC (CT)TC T(GT)C- 3'
HS2-5'L	5' -GT ACG TTA GAT GTG <u>GAA TTC</u> ATG GAG (CT)TT GGG CTG A(CG)C TGG (CG)TT T(CT)T- 3'
HS3-5'L	5' -GT ACG TTA GAT GTG <u>GAA TTC</u> ATG (AG)A(AC) (AC)(AT)A CT(GT) TG(GT) (AT)(CGT)C (AT)(CT)(CG) CT(CT) CTG- 3'
3' Gamma 1et 3 : H3'L	5' -GT ACG TTA GAT GCG <u>GAA TTC</u> TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GCT CTT- 3'

Tableau M.3 : amorces pour l'amplification des chaînes entières lourdes de type IgG1 et IgG3 et légères de type kappa et lambda d'immunoglobulines humaines (Kabat, 1987 ; Larrick, 1989). Le site de restriction EcoRI a été souligné

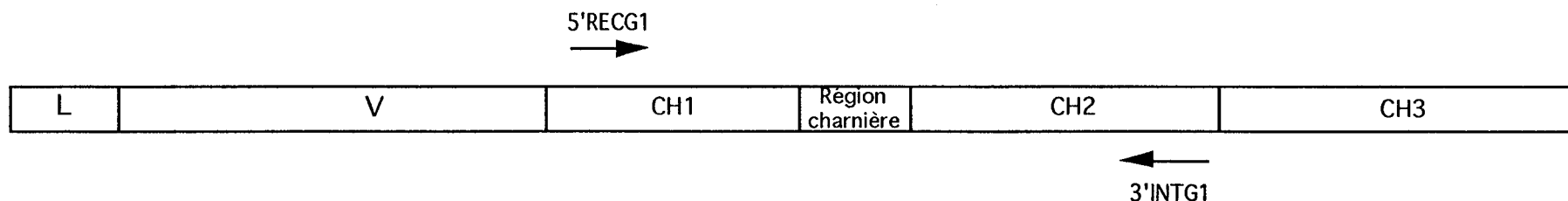


Figure M.3 : position relative de l'hybridation des amorces internes 5' RECG1 et 3' INTG1 sur une chaînes lourde d'IgG humaine

1.3.3.3. Amorces biotynilées

Les amorces Pré-uni et Post-rev spécifiques de PT7T3 18U ainsi que les amorces internes aux chaînes H des Ig 5'RECG1 et 3'INTG1 ont été biotynilées à l'aide d'un kit Biodite Biotin Amidite (Pharmacia) et sont appelées respectivement B-pré-uni, B-Post-rev, 5' RECG1B et 3' INTG1B.

1.3.3.4. Amorces fluorescentes

Des amorces fluorescentes ont été synthétisées avec le kit fluorePrime (Pharmacia) pour la préparation de réactions de séquençage des différentes chaînes d'IgG humaines. La position relative d'hybridation sur l'ADN des différentes amorces a été indiquée à la figure M.4.

1.4. Synthèse d'ADNc

1.4.1. Extraction des ARN totaux

Pour l'extraction d'ARN totaux, un culot de 10^7 cellules (M.M. A-2.2.) a été homogénéisé dans 1 ml d'une solution d'extraction (guanidine thiocyanate 4M, tris-HCl 25 mM pH 8, 1% β -mercaptoéthanol, eau DEPC (Diéthyl pyrocarbonate) pour ajuster le volume)(Sambrook, 1989). Cette solution a été additionnée de phénol et de chloroforme (1/2 V ; 1/2 V) et placée ensuite à 55 °C pendant 5 min, puis 5 min dans de la glace + eau (Davis, 1986). Après récupération de la phase aqueuse, une étape d'extraction au phénol/chloroforme (1/2 V ; 1/2 V) a été réalisée, puis après récupération de la phase aqueuse, la précipitation des ARN a été effectuée par centrifugation à 12000 tpm, pendant 15 min à 4 °C après addition d'éthanol (2V) et passage à -20°C pendant quelques heures. Après un lavage à l'éthanol 80 % (H₂O DEPC), chaque culot a été repris dans 25 μ l d'eau DEPC et placé ensuite 5 min à 65°C afin de mieux dissoudre le culot. Le stockage de l'ARN a été réalisé à -80°C.

1.4.2. Dosage et pureté des ARN

La pureté des ARN a été estimée en lecture spectrophotométrique par les rapports de DO 230 / 260 nm et 260 /280 nm ainsi que la quantité obtenue par une estimation de DO à 260 nm. Une visualisation électrophorétique après migration des ARN sur gel d'agarose

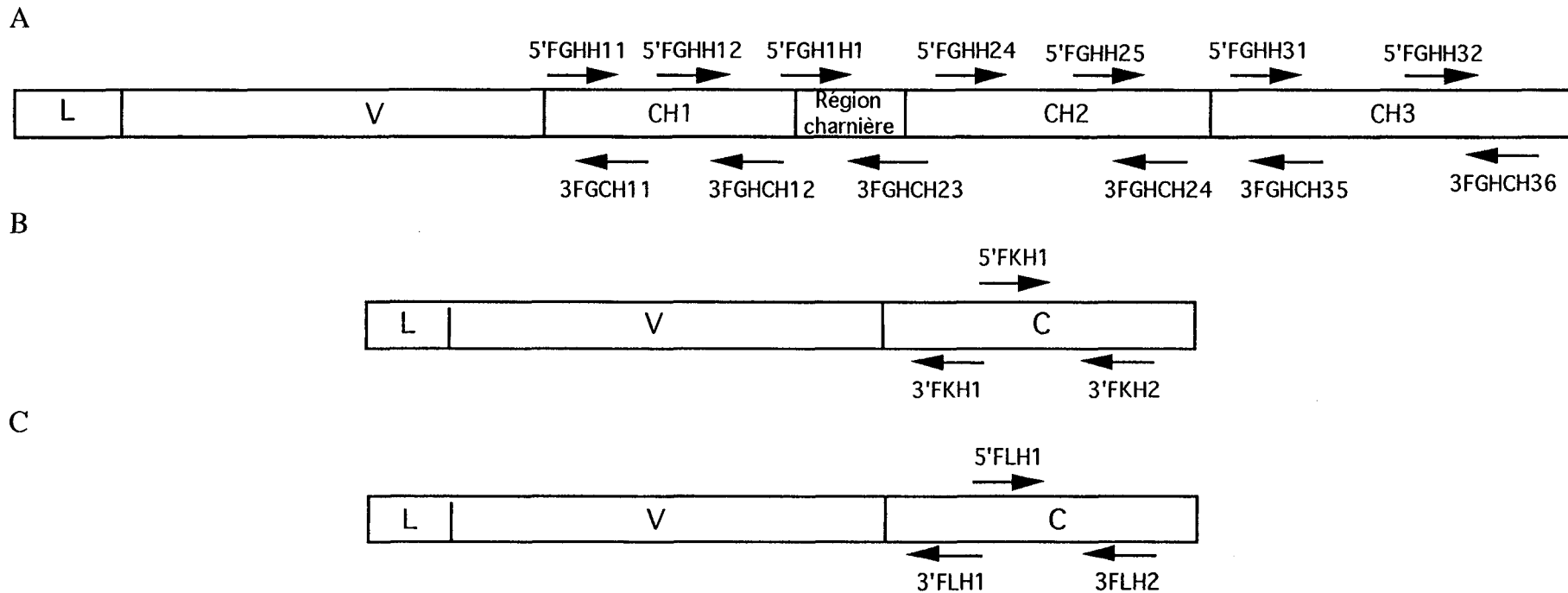


Figure M.4 : **A** : positions relatives de l'hybridation des amorces fluorescentes sur une chaînes lourde d'IgG1 humaine. Les primers 5'FGH3H1 et 5'FGHH23 sont spécifiques de la chaîne lourde d'une IgG3 et se localisent respectivement au début et à la fin de la région charnière ; **B** : positions relatives de l'hybridation des amorces fluorescentes sur une chaînes légère kappa humaine ; **C** : positions relatives de l'hybridation des amorces fluorescentes sur une chaîne légère lambda humaine

1% dénaturant (5,4 % de formamide à 37%) par coloration au BET sous UV a permis de vérifier l'absence de dégradation.

1.4.3. Synthèse du premier brin d'ADN

A partir d'une amorce oligo(dT)₁₆ s'hybridant sur l'extrémité polyadénylée des ARNm, le premier brin d'ADN a été synthétisé grâce à l'activité enzymatique de la transcriptase reverse. Pour cela 30 µg d'ARN total ont été dénaturés par un passage à 65°C pendant 3 min, puis 2 min dans un bac de glace + eau. Ont été ensuite ajoutés : 40 µl de dNTP à 2mM (Pharmacia), 40 µl de tampon 5x (0,25 M Tris-HCl pH 8,3 ; 0,375 M KCl ; 15 mM MgCl₂ ; 50 mM DTT), 2,5 U de RNasine (Promega), 15 µl de primer oligo dT 16-mer, 4 µl de DTT 0,1 M. Puis, 100 U de Reverse Transcriptase (RT M-MLV - Gibco BRL) ont été additionnés dans le mélange. Après une heure d'incubation à 37°C, le mélange a été traité pendant 5 min à 100°C, puis 2 minutes dans la glace. La conservation de l'ADNc a été réalisée à -80 °C.

1.5. **Technique PCR**

La technique PCR (Saiki, 1985) permet une amplification enzymatique *in vitro* à partir d'un couple d'amorces encadrant la région d'ADN à amplifier. Pour cela, un mélange réactionnel a été constitué de 72,5 µl d'eau, 10 µl de tampon 10x (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1 mg/ml de gélatine - Boehringer Mannheim Biochemica et Cetus-Perkin Elmer), 10 µl de dNTP (à 2 mM), de 10 à 50 pmol d'amorces 3' et 5' selon la zone à amplifier, 2% de formamide (pour l'amplification des chaînes lourdes entières), 2,5 µl de Taq (Thermus aquaticus DNA polymerase - Boehringer Mannheim Biochemica et Cetus-Perkin Elmer). L'amplification enzymatique a ensuite été réalisée sur un thermocycleur de type Thermojet (Eurogentec) avec comme température d'utilisation :

1' à 94°C / 2' à 52°C / 3' à 72°C pour les chaînes légères,

1' à 94°C / 2' à 57°C / 5' à 72°C pour les chaînes lourdes,

et un post-cycle de 10' à 72°C.

1.6. Vérification sur gel d'agarose

La visualisation des produits d'amplification par PCR a été effectuée par coloration au BET sous UV après séparation électrophorétique des fragments sur gel d'agarose (généralement entre 0,8 et 1,2% d'agarose). L'estimation de la taille des bandes a été effectuée en fonction de marqueurs de poids moléculaire.

1.7. Etape de ligation

Après amplification par PCR et purification par GeneClean (GeneClean II - Kit Bio 101 Inc.) sur gel, les gènes codant pour la synthèse des chaînes d'IgG lourdes et légères ont été digérés par *EcoRI* (Boehringer) selon les conditions préconisées par le fabricant. Les produits digérés ont ensuite été récupérés par GeneClean sans gel avant d'être insérés dans le plasmide PT7T3 18U également digéré par *EcoRI*. Pour cela, 200 ng de plasmide et 100 à 300 ng d'insert ont été incubés pendant 1 à 4 heures à 16°C (Sambrook, 1989) sous l'action de la T4 DNA ligase (Biolabs) après un passage à 45°C pendant 5 min pour libérer les bouts cohésifs.

1.8. Electrotransformation

1.8.1. Préparation des cellules électrocompétentes

Le protocole de préparation des cellules électrocompétentes s'inspire de celui de Dower *et al* (Dower, 1988). Une colonie d'*E. coli* MN522 a été tout d'abord cultivée une nuit à 37°C dans du milieu M9 afin d'assurer la rétention de l'épisome. Puis la propagation a été réalisée dans du milieu LB à 37°C sous une agitation de 230 tpm jusqu'à obtenir une concentration de bactéries correspondant à une DO mesurée à 600 nm de 0,5 à 1,0. Les cellules ont été ensuite placées sur glace pendant 15 à 30 minutes puis récupérées par centrifugation à 4 000 tpm pendant 15 min à +4°C. Deux lavages à l'eau froide ont été ensuite effectués, puis les cellules ont été resuspendues dans 20 ml de glycérol 10% froid, puis en final dans 2 ml de glycérol 10%. Le stockage des bactéries a été effectué à -80°C.

1.8.2. Protocole d'électrotransformation

L'électrotransformation des cellules a été effectuée sur un appareil Gene Pulser™ (Bio Rad) selon les réglages suivants : 25 µF ; 2,5 kV (Dower, 1988) et une

résistance de 200 Ω (Dower, 1988) pour ce qui est de l'unité Pulse Controller. La largeur des cuves d'électrotransformation était de 0,2 cm (BioRad et Eurogentec).

Les cellules électrocompétentes ont été au préalable sorties de -80°C et laissées décongeler à température ambiante avant de les placer dans de la glace (Dower, 1988). Puis, 40 μl ont été ensuite transférés dans un tube en polypropylène de 1,5 ml froid avant d'ajouter 1 à 2 μl de la solution de ligation. Après l'impulsion électrique, les cellules ont été immédiatement reprises dans 3 ml de milieu SOC et cultivées pendant 1 heure à 37°C sous une agitation de 230 rpm (Dower, 1988).

1.9. Sélection des colonies recombinantes

1.9.1. Sélection par coloration

Après une heure de culture en milieu SOC, les bactéries ont été étalées sur des plaques de milieu LB gélosé contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline. L'inducteur IPTG et le substrat chromogénique de la β -galactosidase (X-Gal - Gibco) ont été également additionnés lors de l'étalement afin de pouvoir effectuer une première sélection en fonction de la coloration des colonies bactériennes après une nuit d'incubation à 37°C . Les colonies de couleur bleu ne contiennent pas l'insert alors que les colonies de couleur blanches sont susceptibles de le contenir.

1.9.2. Vérification des colonies recombinantes

Deux techniques ont été utilisées pour vérifier la présence de l'insert dans le plasmide : - par digestion EcoRI sur une préparation d'ADN plasmidique et vérification sur gel d'agarose,

- par une amplification PCR de 30 - 35 cycles avec les amorces ayant déjà servies pour l'amplification des chaînes clonées et vérification sur gel d'agarose. Pour cela, les colonies blanches ont été récupérées dans 200 μl d'eau et traitées à 97°C pendant 2 min pour lyser les bactéries. Après élimination des débris bactériens par centrifugation, une PCR a été effectuée sur 20 μl de la solution selon les conditions précédemment citées (M.M. B-1.5.).

Dans les deux cas, la présence d'une bande de poids moléculaire correspondante aux chaînes clonées confirme la présence d'insert : 700 pb pour les chaînes légères et 1600 pb pour les chaînes lourdes.

1.9.3. Conservation des colonies recombinantes

Les colonies possédant l'insert ont été mises en culture à 37°C dans du milieu LB sous une agitation de 225 tpm pendant 6 heures. La conservation de ces colonies a été réalisée à -80°C en solution glycérol 50% (V/V).

2. Séquençage

2.1. **Obtention de l'ADN à séquencer**

Plusieurs préparations d'ADN ont été utilisées en vue des réactions de séquençage. Une préparation de type "miniprep", mais avec des volumes multipliés par 10 ("super miniprep") pour augmenter la quantité d'ADN en final, a été réalisée ainsi que des préparations de type "midiprep" et "flexiprep". De même, une obtention d'ADN a été réalisée par la technique PCR en utilisant une amorce biotinylée (voir M.M. B-1.3.3.3.) sur les deux amorces utilisées pour l'amplification.

2.2. **Préparation d'ADN simple brin**

2.2.1. A partir d'ADN obtenu par PCR

A partir d'une réaction de PCR et après une vérification sur gel d'agarose de l'absence de bandes aspécifiques, il a été possible de séparer les doubles brins d'ADN par une dénaturation chimique à la soude. Pour cela il convient de fixer la biotine de l'ADN sur des billes aimantées couplées à la streptavidine (Dynabeads M-280 - Dynal). Les billes étant ensuite récupérées avec un aimant.

Le protocole de fixation et de dénaturation de l'ADN a été réalisé selon les conditions préconisées sur la fiche technique Dynal. Pour cela, 50 µl de billes ont été lavés deux fois dans 100 µl de BW1 (BW1 étant une dilution au 1/2 dans de l'eau de BW2 de composition : 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA ; 2M NaCl), puis resuspendus dans 100 µl de réaction de PCR auxquels ont été additionnés 100 µl de BW2. Après une incubation sous agitation douce de 30

min à température ambiante pour que l'ADN puisse se fixer sur les billes, celles-ci ont été récupérées à l'aide d'un aimant et lavées avec 100 µl de BW1. L'ADN a été ensuite dénaturé avec 100 µl de NaOH 0,4 M pendant 10 min à température ambiante. Les billes ont ensuite été récupérées et lavées plusieurs fois avec 100 µl de NaOH 0,1 M puis 100 µl de BW1 et enfin avec 100 µl d'eau avant d'être remises en suspension dans 21 µl d'eau.

Le surnageant a pu être récupéré et neutralisé (10 µl d'HCl 1 M) avant d'être précipité à l'éthanol.

2.2.2. A partir d'ADN obtenu par midiprep

Les préparations de la matrice simple ont été réalisées suivant le protocole du kit AutoRead sequencing (Pharmacia).

2.3. Réactions de séquençage et séquençage

Les réactions de séquençage ont été effectuées suivant le protocole du kit AutoRead sequencing (Pharmacia) selon le principe de l'obtention directe de simple brin à partir des produits de PCR ou de double brin. Les fragments générés par la méthode de Sanger ont été rendus fluorescents par l'utilisation des amorces fluorescentes M13-uni et rev du kit ainsi que les amorces synthétisées (M.M. B-1.3.3.4.).

Le gel d'électrophorèse servant au séquençage était de composition acrylamide/bis-acrylamide 6% plus urée 7M (fiche technique Pharmacia). Après filtration sur filtre 0,22 µm, la polymérisation du gel a été réalisée par addition de 70 µl de TEMED (tétra méthyl éthylènediamine) et de 280 µl d'ammonium persulfate à 10%.

La séparation électrophorétique et l'analyse a été réalisée sur un automate ALF (Automated Laser Fluorescent) DNA sequencer (Pharmacia).

2.4. Elaboration des séquences consensus par chaîne d'Ig et analyse

Pour chaque chaîne d'Ig, un clone bactérien a été séquencé et vérifié au moins 3 fois afin de déterminer la séquence du clone. Ensuite au moins deux autres clones bactériens ont été séquencés et comparés au premier afin d'élaborer une séquence consensus de la chaîne. L'analyse de ces séquences a été réalisée sur le logiciel DNAsis.



RESULTATS

PARTIE A

Production et dosage des anticorps monoclonaux anti-D

1. Production des Acm anti-D

Les trois hybridomes P3X83, HM16 et P3X212 ont été cultivés en spinner. La concentration des Ac dans les surnageants de culture a été déterminée par la technique ELISA et les résultats obtenus ont été transcrits dans le tableau R.1.

Hybridomes	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
P3X83	5,1
HM16	3,6
P3X212	4,2

Tableau R.1: dosage des IgG humaines en test ELISA dans les surnageants de fin de culture.

La culture de l'hybridome P3X35 a été effectuée pour la société Diagast - Laboratoires en cytotoculteur de 320 litres.

Les Ac AD1 et AD3 ont été produits par la Société Biotest Pharma (collaboration LFB-Biotest) avec un système de cytotoculteur de 20 litres à perfusion.

2. Purification des surnageants de culture

Une fois produits, les Ac ont été purifiés. Le tracé, reproduit à la figure R.1, est un exemple de purification sur protéine A du surnageant de culture de l'hybridome HM16. Le pic 1 correspond à la fraction du surnageant non retenue par la colonne et le pic 2 à l'éluat de la fraction retenue, c'est à dire à l'Ac purifié. Le même profil de purification que sur la figure R.1 a été observé lors de la purification des anticorps anti-D P3X83, P3X35 et P3X212.

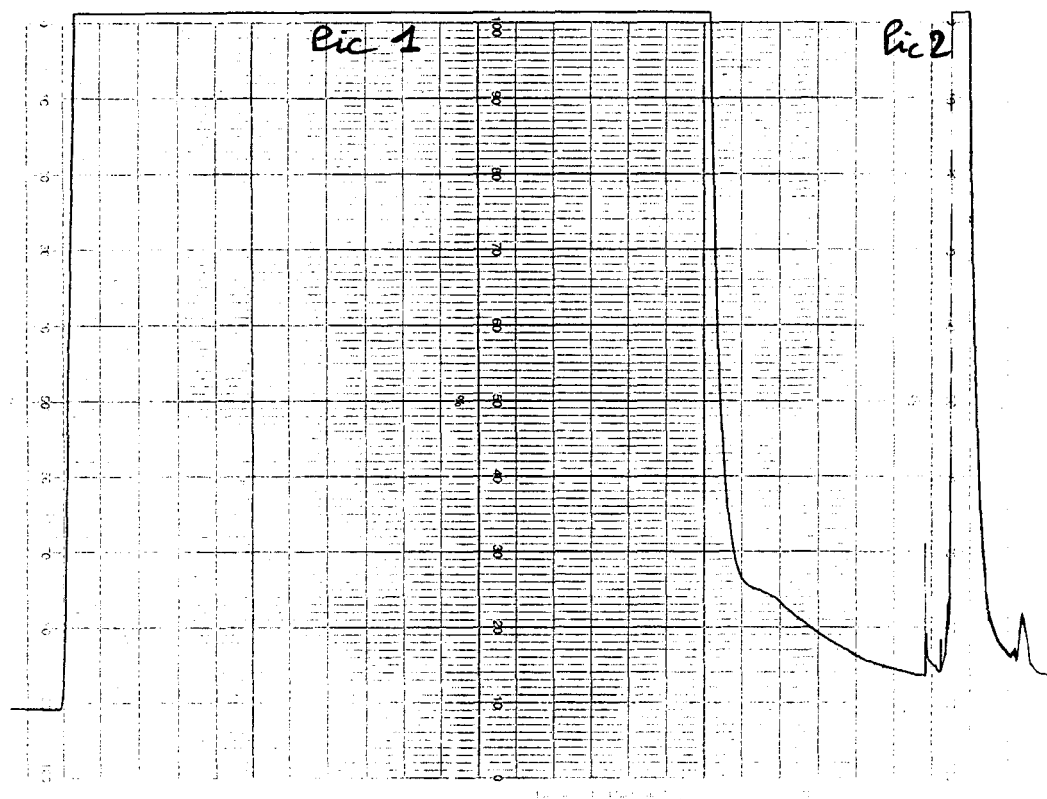


Figure R.1 : profil de purification de l'Acm HM16. La sensibilité de la détection était de 0,1 et la vitesse de défilement du papier de 1 mm/min.

3. Dosage des Acm purifiés

Le dosage des Acm purifiés a été effectué par trois techniques différentes : par densité optique, par dosage ELISA et par autoanalyseur. L'ensemble des résultats a été répertorié dans le tableau R.2.

Des discordances ont été observées entre les résultats obtenus par les différentes techniques pour l'ensemble des Ac monoclonaux sauf pour l'Ac P3X212. Les concentrations obtenues par la technique ELISA sont généralement supérieures à celles obtenues par densité optique et par autoanalyseur. Les concentrations moyennes finales qui ont été utilisées pour les différents tests sont celles obtenues par autoanalyseur soient 0,9 mg/ml pour l'Ac P3X35, 0,3 mg/ml pour les Ac P3X83 et HM16 et 1,3 mg/ml pour l'Ac P3X212. La concentration des Ac AD1 et AD3 avaient déjà été déterminée respectivement à 1,8 et 1,5 mg/ml.

Acm	DO (280)	ELISA	Autoanalyseur		
			Passage 1	Passage 2	passage 3
P3X35	1,53	2,45	1,06	0,92	0,86
P3X83	0,89	1,01	0,60	0,30	0,33
			Passage 4	Passage 5	
HM16	0,88	1,08	0,30	0,31	
P3X212	1,20	1,26	1,41	1,19	

Tableau R.2 : détermination de la concentration, par les différentes techniques, des Acm purifiés et concentrés. Les résultats ont été exprimés en mg/ml. Les dosages ELISA correspondent à une moyenne de deux tests, alors que toutes les valeurs obtenues en autoanalyseur ont été retranscrites. Les standards utilisés pour la détermination de la concentration des Acm étaient un polyclonal anti-D pour l'autoanalyseur et une IgG1 pour l'ELISA.

Pour étudier l'influence de la nature des Ac standards utilisés pour l'évaluation des concentrations, des dosages ELISA ont été réalisés en testant différents Ac comme référence. Pour cela, deux Ac de type monoclonal (AD1 : IgG1 et AD3 : IgG3) et un Ac anti-D de type polyclonal (poly-G : IgG humaines polyclonales) ont été testés en dosage ELISA. Les résultats du tableau R.3 montrent que l'utilisation d'un standard IgG1 est préférable dans le dosage d'une IgG1, alors que pour le dosage de l'IgG3 et du poly-G, les standards de type IgG3 et poly-G conviennent dans les deux cas.

Standard:	AD1			AD3			Poly -G		
	AD1	AD3	Poly G	AD1	AD3	Poly G	AD1	AD3	Poly G
	96,04	80,94	83,55	ND	95,14	98,22	ND	93,69	96,71
	57,42	50,01	49	67,4	58,67	57,47	66,57	58,03	56,86
	27,22	25,04	21,7	31,78	29,21	25,27	31,75	29,24	25,39
	12,12	8,92	9,79	13,97	10,2	11,23	14,34	10,65	16,66
	3,12	3,7	3,99	3,95	4,04	4,38	3,95	4,62	4,96

Tableau R.3 : essai d'Ac standards pour la détermination de la concentration d'Acm en test ELISA. Les concentrations attendues étaient : 100, 50, 25, 12,5 et 6,25 µg/ml. Le dosage des Ac AD1 et de AD3 avait été réalisé au préalable par plusieurs techniques (ELISA, BCA, autoanalyseur, DO à 280 nm). ND : non déterminé.

PARTIE B

Mise au point des différents tests *in vitro*

Afin de pouvoir étudier les mécanismes d'action des anti-D, plusieurs techniques ont été mises au point. Les résultats des principaux essais réalisés sont présentés dans cette partie du travail dans le but de définir les conditions optimales de chaque test. Les expérimentations sont exposées dans l'ordre suivant :

- 1 - Mise au point des tests d'ADCC et de phagocytose.
- 2 - Quantification du nombre d'hématies par coloration au DAF.
- 3 - Mise au point du test Sol-ELISA.
- 4 - Mise au point du test d'activation du complément.

1. Mise au point des tests d'ADCC et de phagocytose par coloration au DAF

Un des objectifs de l'évaluation des Acm anti-D était de mesurer leur capacité à induire une lyse extra-cellulaire et une phagocytose d'hématies Rhésus positif par différentes catégories de cellules effectrices. Pour cela, deux tests ont été mis au point (un test d'ADCC et un test de phagocytose) en utilisant une réaction colorée basée sur l'oxydation du 2,7 diaminofluorène (DAF) en bleu de fluorène par l'activité pseudo-péroxydasique de l'hémoglobine.

Dans un premier temps, la sensibilité de la coloration au DAF a été étudiée ainsi que l'hémolyse spontanée des hématies.

1.1. Sensibilité de la coloration au DAF

L'étude de la sensibilité de la réaction au DAF a été réalisée à différentes concentrations d'hémoglobine. Les résultats de la figure R.2 montrent que l'oxydation du DAF varie en fonction du nombre d'hématies lysées et qu'une variation de DO est observée à partir de 10^4 hématies. Le graphe montre ensuite une partie linéaire jusqu'à 2.10^5 hématies (coefficient de corrélation de 0,989) pour atteindre un plateau au delà de cette valeur.

La grande sensibilité de la coloration au DAF a donc permis d'envisager la mise au point de tests pour une étude quantitative de la lyse extra-cellulaire ainsi que de la phagocytose par détection de l'activité pseudo-péroxydasique de l'hémoglobine.

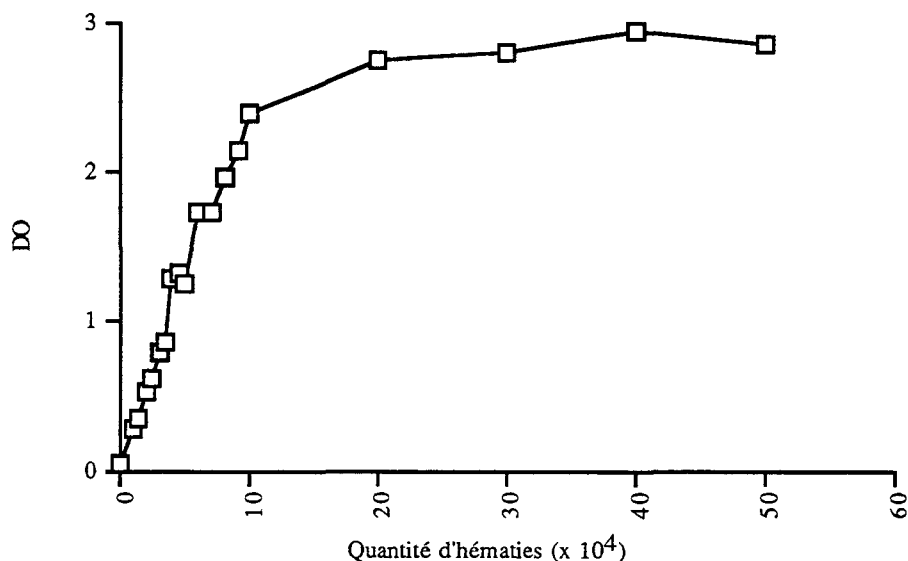


Figure R.2 : Etude de la sensibilité de la réaction au DAF. Différentes dilutions d'hématies ont été lysées avec 150 μ l de Tris-HCl 0,2 M, urée 6 M, après 3 lavages en eau physiologique. La lecture a été effectuée sur 100 μ l de cette solution selon le protocole standard à 620 nm.

1.2. Etude de l'hémolyse spontanée des hématies

L'hémolyse spontanée des hématies doit être la plus faible possible afin d'éviter un bruit de fond trop important qui perturberait les résultats des tests fonctionnels. Pour cela, des hématies incubées dans différents milieux ont été soumises aux conditions standards d'un test d'ADCC. L'évaluation par la technique au DAF de la présence d'hémoglobine dans le surnageant, après décantation des hématies, a permis de montrer que, dans les conditions opératoires décrites, l'hémolyse des hématies était très faible avec les différents milieux d'incubation RPMI, DMEM et NaCl 0,9% (tableau R.4). Par contre, les valeurs de DO obtenues avec du SVF étaient plus élevées. Le milieu DMEM a été choisi pour la poursuite des études.

Milieux d'incubation	DO sans hématie	DO avec hématies
RPMI	0,06	0,111
DMEM	0,055	0,083
NaCl 0,9%	0,05	0,09
RPMI + SVF 5%	0,266	0,396

Tableau R.4 : étude de l'hémolyse spontanée des hématies. Pour cela, $5 \cdot 10^6$ hématies ont été réparties par puits de plaque 96 dans 200 μ l d'un milieu d'incubation. Le surnageant a ensuite été testé après une nuit d'incubation à 37°C selon le test au DAF.

Deux autres paramètres concernant la qualité des hématies, ont également été pris en compte. En effet, de meilleurs résultats ont été obtenus avec des hématies stériles dont la conservation n'excède pas plus de 2 semaines à +4°C.

1.3. Préparation des cellules effectrices

Pour la réalisation des tests fonctionnels, des cellules humaines provenant de différents donneurs de sang ont été préparées.

Les pourcentages de monocytes dans les différentes suspensions de cellules effectrices utilisées ont été déterminés par observation au microscope à contraste de phase. En parallèle, une observation microscopique des cellules effectrices après coloration au May-Grünwald-Giemsa a permis sur quelques préparations, d'une part, de confirmer les pourcentages de lymphocytes et de monocytes obtenus par observation au microscope à contraste de phase et, d'autre part, de mettre en évidence la très faible proportion de polynucléaires (inférieure à 2%).

Les 21 échantillons cellulaires étudiés, qui avaient été préparés par séparation sur gradient de percoll contenaient en moyenne 25% de monocytes. Après une adhérence sur plastique à 37°C, les suspensions cellulaires récoltées étaient composées d'environ 64,8% de monocytes (tableau R.5). L'adhérence des cellules à 37°C a comme effet une activation des cellules monocytaires.

	Monocytes (%)	Ecart-type
Cellules mononucléées	25	11,67
Monocytes activés	64,79	7,75

Tableau R.5 : pourcentages moyens de monocytes observés dans une préparation de cellules mononucléées (moyenne et écart-type sur 21 préparations) et de monocytes activés (moyenne et écart-type sur 13 préparations).

1.4. Etude cinétique de la sensibilisation

Une étude cinétique de la fixation des anti-D à la surface des globules rouges a été réalisée en quantifiant les anti-D fixés avec la technique Sol-ELISA (mise au point voir Résultats B-3.) après plusieurs temps d'incubation à 37°C. Cette étude a été réalisée avec les Ac AD1, AD3, P3X83, HM16 et le polyclonal anti-D P1.

Les résultats obtenus à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml ont montré que le temps d'incubation couramment utilisé au laboratoire (45' à 37°C) n'est pas optimal pour tous

les Ac quant à la quantité d'Ac fixés (figure R.3). En effet, avec les Ac AD1 et P3X83, le taux d'anti-D fixés sur les globules rouges augmente pour avoir un optimum après 3 heures d'incubation alors que pour les Ac AD3, HM16 et le polyclonal anti-D P1, l'optimum est à 45 minutes.

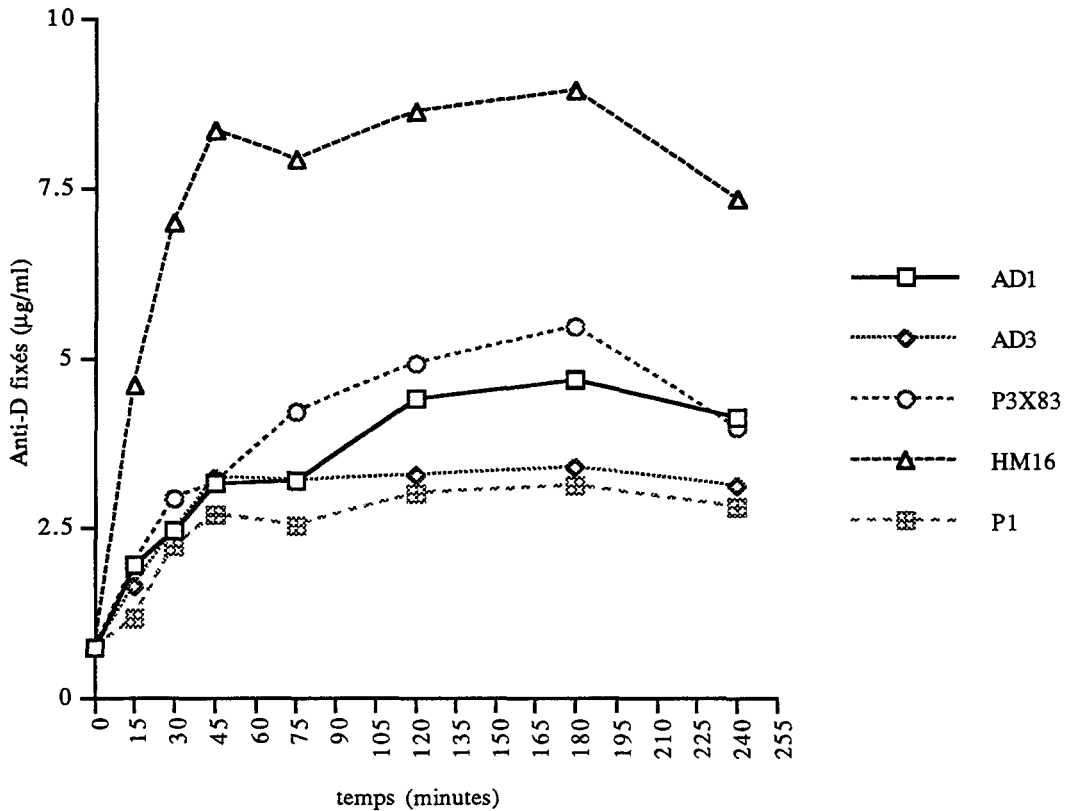


Figure R.3 : étude cinétique de la fixation des anti-D sur les globules rouges par le test Sol-ELISA. Les Ac testés étaient AD1, AD3, P3X83, HM16 et le polyclonal anti-D P1. La concentration de sensibilisation était de 100 ng/ml et les durées d'incubation à 37°C de : 15, 30, 45, 75, 120, 180 et 240 minutes.

1.5. Etude de la conservation des suspensions d'hématies sensibilisées à +4°C

Après la sensibilisation des hématies avec les Ac anti-D, les suspensions d'hématies sont mises à +4°C avant utilisation. Il fallait donc vérifier l'influence, sur les suspensions d'hématies sensibilisées, tout d'abord de la mise à +4°C de ces suspensions et ensuite de la durée de cette conservation.

Pour cela, une détermination de la quantité d'anti-D fixés sur les globules rouges a été réalisée après les 45 minutes d'incubation pour la sensibilisation des hématies avec les Ac AD1, AD3, P3X83, HM16 et le polyclonal anti-D P1. Puis, après la mise en suspension des culots et

stockage à +4°C, une quantification par Sol-ELISA des anti-D fixés a été réalisée après plusieurs temps d'incubation.

Les résultats de la figure R.4 montrent que la mise à +4°C des suspensions d'hématies sensibilisées provoquent une diminution de la quantité d'anti-D fixés pour les Ac HM16, AD3 et le polyclonal anti-D P1 dès les premières 30 minutes. Passé ce délai, une relative stabilité de la fixation des Ac sur l'Ag D a été observée sur 4 heures de conservation à +4°C.

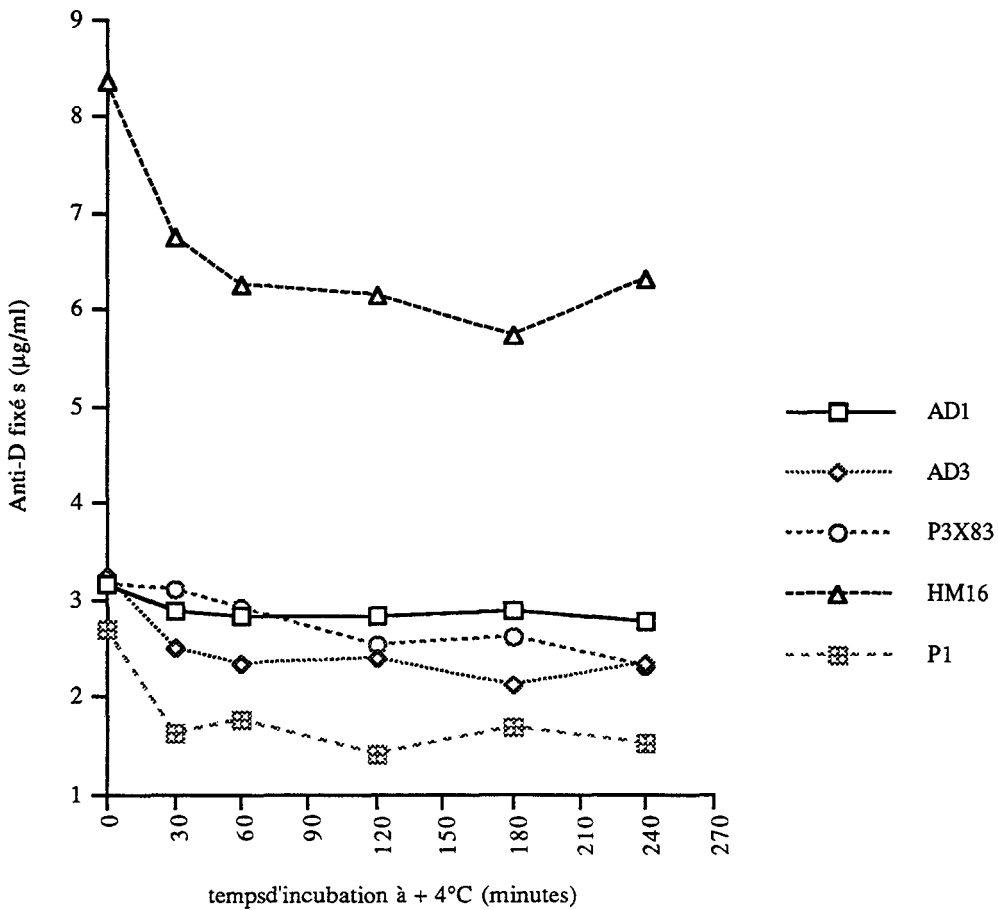


Figure R.4 : étude de la quantité d'anti-D fixés sur les hématies lors d'une conservation à +4°C. Les hématies ont été sensibilisées avec les Ac AD1, AD3, P3X83, HM16 et le polyclonal anti-D P1 à la concentration de 100 ng/ml. Après l'étape de la sensibilisation, les hématies ont été lavées puis remises en suspension dans du milieu DMEM et conservées à +4°C pendant différents temps.

La conservation des suspensions d'hématies sensibilisées à +4°C n'est donc pas un facteur limitant pour une utilisation en tests d'ADCC et de phagocytose.

1.6. Etude de la fixation des IgG bovines sur les hématies Rh(D) positif humaines

La purification sur protéine A des différents surnageants de culture ne permet pas de séparer correctement les anti-D des IgG bovines présentes dans le milieu de culture (addition de SVF). Par conséquent, les préparations d'Acm anti-D contiennent des IgG bovines.

Il fallait donc s'assurer que les IgG bovines ne se fixaient pas sur les hématies Rh(D) positif humaines utilisées. Pour cela, une quantification en Sol-ELISA des IgG bovines a été réalisée après sensibilisation des hématies avec des IgG bovines purifiées sur protéine A provenant du SVF.

Les résultats obtenus ont montré que pour des concentrations de sensibilisation avec des IgG bovines allant de 100 ng/ml à 6000 ng/ml, les IgG bovines ne se fixaient pas sur la membrane des globules rouges. Les DO obtenues étaient comparables aux valeurs enregistrées avec les témoins négatifs.

La présence d'IgG bovines dans les préparations d'Acm anti-D purifiés n'a donc aucune influence sur la réactivité des anti-D avec les hématies Rh(D) positif.

1.7. Mise au point du test d'ADCC par coloration au DAF

La mise au point du test d'ADCC a nécessité de contrôler les paramètres suivants : - la concentration en cellules effectrices, - le ratio cellules mononucléées/hématies, - le temps d'incubation, - les variations de la réponse en fonction de l'origine des cellules effectrices. Un contrôle de la spécificité de la lyse extra-cellulaire des hématies sensibilisées et une validation du test d'ADCC ont ensuite été réalisés.

1.7.1. Concentration en cellules effectrices

Les conditions optimales pour les tests d'ADCC ont été essentiellement définies avec le polyclonal anti-D P1.

Des essais avec différentes concentrations en cellules mononucléées ont permis de déterminer une concentration de cellules effectrices à utiliser : 10^6 cellules/puits (figure R.5). En effet, à cette concentration, les valeurs de DO obtenues étaient moyennes, de l'ordre de 1, permettant ainsi des variations de part et d'autre de cette valeur (conditions non saturantes). De

plus, une absence d'interférence avec des hématies non sensibilisées a été observée, même aux fortes concentrations de cellules mononucléées.

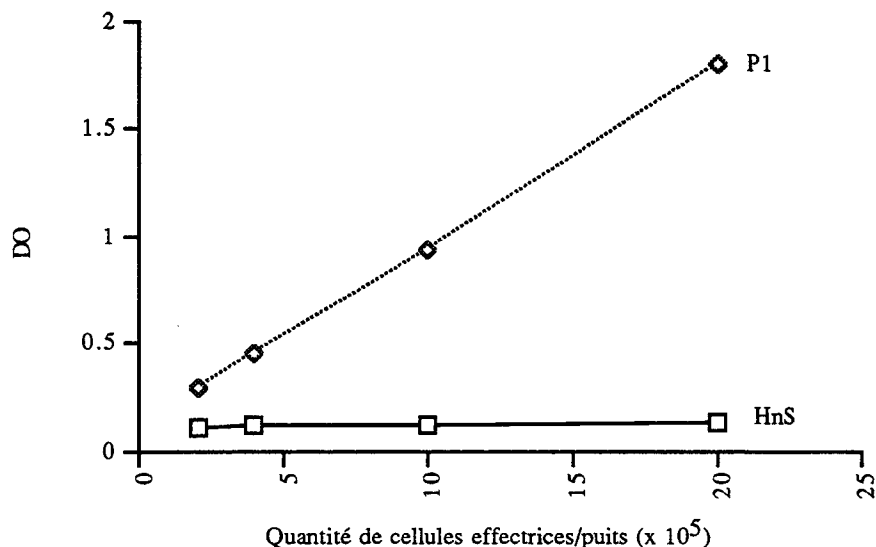


Figure R.5 : influence de la concentration en cellules effectrices (cellules mononucléées) sur la lyse d'hématies sensibilisées. Les conditions du test ont été fixées arbitrairement à savoir : une concentration de sensibilisation du polyclonal anti-D P1 de 500 ng/ml, un ratio cellules mononucléées/hématies de 1/5 et une durée d'incubation à 37°C de 20 heures. HnS : hématies non sensibilisées.

1.7.2. Etude du ratio cellules mononucléées/hématies

Deux ratios cellules mononucléées/hématies ont été testés en ADCC. Les résultats obtenus (figure R.6) ont montré qu'avec un ratio de 1 cellule mononucléée pour 5 globules rouges, les résultats de lyse étaient nettement meilleurs par rapport au ratio 2/1. Ce résultat est particulièrement net aux faibles concentrations de sensibilisation des hématies (100 ng/ml) : DO de 0,7 pour un ratio de 1/5 et DO de 0,07 pour 2/1.

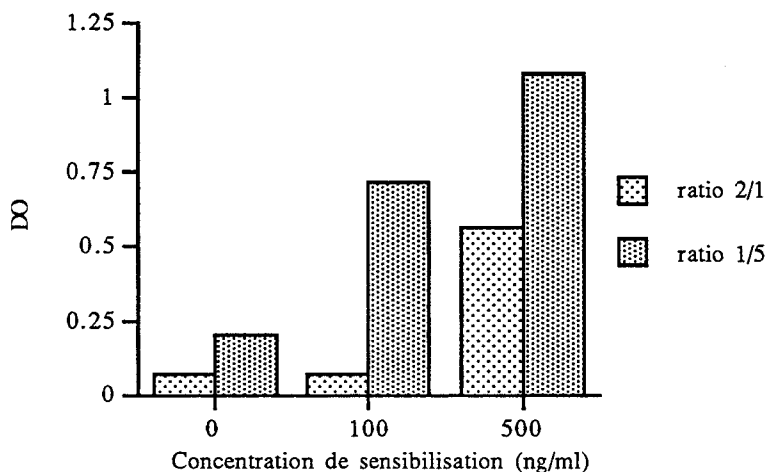


Figure R.6 : étude du ratio cellules mononucléées/hématies en test d'ADCC. La quantité de cellules mononucléées était de 10^6 cellules/puits. Les concentrations de sensibilisation testées avec le polyclonal anti-D P1 étaient de 0 ; 100 et 1000 ng/ml avec des ratios de 2/1 et de 1/5.

1.7.3. Etude cinétique du test d'ADCC

Une étude cinétique en test d'ADCC a montré que la lyse d'hématies sensibilisées par des cellules effectrices était détectable dès la première heure d'incubation à 37°C et qu'une saturation de l'activité lytique était obtenue après 20 heures (figure R.7). Avec des hématies non sensibilisées, aucune activité lytique n'a été observée même pour des durées d'incubation supérieures à 44 heures.

Pour la suite des essais, une incubation de 20 heures a été retenue comme valeur optimale.

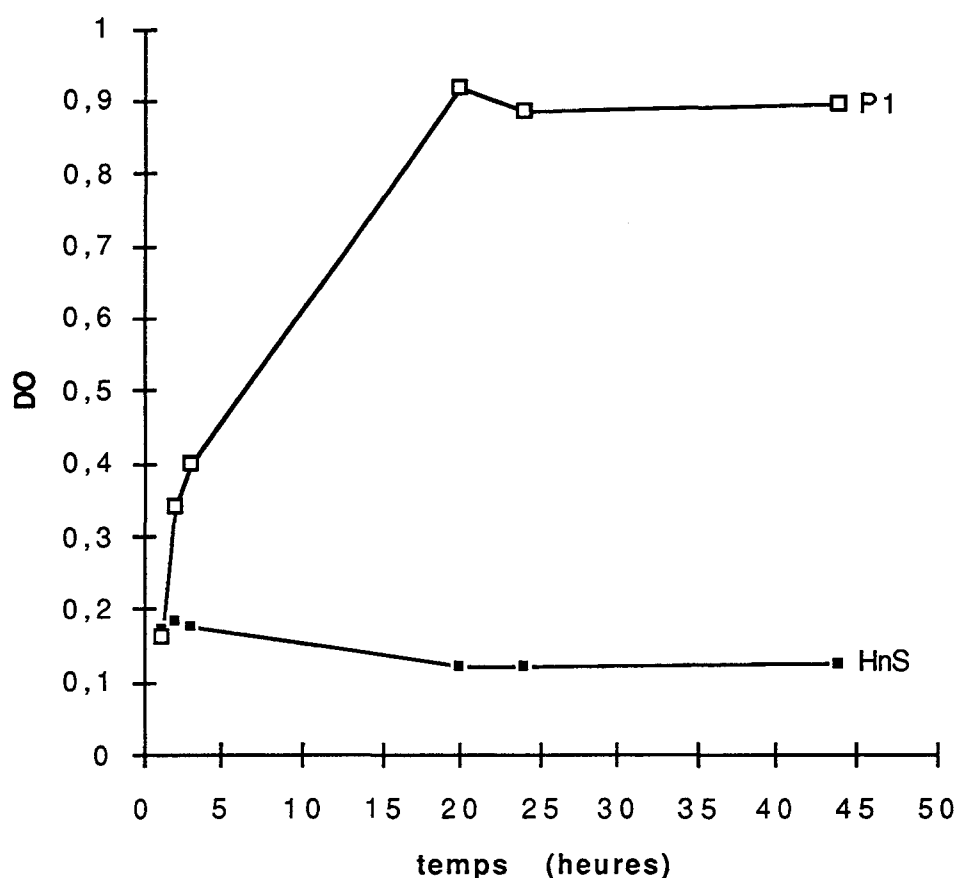


Figure R.7 : influence de la durée d'incubation sur la lyse d'hématies sensibilisées par le polyclonal anti-D P1. La concentration de sensibilisation était de 500 ng/ml, le ratio cellules mononucléées/hématies de 1/5, la quantité de cellules mononucléées de 10^6 cellules/puits et les temps d'incubation de 1, 2, 3, 20, 24, 44 heures. HnS : hématies non sensibilisées.

1.7.4. Hétérogénéité de la réponse ADCC par rapport aux donneurs de cellules effectrices

Un test d'ADCC avec le polyclonal anti-D P1 a été réalisé avec des cellules mononucléées obtenues par séparation de trois buffy-coats provenant de 3 donneurs différents. Les résultats de la figure R.8 montrent une hétérogénéité de la réponse en fonction du donneur de cellules effectrices. Par contre, le fait de mélanger les cellules effectrices provenant de la séparation des trois buffy-coats a permis d'obtenir une réponse dont la valeur correspond à une moyenne des résultats obtenus avec chacun des échantillons. Par la suite, tous les tests ont été systématiquement réalisés avec des cellules effectrices correspondant à un mélange de 3 suspensions cellulaires différentes.

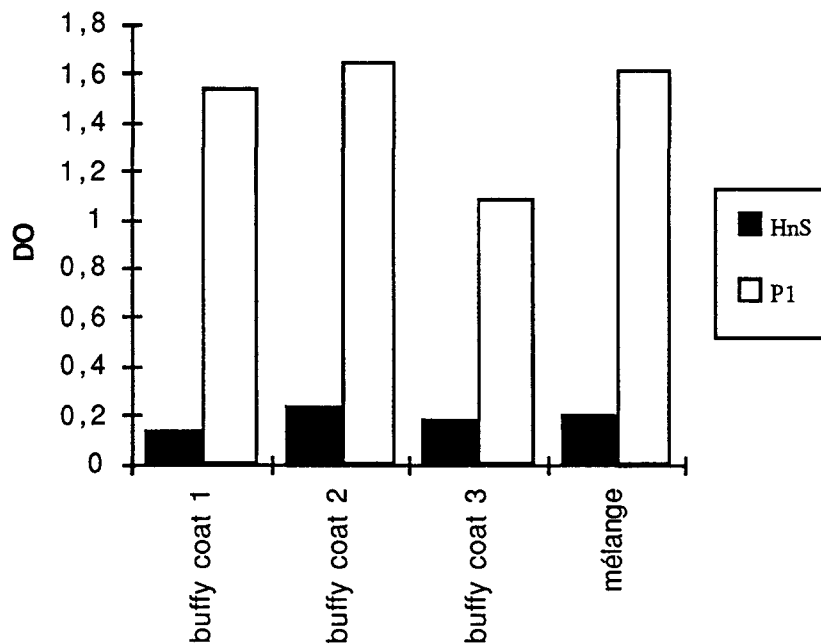


Figure R.8 : hétérogénéité de la réponse ADCC en fonction des donneurs de cellules effectrices. Le test d'ADCC a été réalisé avec des cellules mononucléées obtenues par séparation isolée de trois buffy-coats et de leur mélange. La concentration de sensibilisation du polyclonal anti-D P1 était de 500 ng/ml, le ratio cellules mononucléées/hématies de 1/5 et la quantité de cellules mononucléées de 10^6 cellules/puits. HnS : hématies non sensibilisées.

1.7.5. Validation du test d'ADCC

Plusieurs contrôles négatifs ont été réalisés dans le but de montrer que la lyse des hématies Rh positif obtenue était bien due à la présence d'anti-D et non à un artefact. De faibles valeurs de DO ont été observées avec les contrôles suivants : cellules mononucléées

seules, DO = 0,05 ; cellules effectrices et hématies non sensibilisées, DO = 0,15 ; hématies non sensibilisées seules, DO = 0,2 ; hématies sensibilisées avec l'anti-D P1 seules, DO = 0,13 (figure R.9).

La lyse des hématies Rh positif sensibilisées avec l'anti-D P1 à la concentration de 500 ng/ml en présence de cellules effectrices est donc bien spécifique (DO = 1,46).

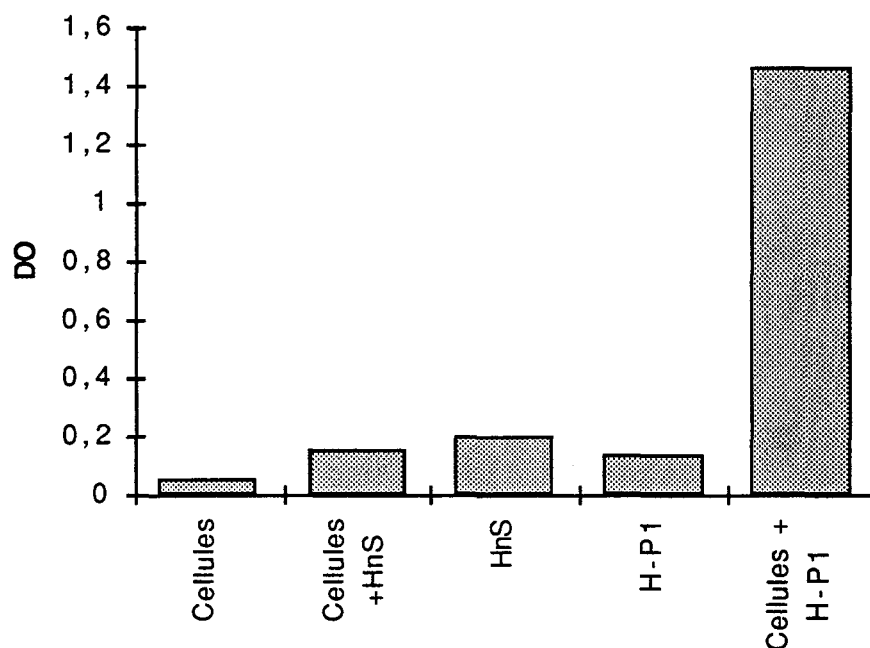


Figure R.9 : étude de la spécificité du test d'ADCC. Les tests ont été réalisés selon les conditions suivantes : une concentration de sensibilisation de 500 ng/ml pour le polyclonal anti-D P1, une quantité de cellules effectrices de 10^6 cellules/puits, un ratio cellules mononucléées/hématies de 1/5 et une incubation à 37°C de 20 heures. HnS : hématies non sensibilisées, H-P1 : hématies sensibilisées avec le polyclonal anti-D P1.

Un test d'ADCC au ^{51}Cr (laboratoire d'Immunologie Erythrocytaire, ETS de Lille) a été réalisé parallèlement à un test d'ADCC par coloration au DAF avec différents Ac anti-D. Les résultats de la figure R.10 montrent que les variations obtenues entre l'Ac AD3 et le polyclonal anti-D étaient identiques pour les deux tests d'ADCC. Par contre, l'Ac AD1 présentait une activité supérieure à celle obtenue avec les Ac AD3 et P1 dans le cas des tests au DAF alors qu'elle était comparable dans les tests au chrome.

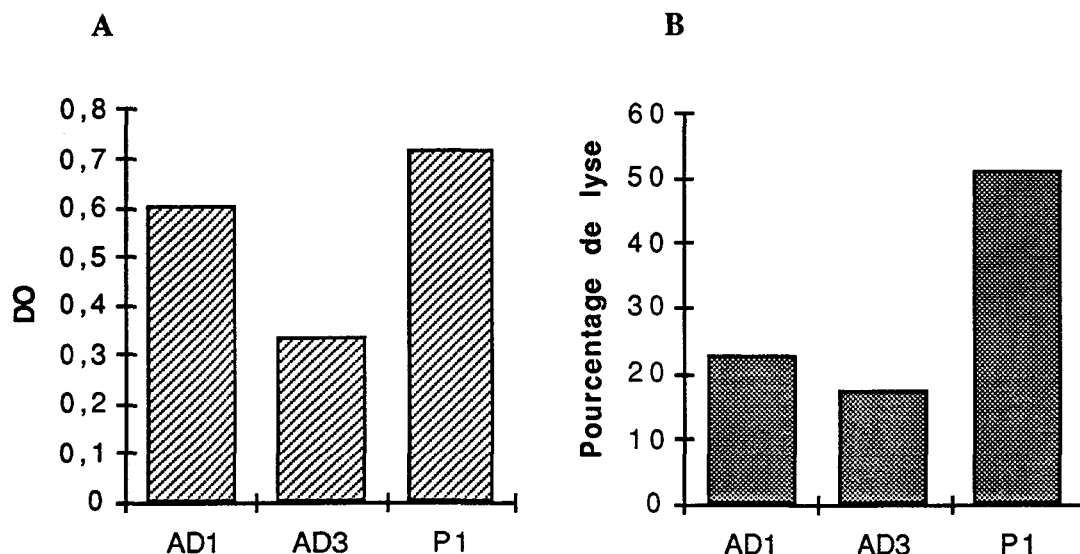


Figure R.10 : étude comparative de l'activité ADCC de 3 anti-D selon la technique au DAF (A) et au ^{51}Cr (B). Les Ac testés étaient les Ac monoclonaux AD1 et AD3 et le polyclonal anti-D P1. La concentration de sensibilisation des hématies était de 500 ng/ml.

Une étude de la répétabilité du test d'ADCC a également été réalisée. En effet, les mêmes échantillons ont été testés deux fois en parallèle par le même opérateur. Les écarts de DO obtenus entre les deux manipulations (figure R.11) ont été très faibles : +/- 0,1 unité de DO.

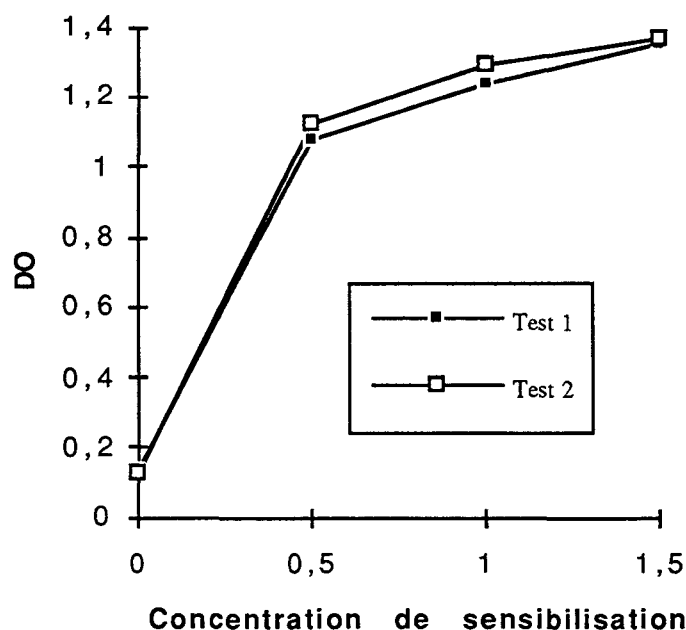


Figure R.11 : étude de la répétabilité du test d'ADCC. Deux tests ont été réalisés parallèlement avec l'Ac polyclonal P1 à différentes concentrations en respectant les mêmes conditions opératoires et avec les mêmes cellules effectrices. Les concentrations de sensibilisation sont inscrites en $\mu\text{g/ml}$.

Pour ce qui est de la reproductibilité du test, plus d'une cinquantaine de tests d'ADCC ont été réalisés, au cours de ce travail, avec des suspensions de cellules effectrices différentes. Une

variation importante des résultats entre les séries de tests a été généralement observée à cause de l'hétérogénéité inhérente à tout matériel biologique (voir figure R.40 - Résultats D.2.2.3.). Par conséquent, le même anti-D polyclonal de référence a toujours été utilisé dans tous les tests afin de pouvoir comparer les différentes manipulations entre-elles.

1.8. Mise au point du test de phagocytose par coloration au DAF

La mise au point du test de phagocytose a nécessité de contrôler les paramètres suivants : - la concentration en cellules effectrices, - l'élimination des hématies adhérees, - la cinétique du test. Un contrôle de la spécificité du test a ensuite été réalisé.

1.8.1. Concentration en cellules effectrices

Les tests de phagocytose ont été réalisés avec des suspensions de monocytes activés à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/puits de plaque 24 puits.

Les monocytes ont été préparés à partir d'un mélange de 3 buffy-coats afin de limiter l'hétérogénéité des réponses obtenues avec des cellules provenant de donneurs différents (voir Résultats B-1.7.4.).

1.8.2. Elimination des hématies fixées aux cellules effectrices

Les valeurs de DO obtenues dans les premiers tests avec des hématies non sensibilisées étaient de l'ordre de 1,5. Ces résultats étaient dus à une élimination incomplète des hématies ayant adhérees aux cellules effectrices.

Afin d'éliminer cet artéfact, les cellules effectrices ont été récupérées et 4 solutions différentes de lyse d'hématies (solutions d'hémolyse) ont été testées (tableau R.5).

Solutions d'hémolyse	DO sans hématie	DO avec hématies
1	0,19	1,178
2	0,196	0,250
3	0,125	0,331
4	0,140	0,621

Tableau R.5 : étude de l'élimination des hématies ayant adhéré aux monocytes par différentes solutions d'hémolyse. Les essais ont eu lieu sur cellules effectrices avec et sans hématies non sensibilisées pour un ratio monocytes activés/hématies de 1/5. Les solutions suivantes ont été testées : solution 1 : 1 x NaCl 0,2% (Gebran, 1992) ; solution 2 : 4 x NaCl 0,2% ; solution 3 : 2 x NaCl 0,2%, 2 x oxalate d'ammonium 1% w/v, Na₂EDTA 2 mM (Hadley, 1989a) ; solution 4 : 2 x NaCl 0,2%, 2 x NH₄Cl

Les solutions 1 et 4 n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Une meilleure élimination des hématies adhérentes a été cependant obtenue avec la solution 3 ainsi qu'avec la solution 2. Cette dernière solution a été retenue pour les études ultérieures de phagocytose. Ainsi quatre lavages des cellules effectrices en présence d'une solution de NaCl 0,2% a permis d'éliminer les hématies adhérentes sans que l'intégrité des cellules effectrices n'en soit affectée (vérification au microscope).

1.8.3. Etude cinétique du test de phagocytose

L'étude cinétique a montré qu'une phagocytose d'hématies sensibilisées par le polyclonal P1 peut être observée dès 30 minutes d'incubation (figure R.12). Un maximum d'activité a été obtenu après 120 minutes. Avec des durées d'incubation plus longues, les valeurs de DO ont tendance à diminuer. Pour les études ultérieures, un temps d'incubation de 90 minutes a été appliqué.

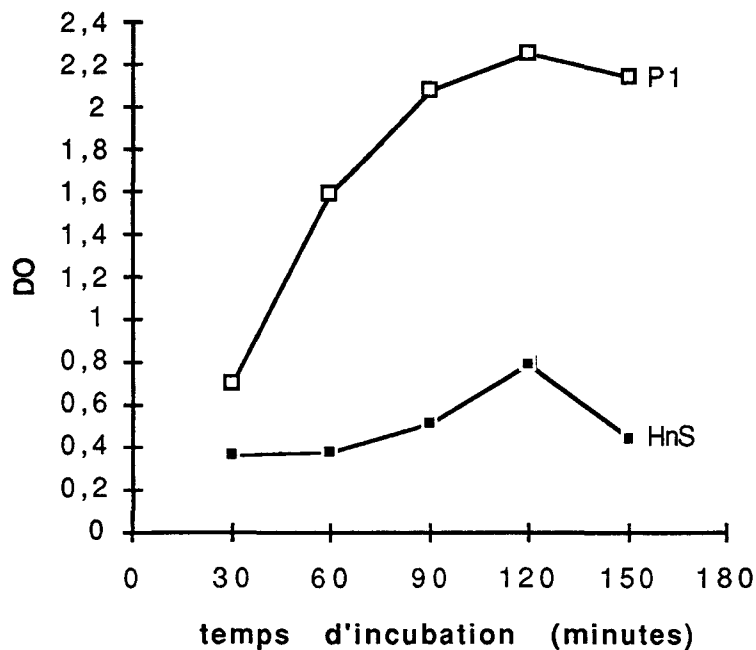


Figure R.12 : influence de la durée d'incubation sur la phagocytose d'hématies sensibilisées par le polyclonal anti-D P1. La concentration de sensibilisation était de 500 ng/ml et le ratio monocytes activés/hématies de 1/5. HnS : hématies non sensibilisées.

1.8.4. Validation du test de phagocytose

Un test de phagocytose a été effectué en reprenant les conditions précédemment décrites et les résultats obtenus ont été présentés sur la figure R.13.

Plusieurs contrôles négatifs ont été réalisés pour pouvoir prouver la spécificité du mécanisme de phagocytose. Ainsi, de faibles valeurs de DO ont été obtenues avec les expériences suivantes : cellules effectrices seules : DO = 0,21 ; cellules effectrices avec hématies non sensibilisées : DO = 0,27 ; hématies non sensibilisées seules : DO = 0,18 ; hématies sensibilisées avec le polyclonal anti-D P1 sans cellules effectrices : DO = 0,15. Le test réalisé en présence de cellules effectrices et d'hématies sensibilisées a montré qu'il y avait une phagocytose importante des hématies Rh positif avec une valeur de DO de 1,64.

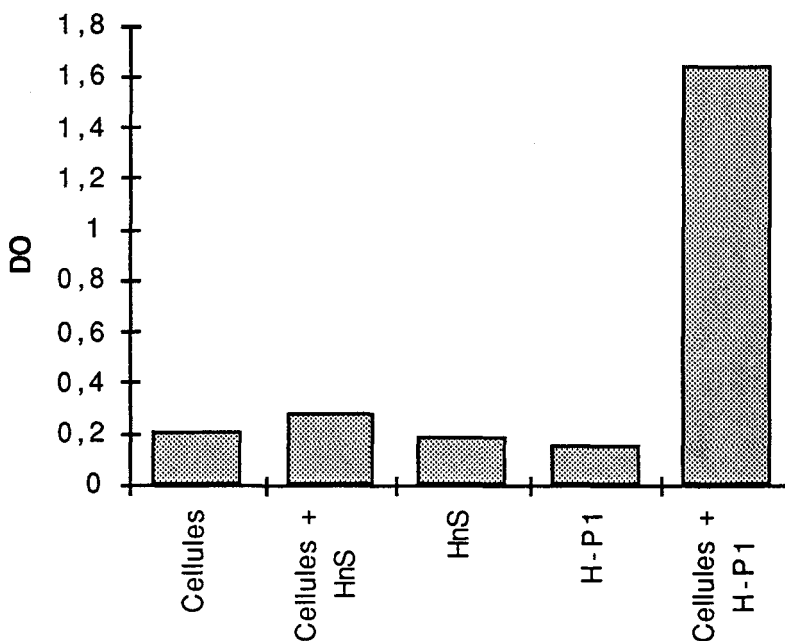


Figure R.13 : étude de la spécificité du test de phagocytose. Les tests ont été réalisés selon les conditions suivantes : une concentration de sensibilisation de 500 ng/ml pour le polyclonal anti-D P1, une quantité de monocytes activés de 2.10^6 cellules/puits, un ratio monocytes activés/hématies de 1/5 et une incubation à 37°C de 90 minutes. HnS : hématies non sensibilisées, H-P1 : hématies sensibilisées avec le polyclonal anti-D P1.

1.8.5. Essai de phagocytose en milieu DMEM sans SVF

Les tests d'ADCC et de phagocytose n'ont pu être réalisés simultanément au sein d'un même test pour deux raisons : 1- le SVF interfère avec la coloration au DAF (voir Résultats B-1.2.) ; 2- le SVF est indispensable au bon déroulement de la phagocytose. En effet,

des essais réalisés avec un milieu d'incubation sans SVF ont montré que les cellules effectrices n'étaient pas capables d'induire une phagocytose. Il apparaît nettement que les résultats de phagocytose obtenus sans SVF pour les Ac monoclonaux AD1 et AD3 et le polyclonal anti-D P1 ne sont pas très différents de ceux des témoins négatifs (figure R14).

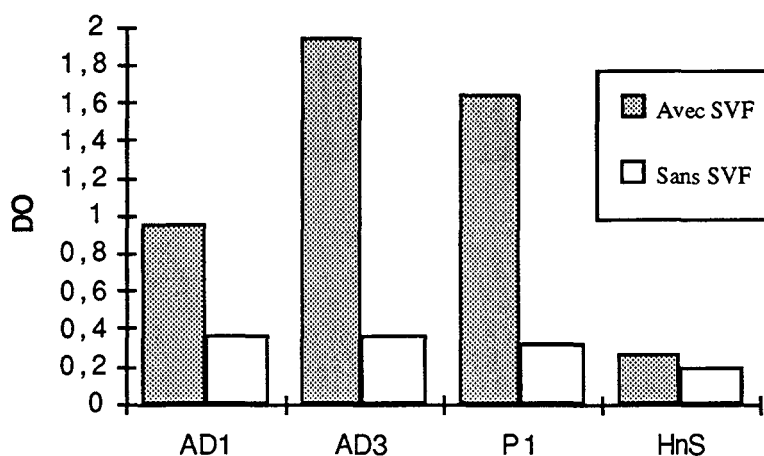


Figure R.14 : test de phagocytose avec les Acm AD1, AD3 et le polyclonal anti-D P1. Les Ac ont été testés en parallèle dans un milieu DMEM avec ou sans SVF. La concentration de sensibilisation était de 500 ng/ml. HnS : hématies non sensibilisées.

1.9. Etude de la stabilité de la solution mère de DAF en test d'ADCC

Pour déterminer la stabilité de la solution mère de DAF, une coloration a été réalisée au cours d'un test d'ADCC avec une solution mère conservée 5 semaines à +4°C. Les résultats obtenus ont été identiques à ceux réalisés avec une solution mère fraîchement préparée (figure R.15). Il a donc été fixé une péremption d'un mois pour la solution mère de DAF dans un conditionnement à l'abri de la lumière et une conservation à +4°C.

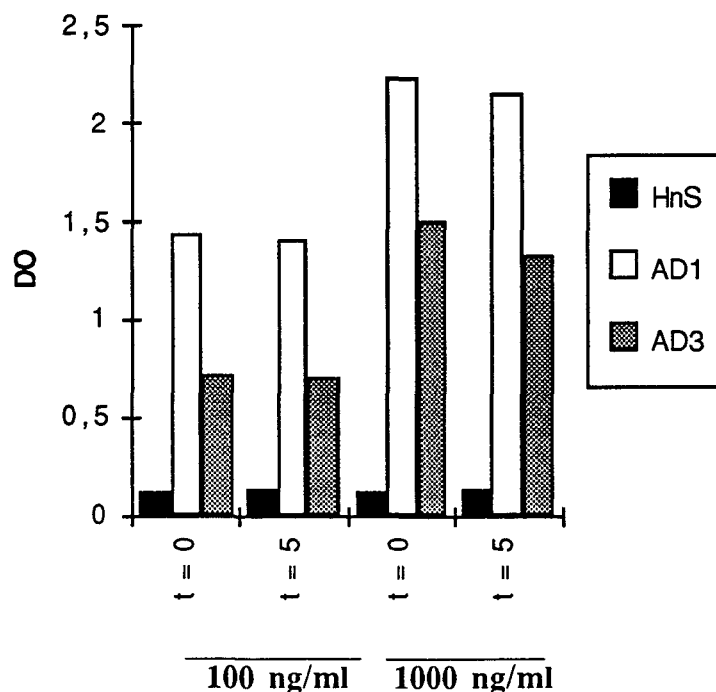


Figure R.15 : étude de stabilité de la solution mère de DAF en test d'ADCC après 5 semaines de conservation. Le ratio cellules mononucléées/hématies était de 1/5 et les concentrations de sensibilisation des Acm anti-D AD1 et AD3 étaient de 100 et 1 000 ng/ml. HnS : hématies non sensibilisées, t = 0 : solution de DAF fraîchement préparée, t = 5 : solution de DAF conservée 5 semaines.

2. Quantification du nombre d'hématies par coloration au DAF

Des essais de quantification du nombre d'hématies présentes dans une suspension ont été réalisés avec la technique DAF. Pour cela, il a fallu s'assurer de la concordance entre la quantité d'hémoglobine dosée et le nombre d'hématies lysées. De façon à standardiser le test, des solutions standards d'hémoglobine ont été préparées.

2.1. Existe-t-il une corrélation entre la quantité d'hématies et les valeurs de DO après coloration au DAF ?

L'oxydation du DAF en bleu de fluorène étant basée sur l'activité pseudo-péroxydasique de l'hémoglobine, il devait être possible d'envisager une quantification du nombre d'hématies dans une suspension compte tenu du fait que chaque hématie doit contenir une même quantité d'hémoglobine. Pour cela, une gamme étalon a été mise au point en lysant une quantité connue d'hématies (après comptage sur cellule de Mallassez), puis en effectuant la coloration au DAF sur différentes dilutions de ces lysats. Les résultats de la figure R.16

montrent l'obtention d'une parfaite linéarité (coefficient de corrélation de 0,999) entre les valeurs de DO obtenues après lyse de différentes quantités connues d'hématies allant de 10^4 à 10^5 cellules avec des valeurs de DO ne dépassant pas 2,5.

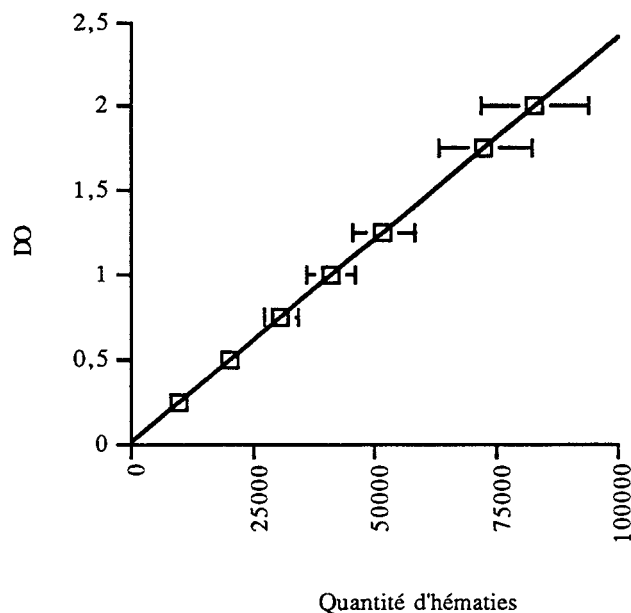


Figure R.16 : quantification du nombre d'hématies par coloration au DAF. Le comptage des hématies a été réalisé sur cellule de Mallassez. Après lyse de celles-ci, une lecture au DAF a été effectuée en incubant pendant 3 min 100 μ l de la solution de DAF avec 100 μ l des différentes dilutions de lysat. Chaque point représente la moyenne de 12 valeurs.

2.2. Etude de la stabilité de solutions standards d'hémoglobine

Pour des raisons pratiques d'utilisation, des essais de conservation de différentes solutions d'hémoglobine provenant de quantités connues d'hématies ont été réalisés à $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C et -80°C .

Une première série de tests avait montré que des solutions d'hématies lysées étaient instables après 5 heures aussi bien à température ambiante qu'à 37°C , alors qu'à $+4^{\circ}\text{C}$ la stabilité semblait correcte (figure R.17A). Toutefois, une étude de stabilité à $+4^{\circ}\text{C}$ a montré une baisse des valeurs en fonction du temps (figure R.17B). Un essai de conservation des différentes solutions à -20°C n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants (figure R.17C) alors qu'avec une congélation à -80°C , il a été possible de garder pendant au moins 30 jours les solutions d'hémoglobine (coefficient de corrélation de 0,998) (figure R.17D). Cette étude a confirmé que les conservations réalisées à $+4^{\circ}\text{C}$ et à -20°C ne permettaient pas de maintenir les

solutions d'hémoglobine dans de bonnes conditions. La température de -80°C a donc été choisie pour la suite des études.

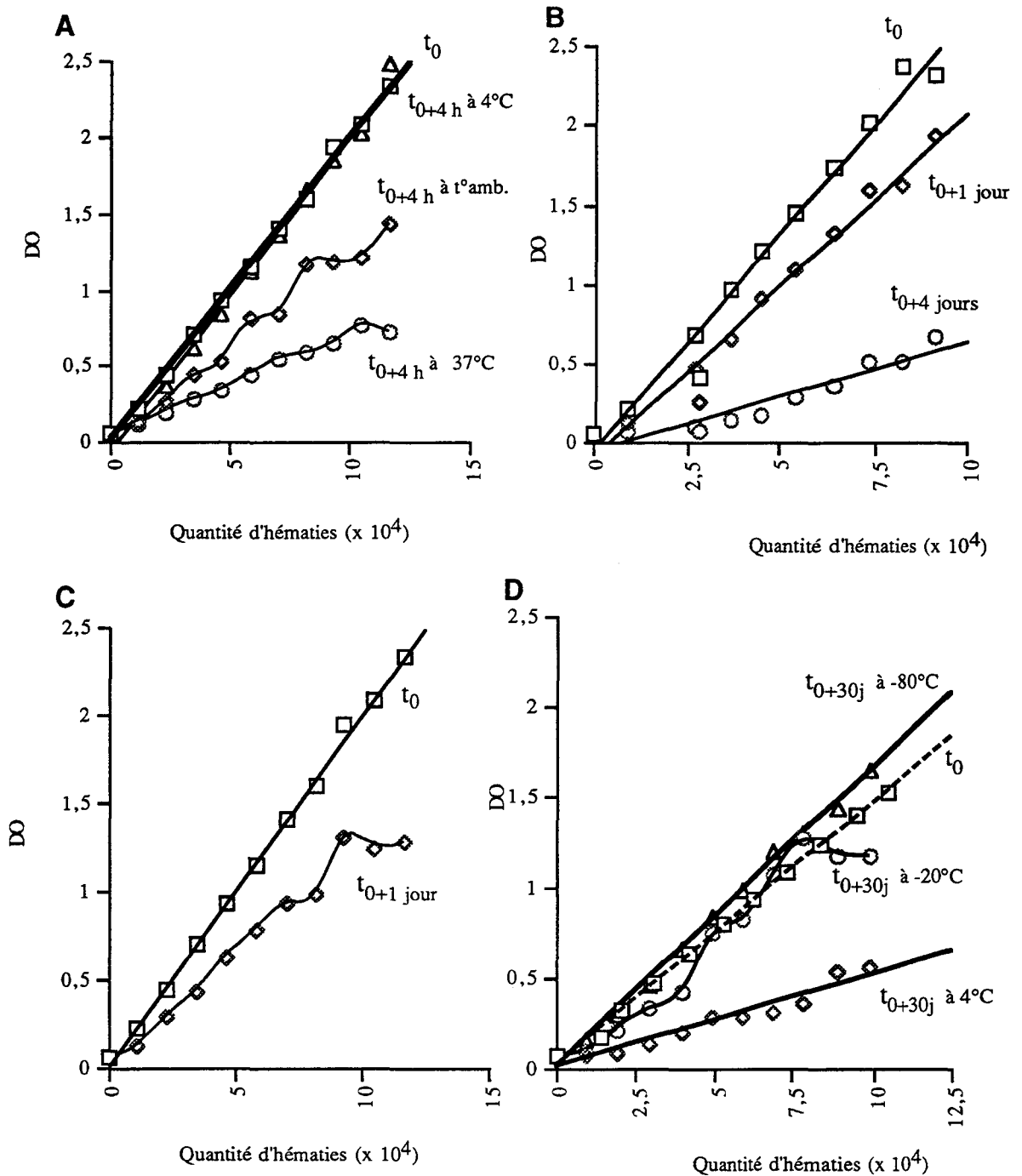


Figure R.17 : étude de la stabilité de diverses solutions d'hémoglobine. Les conservations ont été réalisées pendant 4 heures à $+4^{\circ}\text{C}$, à température ambiante et à 37°C (A) ; stabilité après 1 et 4 jours à $+4^{\circ}\text{C}$ (B) ; stabilité après 1 journée à -20°C (C) ; stabilité après 30 jours à $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C et -80°C (D). t_0 = mesures effectuées au temps 0.

3. Mise au point du test SOL-ELISA

3.1. Quantification du taux d'anti-D fixés sur les globules rouges

La technique Sol-ELISA a été développée à partir du protocole décrit par Kumpel *et al* (Kumpel, 1990c). Un essai a été réalisé avec des IgG polyvalentes pour vérifier l'absence de fixation aspécifique d'Ig sur les hématies. Une concentration 500 fois plus élevée d'Ig polyvalentes a été utilisée compte tenu du taux d'IgG dans les anti-D polyclonaux. Les résultats de la figure R.18 montrent clairement une absence de fixation des Ig polyvalentes sur les hématies quelles que soient les concentrations testées (de 50 à 500 $\mu\text{g/ml}$ d'Ig polyvalentes). Par contre, avec l'anti-D polyclonal P1, la fixation d'anti-D sur les hématies est proportionnelle à la concentration de sensibilisation utilisée (de 0,1 à 1 $\mu\text{g/ml}$) jusqu'à une certaine concentration de sensibilisation. Les résultats sont exprimés en quantité d'IgG anti-D fixées dosées par ELISA (voir M.M. A-4.4.1.).

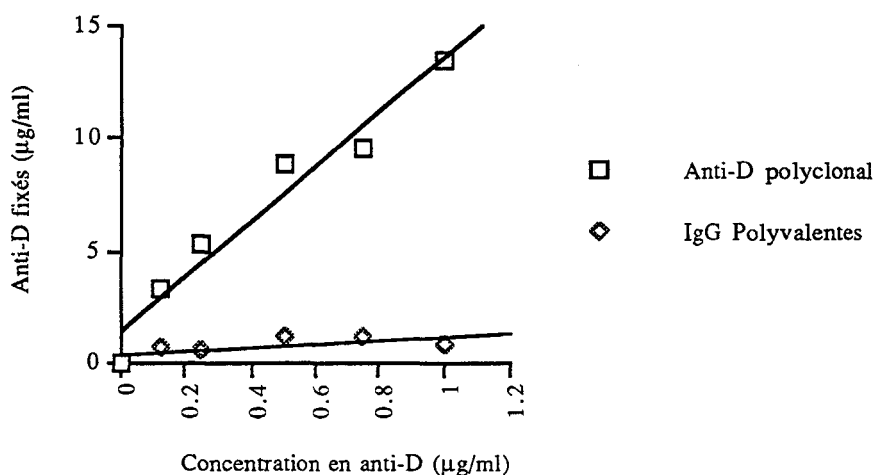


Figure R.18 : test Sol-ELISA réalisé avec le polyclonal anti-D P1 à différentes concentrations de sensibilisation. La concentration des IgG polyvalentes peut-être obtenue en multipliant la concentration des anti-D par 500.

Pour contrôler la variabilité des résultats qui pourrait être due aux prélèvements des 20 μl de culot d'hématies ainsi qu'aux différentes dilutions effectuées, un comptage des hématies a été réalisé avec 44 échantillons. Pour cela, les échantillons ont été lysés et dilués comme pour un test Sol-ELISA. L'estimation de la quantité d'hématies présentes dans la dernière dilution a été réalisée, après coloration au DAF, par rapport à une gamme d'hémoglobine (voir Résultats B-2). Ainsi, une moyenne de $79,5 \cdot 10^6 \pm 3,3 \cdot 10^6$ hématies a été trouvée dans les différents échantillons, ce qui fait une variation de 4,2%.

Un test Sol-ELISA avec l'anti-D polyclonal P1 a été réalisé aux concentrations de 100 et 500 ng/ml. Parallèlement, et de la même façon que précédemment, une quantification des hématies a été effectuée. Les résultats du tableau R.6 ont été exprimés d'une part en quantité d'Ac dosée par ELISA et d'autre part en quantité d'Ac fixée sur 10^6 hématies. Les variations obtenues entre ces deux séries de tests sont faibles (tableau R.6). Avec l'anti-D polyclonal utilisé à 500ng/ml, il est possible de fixer en moyenne 4,3 μ g/ml d'anti-D, c'est à dire environ quatre fois plus qu'avec 100 ng/ml (1,2 μ g/ml).

Concentrations de sensibilisation	Anti-D fixés (μ g/ml)	Résultats exprimés en ng/ 10^6 hématies
500 ng/ml	4,35	53.03
	4.33	53.18
100 ng/ml	1.2	14.91
	1.16	15.27

Tableau R.6 : Sol-ELISA avec 2 concentrations de sensibilisation pour le polyclonal anti-D P7 (500 et 100 ng/ml). Les valeurs des anti-D fixés correspondent à la valeur obtenue par Sol-ELISA multipliée par le facteur de dilution et les résultats de la troisième colonne correspondent aux valeurs d'anti-D fixés rapportées à 10^6 d'hématies.

Une étude de la répétabilité du test Sol-ELISA a été réalisée avec l'Ac polyclonal anti-D P1 en effectuant 6 tests le même jour et dans les mêmes conditions expérimentales aux concentrations de sensibilisation de 50, 250 et 500 ng/ml. Les résultats de la figure R.19A montrent un taux de fixation identique avec des coefficients de variation sur la moyenne assez faibles de 5,7%, 4,2% et 5,4% respectivement pour les concentrations de sensibilisation de 50, 250 et 500 ng/ml. Cette étude a donc permis de montrer la répétabilité de la technique.

De plus, les résultats de la figure R.19B montrent, qu'avec des hématies d'un même donneur, mais avec des tests réalisés à des jours différents, il y a, sur une moyenne de 3 tests, un taux de fixation identique du polyclonal sur les hématies avec des coefficients de variation sur la moyenne de 15% pour la concentration de sensibilisation de 75 ng/ml, 7% pour 150 ng/ml, 10% pour 250 ng/ml, 3% pour 350 ng/ml et 9% pour 500 ng/ml. La reproductibilité du test est donc correcte.

Par contre, lorsque la fixation du polyclonal est effectuée sur des hématies provenant de 5 donneurs différents lors de 5 tests Sol-ELISA, une variation du taux d'Ac fixés entre les tests a été observée (figure R.19C). En effet, les coefficients de variation sur la moyenne de ces

5 tests aux concentrations de sensibilisation de 50, 250 et 500 ng/ml étaient relativement élevés, respectivement à 35, 35 et 31%.

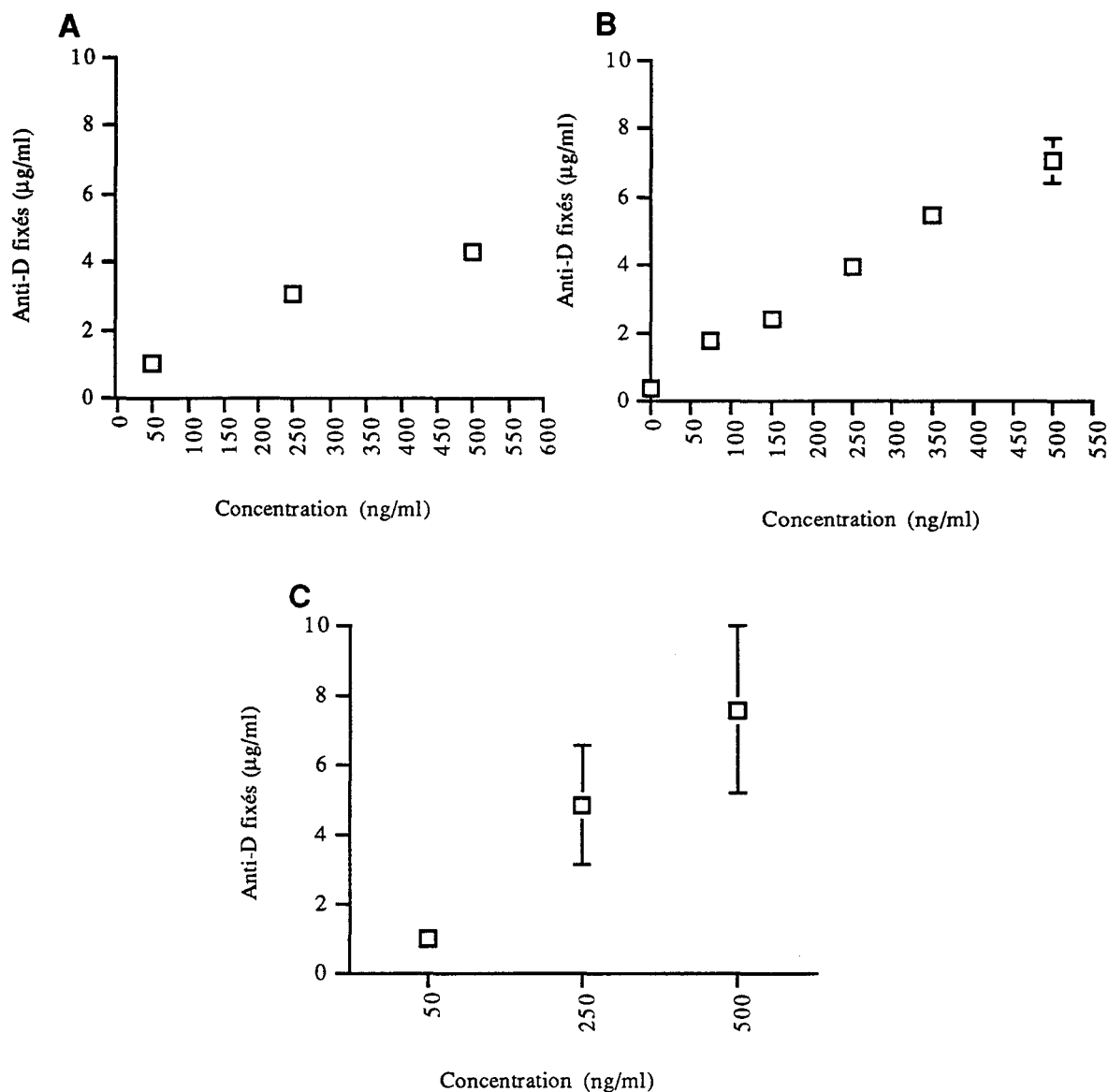


Figure R.19 : étude de la répétabilité et de la reproductibilité du test Sol-ELISA. **A :** moyenne de 6 tests Sol-ELISA à des concentrations de sensibilisation de 50, 250 et 500 ng/ml (les écarts-types n'étaient pas significatifs) réalisés dans les mêmes conditions expérimentales et le même jour ; **B :** synthèse de 3 tests Sol-ELISA réalisés à des jours différents mais avec des hématies du même donneur. Les concentrations de sensibilisation étaient de 0, 75, 150, 250, 350 et 500 ng/ml ; **C :** synthèse de 5 tests Sol-ELISA réalisés sur 5 donneurs d'hématies différents et des concentrations de sensibilisation de 50, 250 et 500 ng/ml. L'ensemble des tests ont été effectués avec l'Ac polyclonal anti-D P1 et le standard ELISA utilisé était le poly-G.

A noter, toutefois, qu'une linéarité a toujours été retrouvée pour chaque donneur d'hématies lorsque la sensibilisation se situait dans la gamme de concentration entre 0 et 500 ng/ml.

Le test Sol-ELISA constitue donc une technique sensible et fiable pour mesurer la quantité d'anticorps polyclonal anti-D fixés sur les hématies.

Un test Sol-ELISA a également été réalisé avec des Ac monoclonaux anti-D. Les résultats de la figure R.20 montrent la possibilité de quantifier le taux d'IgG fixés sur les hématies lorsque les Acm sont utilisés. Une étude plus précise des différences de fixation entre les Acm sera présentée ultérieurement.

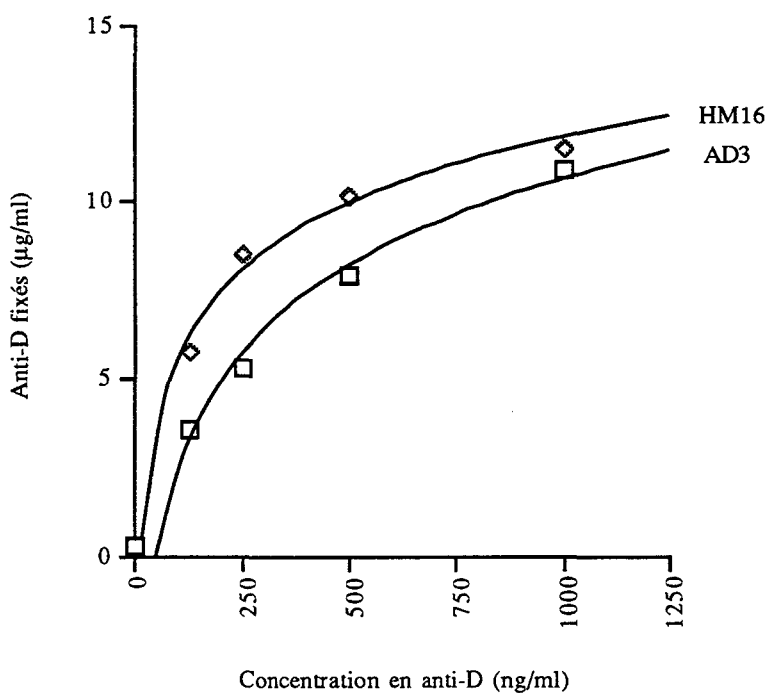


Figure R.20 : Sol-ELISA avec les Ac monoclonaux anti-D AD3 et HM16. Les concentrations de sensibilisation étaient de 125, 250, 500 et 1000 ng/ml.

3.2. Détermination de la concentration spécifique en Ac anti-D par Sol-ELISA

Il a été possible de réaliser, avec le test Sol-ELISA, des dosages spécifiques en anti-D pour des échantillons d'Ac polyclonaux. Pour cela, il avait été envisagé de comparer les quantités d'anti-D fixés sur les hématies déterminées en Sol-ELISA après sensibilisation des hématies par ces échantillons par rapport à des sensibilisations étalons.

3.2.1. Obtention de la linéarité pour la gamme étalon

Des hématies ont été sensibilisées avec l'Ac polyclonal anti-D P1, choisi comme standard et estimé à la concentration de 50 µg/ml. Une droite de régression avec un

coefficient de corrélation proche de 1 a été construite à partir des valeurs d'anti-D fixés obtenues pour les échantillons en fonction de la concentration des sensibilisations étalons. Ce coefficient de corrélation était généralement obtenue pour des sensibilisations comprises dans la gamme de concentration de 0 et 500 - 750 ng/ml. L'exemple ci-dessous (figure R.21) montre un coefficient de corrélation de 0,997 pour les valeurs d'anti-D fixés obtenues aux concentrations de sensibilisation de 0 ; 75 ; 150 ; 250 ; 350 et 500 ng/ml.

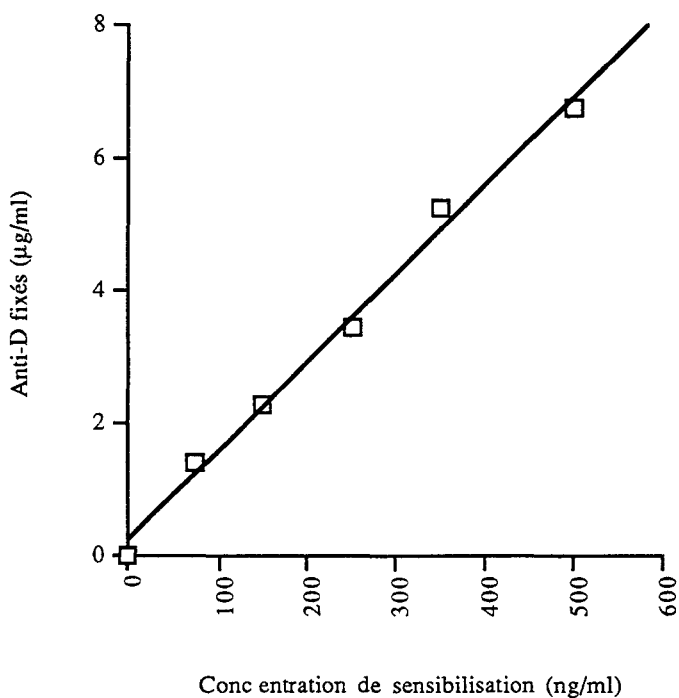


Figure R.21 : Sol-ELISA à partir d'hématies sensibilisées avec l'Ac polyclonal anti-D P1. Les concentrations de sensibilisation étaient de 0 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 350 et 500 ng/ml.

Il avait été précédemment montré que les IgG polyvalentes n'interféraient pas dans la fixation des Ac anti-D sur la membrane des globules rouges (voir partie B-3). La quantification des IgG fixées sur les hématies pour des échantillons de concentrations inconnues était, par conséquent, spécifique aux Ac anti-D. Il était donc possible, en référence à la gamme étalon, de déterminer la concentration de ces échantillons.

3.2.2. Détermination de la concentration - comparaison avec la technique autoanalyseur

Plusieurs lots d'Ac polyclonaux anti-D en provenance de la production du LFB de Lille ont été dosées en anti-D spécifique par la technique Sol-ELISA. Parallèlement, ces

mêmes échantillons ont été dosés par la technique autoanalyseur. Les résultats de la figure R.22 montrent la comparaison des résultats obtenus par les deux techniques. La première série de résultats a donné, pour des concentrations inférieures à 50 µg/ml, une corrélation entre les deux techniques de 0,945 (figure R.22A). Une deuxième série de résultats a donné, quant à elle, pour des concentration supérieures à 50 µg/ml, une corrélation entre les deux techniques de 0,889 (figure R.22B).

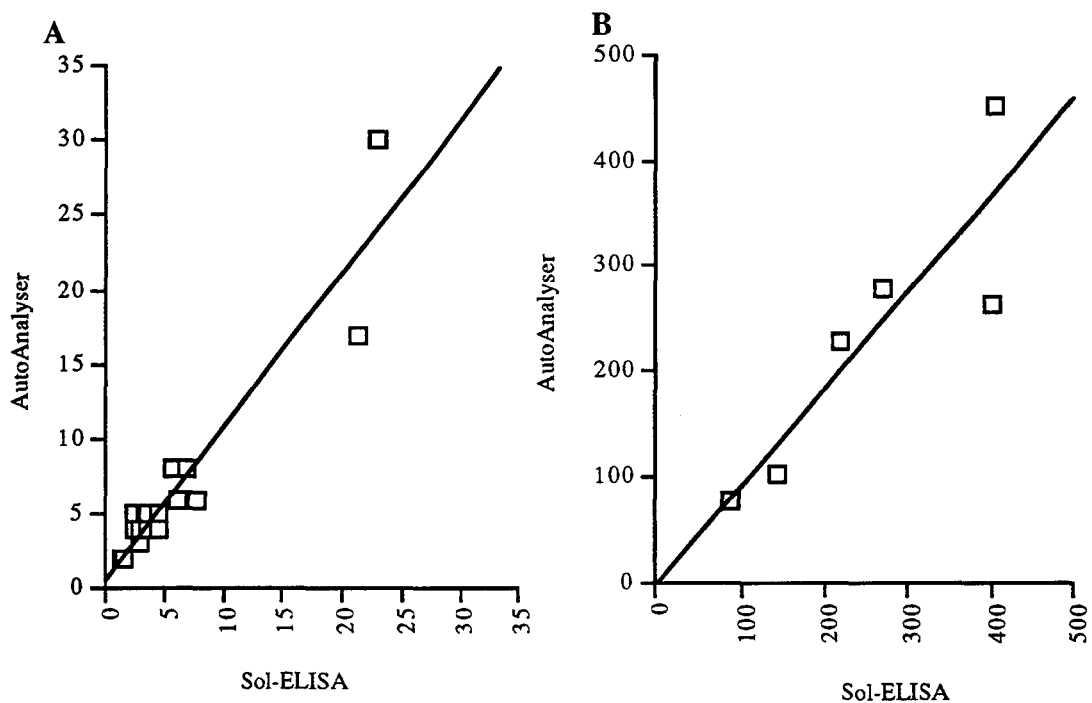


Figure R.22 : comparaison des dosages obtenus en Sol-ELISA et en autoanalyseur. Une distinction a été réalisée pour les dosages dont les concentrations sont inférieures à 50 µg/ml (A) de celles supérieures à 50 µg/ml (B). Les dosages pour les deux techniques ont été exprimés en µg/ml.

4. Mise au point du test d'activation du complément par les Ac

4.1. Obtention et dosage du complément

Le complément obtenu à partir du sang artériel de lapin avait donné un sérum très hémolysé après rétraction du caillot et n'était, par conséquent, pas utilisable en test DAF en raison de la quantité importante d'hémoglobine libre. Par contre, le sérum de lapin issu du sang veineux était non hémolysé et a donc pu être testé.

Des préparations de complément humain ont été faites à partir de sérums de donneurs de groupe sanguin AB⁺. Un dosage de l'activité complément a été réalisé sur les 4 préparations. Les résultats suivants ont été obtenus (valeurs normales entre 400 et 600 unités) :

- première poche : 530 unités de lyse à 50%
- deuxième poche : 515 unités de lyse à 50%
- troisième poche : 575 unités de lyse à 50%
- quatrième poche : 550 unités de lyse à 50%

4.2. Test de "Fruitstone"

Le test de "Fruitstone" permet d'obtenir une activation du complément sérique au moins jusqu'au stade C_{3b}, en présence d'EDTA notamment et de Mg²⁺. Ce test a été réalisé pour vérifier la capacité d'un Ac anti-C_{3d} à agglutiner des hématies présentant la fraction C_{3b} à leur surface. Des hématies ont donc été traitées selon la technique "fruitstone" et incubées avec de l'anti-C_{3d}. L'agglutination des hématies ainsi traitées montre bien la présence de C_{3b} sur la membrane, formé par activation du complément humain. Par contre, les résultats sont ininterprétables avec le sérum de lapin qui possède des Ac naturels anti-hématies humaines (tableau R.7).

	Sérum AB	Sérum de lapin
Hématies	-	+++
Hématies + anti-C _{3d}	++	NT

Tableau R.7 : test de "Fruitstone" sur hématies humaines à partir des deux types de sérums (humain et lapin), suivi d'une agglutination avec un anti-C_{3d}. NT : non testé.

4.3. Test d'activation du complément par l'Ac anti-Jk^b

Pour valider le test d'activation du complément humain par des Ac, un contrôle positif a été réalisé avec un Ac monoclonal humain anti-Jk^b (CRTS - Rennes ; Lecointre-Coatmelec, 1991). Ce type d'Ac est connu pour activer *in vivo* le complément. Pour cela, des hématies Jk^{b+} ont été sensibilisées avec l'anti-Jk^b et incubées en présence de complément humain. Une agglutination a pu être obtenue par l'Ac anti-C_{3d} (tableau R.8). En raison de la nature IgM de l'anti-Jk^b, une légère agglutination des hématies Jk^{b+} a été observée en l'absence de sérum humain.

	Sans sérum	Avec sérum
HnS	-	-
H-anti Jk ^b	+/-	++

Tableau R.8 : test d'agglutination avec l'Ac anti-Jk^b sur hématies humaines de groupe 0 R_{1r} Jk^{b+} par agglutination à l'anti-C_{3d}. H : hématies.

PARTIE C

Etude de la réactivité des Ac polyclonaux et monoclonaux anti-D sur les hématies

Le premier phénomène intervenant au cours de la prévention de la MHNN est la fixation des Ac anti-D sur la membrane des globules rouges. La reconnaissance des hématies Rh(D) positif par les Ac anti-D est donc le premier paramètre qui doit être étudié. Deux caractéristiques essentielles sont impliquées dans la reconnaissance Ag-Ac : la spécificité et l'affinité des Ac.

Avant d'étudier les différents Acm anti-D, une étude détaillée de la réactivité des Ac polyclonaux anti-D a été réalisée, ces Ac constituant la référence pour tous les tests effectués.

1. Etude de la réactivité des Ac polyclonaux anti-D

1.1. Etude en test Sol-ELISA

La quantification du taux d'IgG fixées après sensibilisation des globules rouges avec le polyclonal anti-D P1 a été réalisée en test Sol-ELISA.

Les résultats de la figure R.23 montrent que pour des concentrations de sensibilisation comprises entre 0 et 0,5 $\mu\text{g/ml}$, il est possible d'obtenir une parfaite linéarité avec la quantité d'Ac retrouvée sur les hématies : coefficient de corrélation de 0,997. Cette linéarité a été, par ailleurs, utilisée pour la détermination de la concentration spécifique d'Ac polyclonaux anti-D (voir Partie B-3.2.). Une saturation de la fixation des Ac a été obtenue à partir d'une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ (figure R.23).

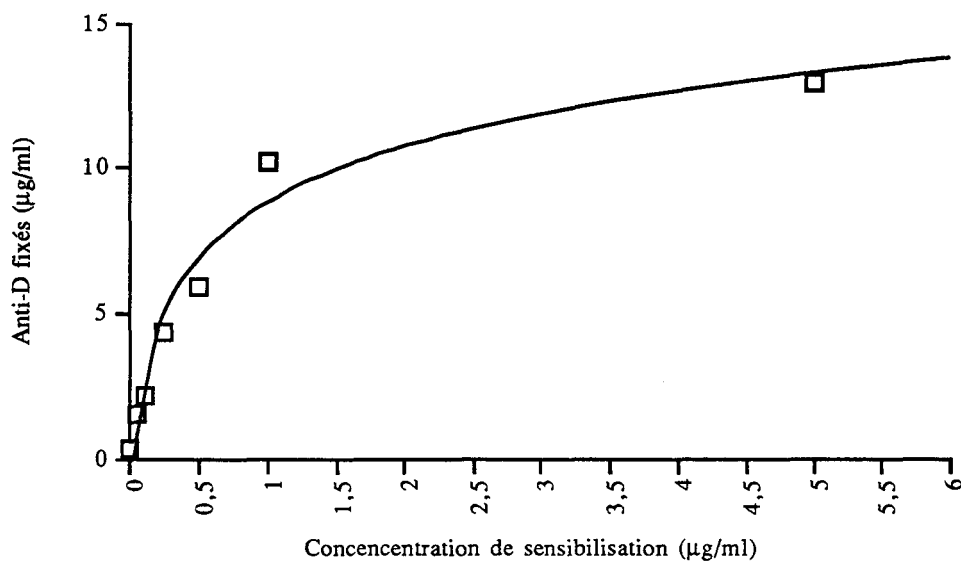


Figure R.23 : étude du taux de fixation des IgG sur les hématies en Sol-ELISA. Le test a été réalisé avec le polyclonal anti-D P1 aux concentrations de sensibilisation de 0 ; 0,06 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 5 µg/ml.

1.2. Etude en cytométrie de flux

Une étude de la fixation de l'Ac polyclonal anti-D P1 sur les hématies a été réalisée en cytométrie.

Les résultats obtenus, concernant la moyenne de fluorescence des hématies marquées par rapport à la concentration de sensibilisation des hématies, sont conformes à ceux obtenus en Sol-ELISA : une linéarité entre les concentrations de sensibilisation de 0 à 0,5 µg/ml et une saturation des sites de fixation de l'Ac anti-D à partir de 1 µg/ml (figure R.24).

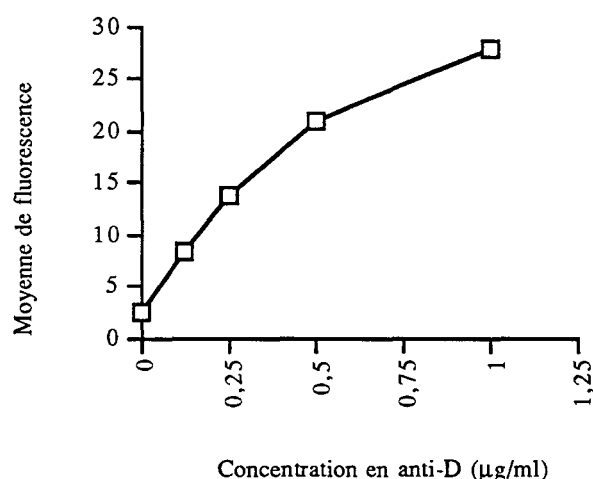


Figure R.24 : étude du taux d'Ac fixés sur les hématies en cytométrie de flux avec le polyclonal anti-D P1. Le marquage fluorescent a été réalisé sur des hématies sensibilisées à différentes concentrations : 0,125 ; 0,250 ; 0,500 et 1 µg/ml. Le pourcentage de cellules marquées était supérieur à 96%. Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence (valeur arbitraire fournie par l'appareil).

Des hématies d'un même donneur ont également été sensibilisées avec trois Ac polyclonaux anti-D (P1, P2 et P4) à la concentration de sensibilisation de 1 $\mu\text{g/ml}$ et observées en cytométrie après un marquage avec une antiglobuline fluorescente.

Les résultats de la figure R.25 montrent des moyennes de fluorescence similaires entre les 3 Ac polyclonaux anti-D (P1 = 53 ; P2 = 58 ; P4 = 49) ainsi que des pourcentages de cellules marquées comparables (95% pour P1 ; 96% pour P2 et 91% pour P4). Une quantité analogue d'anti-D polyclonal a donc été retrouvée sur les hématies après sensibilisation avec les 3 anti-D polyclonaux.

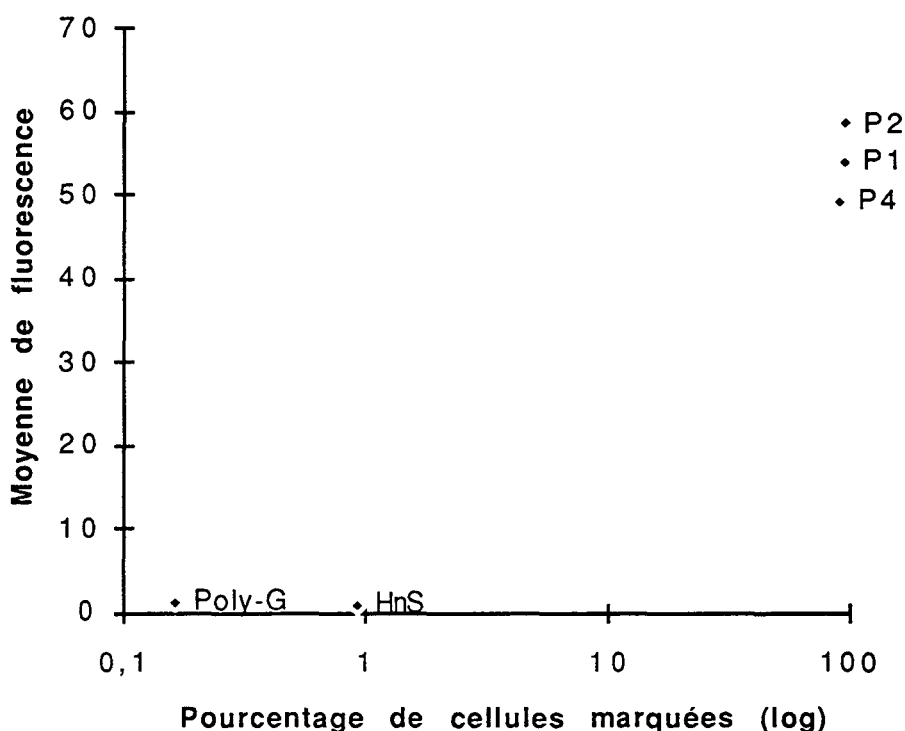


Figure R.25 : étude cytométrique de la sensibilisation avec plusieurs Ac polyclonaux anti-D. Les Ac polyclonaux anti-D P1, P2 et P4 ont été testés à la concentration de sensibilisation de 1 $\mu\text{g/ml}$ ainsi que des Ig polyvalentes (Poly-G) à 500 $\mu\text{g/ml}$ et des hématies non sensibilisées (HnS).

De plus, cette étude a confirmé, que la fixation des Ac anti-D polyclonaux était spécifique de l'Ag D dans la mesure où des hématies sensibilisées avec des IgG polyvalentes (poly-G), à un ratio 1 Ac anti-D/500 IgG polyvalentes, n'ont donné qu'une très faible fluorescence (moyenne de fluorescence de 1,2). Cette valeur est comparable à celle obtenue avec des hématies non sensibilisées (moyenne de fluorescence de 1,0).

2. Etude de la réactivité des Ac monoclonaux anti-D

2.1. Détermination de la quantité d'anti-D fixés sur les globules rouges

2.1.1. Différences de fixation des Ac sur l'antigène D en fonction du donneur d'hématies

Une étude réalisée en cytométrie a montré d'importantes variations dans le marquage des hématies en fonction du donneur de globules rouges (figure R.26). En effet, le marquage est relativement faible avec les 2 premières suspensions d'hématies (tests n° 1 et 2) avec une moyenne de fluorescence entre 3 et 6 alors que les hématies du troisième donneur sont fortement marquées (test n°3) avec une moyenne de fluorescence entre 5 et 20.

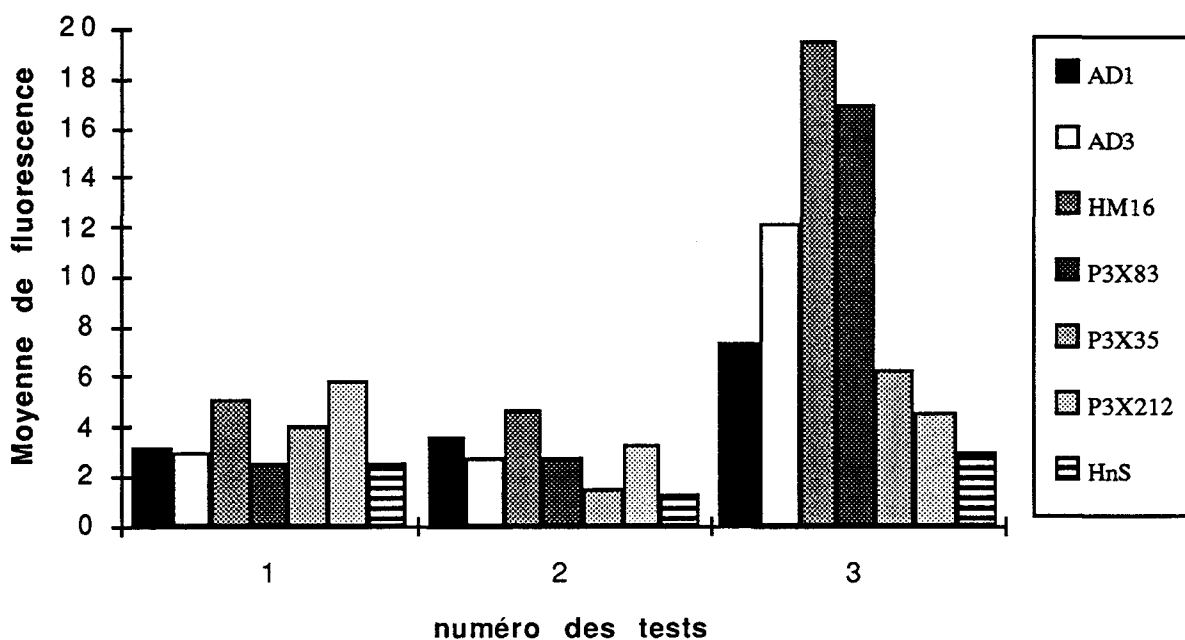


Figure R.26 : résultats de cytométrie de flux pour trois séries de marquage d'hématies, de 3 donneurs différents (tests n° 1, 2 et 3), sensibilisées avec des anti-D. La sensibilisation des hématies a été réalisée avec les différents Acm anti-D à la concentration de 100 ng/ml et le marquage des anti-D fixés sur les globules rouges a été effectuée avec un Ac anti-IgG humaines marqué au FITC.

2.1.2. Comparaison des quantités d'anti-D fixés sur les globules rouges obtenues avec les Ac monoclonaux anti-D

Une première quantification du taux d'anti-D fixés sur la membrane de globules rouges Rh(D) positif a été réalisée avec la technique Sol-ELISA. Les Ac monoclonaux ont été testés aux concentrations de sensibilisation de 50, 100 et 500 ng/ml.

Les premiers résultats ont montré une bonne répétabilité de la technique. Trois tests ont été réalisés avec les anti-D monoclonaux à la concentration de 100 ng/ml, dans les mêmes

conditions et le même jour. La moyenne de ces 3 résultats a permis de mettre en évidence des coefficients de variation faibles de l'ordre de 5,5% pour l'Ac P3X212 et de 1,8% pour l'Ac AD1.

Par contre, des variations dans les quantités d'anti-D fixés ont été observées lorsque les tests ont été réalisés avec des hématies du même donneur mais à des jours différents (figure R.27A). Les coefficients de variations obtenus sur une moyenne de 3 tests varient de 8% pour l'Ac HM16 à la concentration de 500 ng/ml à 35% pour l'Ac AD1 à la concentration de 50 ng/ml.

Par ailleurs, lorsque les suspensions d'hématies proviennent de donneurs différents, les taux d'anti-D fixés, pour un Ac donné, sont très variables (figure R.27B). Les coefficients de variation obtenus sont très importants, de l'ordre de 110% pour l'Ac AD3 à la concentration de sensibilisation de 50 ng/ml.

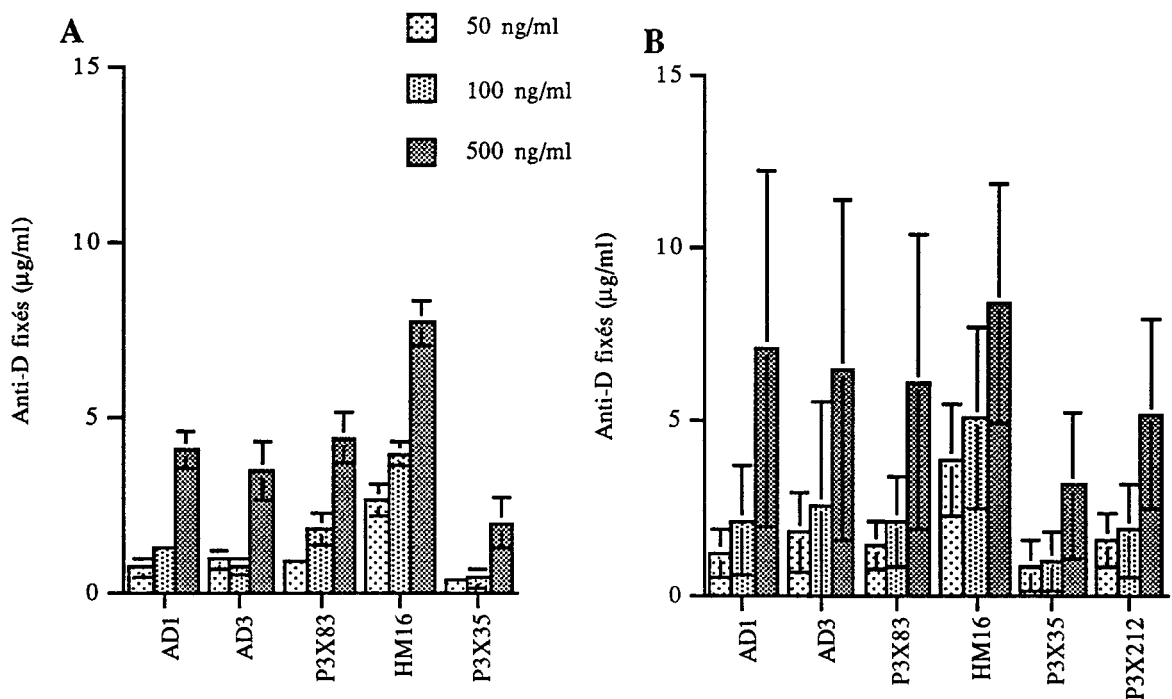


Figure R.27 : étude de la reproductibilité du test Sol-ELISA avec les monoclonaux et comparaison des Acm à différentes concentrations. **A :** synthèse de 3 tests Sol-ELISA réalisés à des jours différents mais avec des hématies du même donneur ; **B :** synthèse de 6 tests Sol-ELISA réalisés avec des hématies de donneurs différents. Le standard ELISA utilisé, pour l'ensemble des tests, était l'Acm AD1.

Ces résultats ont donc permis de mettre en évidence l'existence de variations dans les quantités d'anti-D fixés à la surface des globules rouges en fonction du donneur. Résultats qui confirment ceux obtenus en cytométrie (voir Résultats C-2.1.1.).

D'autres observations peuvent être faites à propos des résultats transcrits à la figure R.27 comme par exemple les taux différents de fixation entre les Acm.

En effet, les résultats de la figure R.27A montrent que la fixation de l'Ac HM16 sur les globules rouges est nettement supérieure aux autres Acm avec des valeurs moyennes de 2,6 µg/ml à la concentration de sensibilisation de 50 ng/ml, de 4 µg/ml à 100 ng/ml et 7,7 µg/ml à la concentration de 500 ng/ml. Les quantités des autres Ac fixés sur les hématies ont toujours été plus faibles avec par exemple : 0,9 µg/ml pour l'Ac AD3 à 50 ng/ml, 1,8 µg/ml et 4,4 µg/ml pour l'Ac P3X83 respectivement à 100 et 500 ng/ml.

Les résultats de la figure R.27B confirment que le taux moyen de fixation est nettement supérieur pour l'Ac HM16 par rapport autres Ac. C'est aux faibles concentrations de sensibilisation que les différences entre l'Ac HM16 et les autres anti-D sont les plus nettes. En particulier, une sensibilisation des hématies avec l'Ac HM16 à la concentration de 50 ng/ml a mis en évidence une fixation à un taux de 3,9 µg/ml d'anti-D alors que les autres Ac étaient fixés à des taux inférieurs à 1,8 µg/ml. Les différences observées entre les Ac sont moins importantes quand les hématies sont sensibilisées à la concentration de 500 ng/ml comme par exemple : 8,4 µg/ml d'anti-D fixés avec l'Ac HM16 et 7,1 µg/ml avec l'Ac AD1. Par contre l'anticorps P3X35 a toujours donné des valeurs plus faibles que les autres anti-D.

A une concentration de sensibilisation plus élevée (1000 ng/ml), une étude cytométrique a montré que les taux d'anti-D fixés sur les globules rouges étaient également très variables entre les Acm.

En effet, avec une même suspension cellulaire, les moyennes de fluorescence obtenues (figure R.28) variaient de 30,6 pour l'Ac AD3 à 67,8 pour l'Ac HM16. D'autre part le pourcentage de cellules marquées était lui aussi très variable avec une valeur de 22% de cellules marquées pour l'Ac AD3 et de 95% pour l'Ac HM16.

De plus, avec des Ac donnant un pourcentage élevé d'hématies marquées (supérieur à 90%), des différences dans les moyennes de fluorescence obtenues ont également été observées : moyenne à 38,3 avec l'Ac AD1 et 67,8 avec l'Ac HM16. Ce dernier Ac marque donc plus fortement les hématies Rh(D) positif.

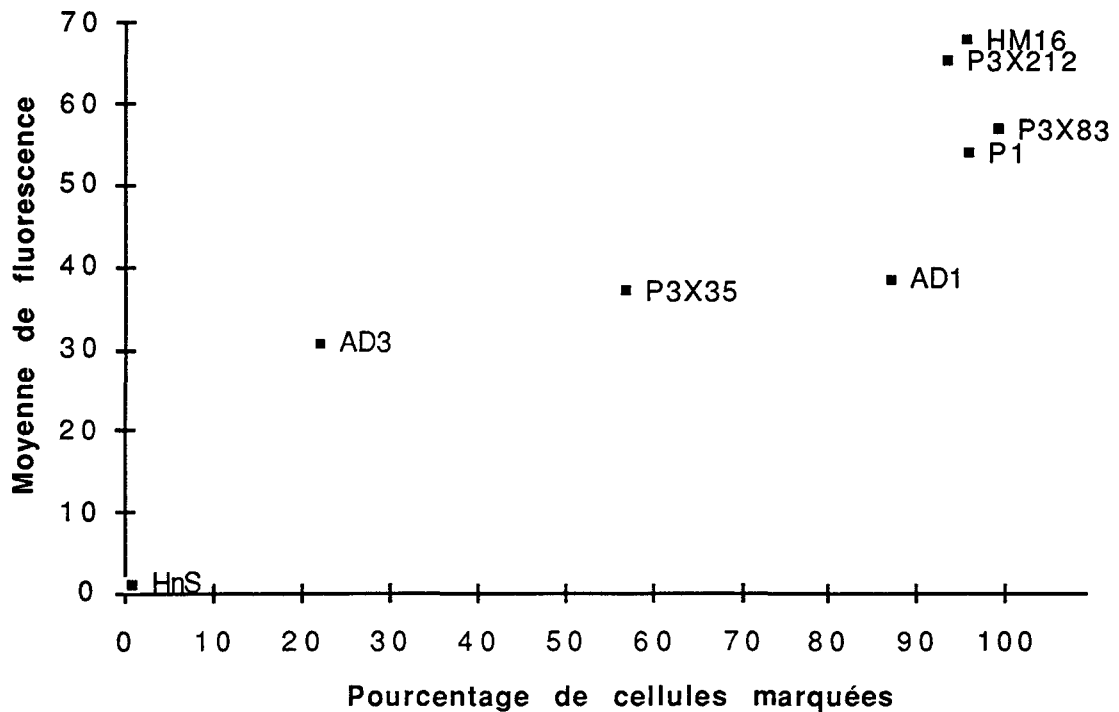


Figure R.28 : observation cytométrique de la sensibilisation des hématies par les Acm anti-D et le polyclonal anti-D P1. La concentration de sensibilisation était de 1 $\mu\text{g/ml}$. HnS : hématies non sensibilisées.

2.2. Etude en test d'agglutination

2.2.1 Test de Coombs indirect

Des tests de Coombs indirect ont été réalisés sur une même suspension d'hématies avec les différents Acm ajustés à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. D'importantes variations des titres et scores ont été obtenues avec des valeurs extrêmes de score allant de 51 pour l'Ac P3X83 à 88 pour l'Ac AD3. Le score élevé observé avec l'Ac AD3 pourrait être dû à la sous-classe IgG3. Parmi les anti-D de sous-classe IgG1, les Ac AD1, P3X35 et HM16 présentent des valeurs de score élevées (tableau R.9).

Ac anti-D	Titre	Score
P1	1024	64
AD1	2048	78
AD3	8192	88
P3X35	1024	78
HM16	2048	78
P3X83	256	51
P3X212	128	55

Tableau R.9 : test d'agglutination en Coombs indirect des différents Acm anti-D et du polyclonal anti-D P1 à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$: expression des titres et scores.

2.2.2. Test d'agglutination après traitement des hématies à la papaïne

Lorsque les hématies sont traitées à la papaïne, les valeurs des titres et des scores sont plus élevées par rapport à ceux présentés précédemment. L'anticorps AD3 reste le plus fort : score de 112. Par contre, les écarts observés entre les anti-D IgG1 sont moins importants : scores entre 93 et 110 (tableau R.10). Les deux Ac P3X35 et P3X83 présentent les scores les plus élevés : 110 et 105 respectivement.

Ac anti-D	Titre	Score
P1	4096	110
AD1	4096	100
AD3	16384	112
P3X35	8192	110
HM16	2048	94
P3X83	8192	105
P3X212	2048	93

Tableau R.10 : test d'agglutination en papaïne des différents Acm anti-D et du polyclonal anti-D P1 à la concentration de 50 µg/ml : expression des titres et scores.

2.2.3. Test d'agglutination sur hématies D partiel

Il est possible par des tests d'agglutination sur hématies D partiel de mieux connaître les épitopes de l'antigène D reconnus par les Acm anti-D. Pour cela, les résultats d'agglutination des différentes catégories d'hématies Rh(D) partiel (Tippett, 1988) doivent être transcrits avec le tableau de correspondance des différents épitopes déjà décrits (Lomas, 1993).

2.2.3.1. Résultats d'agglutination avec les hématies D partiel traitées à la papaïne

Les résultats d'agglutination sur hématies D partiel traitées à la papaïne ont été répertoriés dans le tableau R.11. Une agglutination de la catégorie DVI a été obtenue uniquement avec l'anticorps P3X83 avec un résultat à +++.

Trois autres profils d'agglutination ont été observés. Un profil analogue de reconnaissance est défini par les Ac P3X35 et P3X212. Un autre profil est commun aux 2 Ac AD3 et HM16. Un dernier profil correspond à l'Ac AD1. D'après cette analyse, 4 épitopes différents ont pu être décrits avec les anti-D.

Anti-D	DIII	DIIIa	DIIIc	DIVa	DIVb	DVa	DVb	DVc	DVI	DVII
AD1 ¹	ND	+++	ND	-	-	+++	+++	-	-	+++
AD3 ¹	ND	+++	ND	+++	+++	+++	-	+++	-	+++
P3X35	+++ ²	+++	+++	+++ ²	+++ ²	- ²	- ²	+++	- ²	+++ ²
HM16	+++ ²	+++	+++	+++ ²	+++ ²	+++ ²	- ²	+++	- ²	+++ ²
P3X83	ND	+++	+++	+	ND	+++	ND	-	+++	+++
P3X212	ND	+++	+++	+++	ND	-	ND	+++	-	+++

Tableau R.11 : résultats d'agglutination des Acm anti-D sur hématies D partiel traitées à la papaïne. Les annotations 1 et 2 correspondent respectivement à des résultats inscrits dans le Brevet 92 07 893 (voir références) et la fiche technique du kit D-Screen (Diagast-Laboratoires). ND : non déterminé.

2.2.3.2. Résultats d'agglutination avec les hématies D partiel en réaction de Coombs indirect

Les Acm P3X83 et P3X212 ont été testés en agglutination sur hématies D partiel au laboratoire d'Immunologie Erythrocytaire de l'ETS de Lille. Les résultats ont été répertoriés dans le tableau R.12. L'agglutination observée précédemment pour P3X83 avec la catégorie DVI n'a pas été aussi clairement démontrée lors de ce test avec un résultat d'agglutination faible (+ ou -).

Anti-D	DIIIb	DIIIc	DIV	DIVb	DVa	DVI	DVII
P3X83	+++	+++	-	-	+++	- ou +	+++
P3X212	+++	+++	+++	++	-	-	++

Tableau R.12 : résultats d'agglutination en Coombs indirect par des Acm anti-D sur hématies D partiel pour les Acm P3X83 et P3X212.

2.2.3.3. Epitopes reconnus par les Acm anti-D

Avec les résultats d'agglutination précédemment cités et d'après le tableau de correspondance présenté dans l'article de Lomas *et al.* (Lomas, 1993) (voir tableau I.5 - Introduction 1.5.2.), il a été possible de préciser l'épitope reconnu par tous les Acm anti-D (tableau R.13) à l'exception de l'Ac P3X83 pour qui l'ambiguïté porte sur les épitopes 3 ou 4 de l'antigène D. Les anticorps AD3 et HM16 reconnaissent l'épitope 6/7 ; les anticorps P3X35 et P3X212 l'épitope 5 et l'anticorps AD1 l'épitope 2.

Anti-D	Epitopes
AD1	2
AD3	6/7
P3X35	5
HM 16	6/7
P3X83	3 ou 4
P3X212	5

Tableau R.13 : tableau récapitulatif des épitopes reconnus par les Acm anti-D.

PARTIE D**Etude de l'activité fonctionnelle des Ac polyclonaux et monoclonaux anti-D**

Une fois fixés sur la membrane des globules rouges, les Ac anti-D peuvent induire différentes activités fonctionnelles telles que, par exemple, la lyse extra-cellulaire et la phagocytose d'hématies Rh(D) positif sensibilisées.

L'étude présentée dans cette partie du travail a pour but, tout d'abord, de caractériser l'activité fonctionnelle des Ac polyclonaux anti-D qui seront utilisés comme référence. Les propriétés fonctionnelles des Ac monoclonaux seront ensuite analysées et comparées dans le but de définir quelques critères de sélection en vue d'une application thérapeutique.

1. Activité biologique des Ac polyclonaux anti-D

1.1. Etude en test d'ADCC

1.1.1. Evaluation d'Ac polyclonaux et de sérums anti-D

Six Ac polyclonaux anti-D ont été évalués en test d'ADCC en présence de cellules mononucléées et de monocytes activés par adhérence.

Testés à la concentration de 500 ng/ml, les 5 Ac anti-D polyclonaux ont été capables d'induire une lyse comparable à celle obtenue avec l'Ac polyclonal anti-D P1 aussi bien lorsque les cellules effectrices sont des cellules mononucléées ou des monocytes activés (figure R.29). En effet, les pourcentages d'activité obtenus (calculés en fonction des résultats obtenus pour P1) étaient : P2 = 102%, P3 = 109%, P4 = 93%, P5 = 90% et P6 = 112% dans le tests d'ADCC sur cellules mononucléées et P2 = 101%, P3 = 104%, P4 = 100%, P5 = 96% et P6 = 105% pour le test d'ADCC sur monocytes activés par adhérence. Les variations observées entre les différentes manipulations ne sont pas significatives.

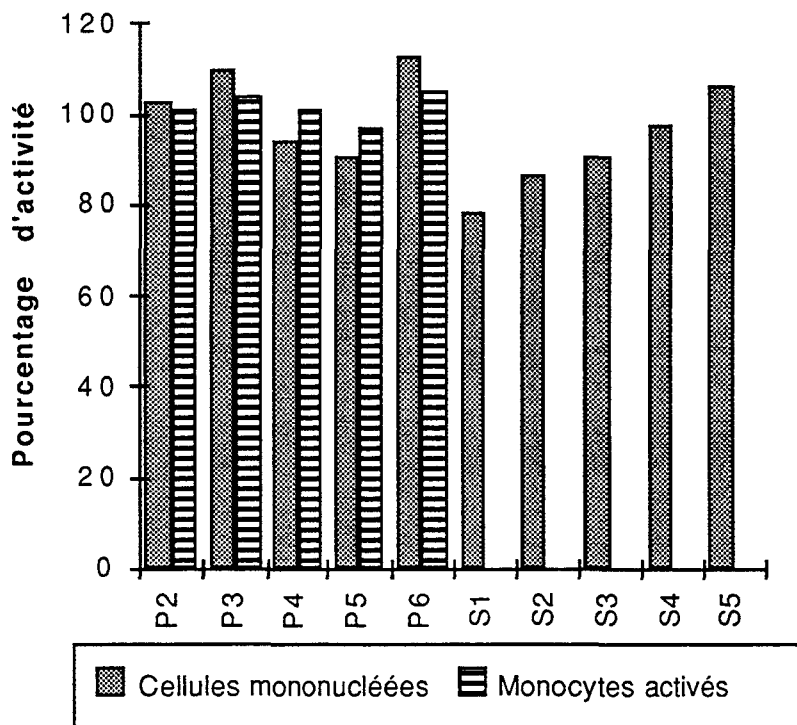


Figure R.29 : tests d'ADCC avec des cellules mononucléées comme cellules effectrices pour les Ac polyclonaux et les sérums anti-D et avec des monocytes activés par adhérence pour les Ac polyclonaux. La sensibilisation des hématies a été réalisée avec les Ac polyclonaux P1, P2, P3, P4, P5 et P6 et avec les sérums riches en anti-D S1, S2, S3, S4 et S5, le tout à la concentration de 500 ng/ml. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la valeur obtenue pour P1.

Une évaluation de 5 sérums riches en anti-D a également été réalisée en test d'ADCC sur cellules mononucléées, aux concentrations de sensibilisation de 100 ng/ml et 500 ng/ml.

Les résultats obtenus (figures R.29 et R.30), exprimés en pourcentage par rapport à la valeur de lyse du polyclonal anti-D P1, ont montré des variations significatives en ADCC entre les sérums, aussi bien à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml (figure R.30) qu'à celle de 500 ng/ml (figure R.29). En effet, les pourcentages d'activité obtenus à 100 ng/ml variaient de 78% pour S1 à 106% pour S5 et à la concentration de 500 ng/ml, les valeurs allaient de 113,6% pour S1 à 174,56% pour S5.

Par rapport au polyclonal P1, les 5 sérums, utilisés à la concentration de sensibilisation de 500 ng/ml, présentaient une activité globalement inférieure alors qu'avec une concentration de 100 ng/ml, l'activité ADCC induite par les sérums était toujours plus élevée.

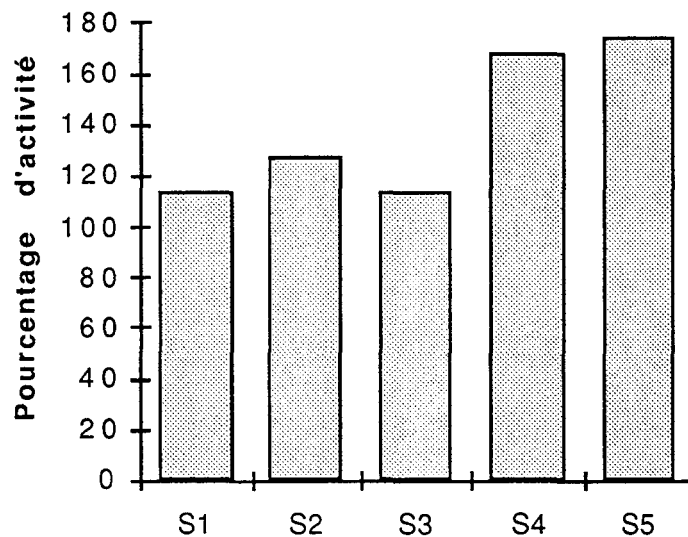


Figure R.30 : tests d'ADCC sur cellules mononucléées avec les 5 sérums riches en anti-D. Les hématies ont été sensibilisées à la concentration de 100 ng/ml avec les sérums de S1 à S5 et avec le polyclonal anti-D P1. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la valeur obtenue pour P1.

1.1.2. Etude cinétique de l'ADCC avec les Ac polyclonaux anti-D et les sérums

Une étude cinétique a été réalisée avec les Ac polyclonaux anti-D et les sérums riches en anti-D afin de déterminer à partir de quel moment ils étaient capables d'induire une activité ADCC décelable.

Il a été constaté que pour tous les Ac polyclonaux, la lyse extra-cellulaire commençait après 90 minutes d'incubation pour une concentration de sensibilisation de 500 ng/ml (figure R.31). Ces résultats ont également montré que le profil des cinétiques de lyse étaient comparables entre les différents Ac polyclonaux avec, cependant, une activité légèrement supérieure pour le polyclonal anti-D P6 qui présentait une DO de 0,7 à 120 minutes d'incubation alors que le polyclonal P3, par exemple, était à 0,39.

Cette différence de lyse observée avec le polyclonal anti-D P6 après 120 minutes d'incubation a été retrouvée, bien que moins importante, après une nuit d'incubation (figure R.29).

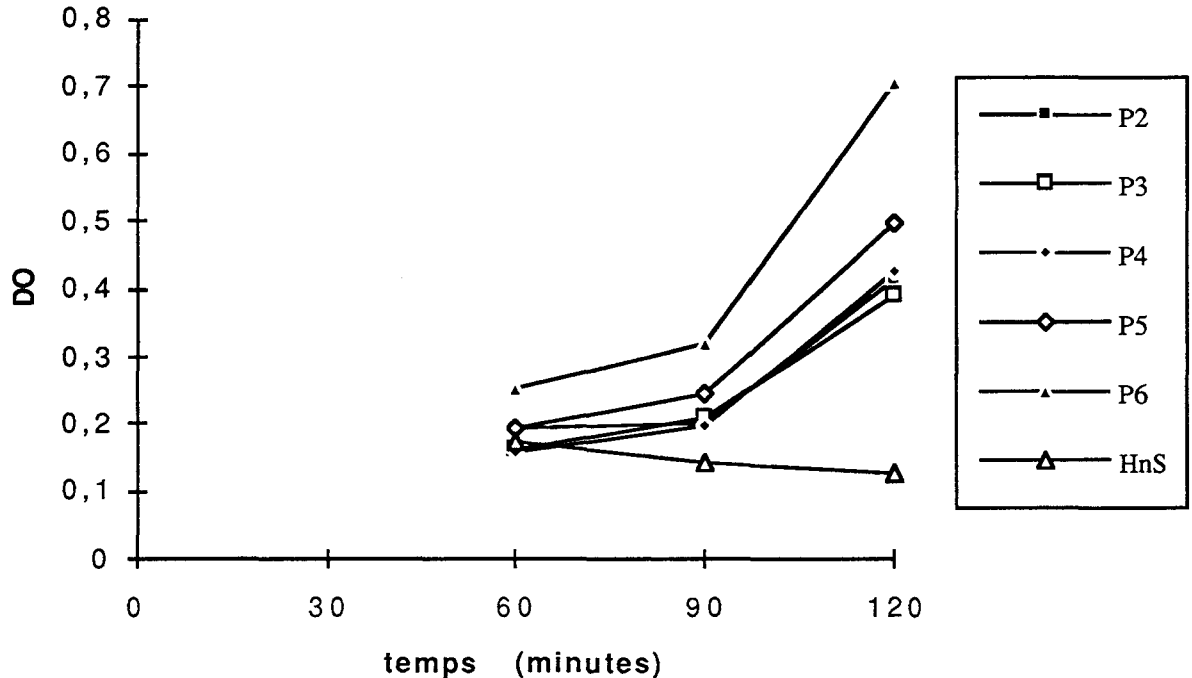


Figure R.31 : étude cinétique en ADCC avec les différents Ac polyclonaux anti-D. La sensibilisation des hématies a été réalisée avec les Ac polyclonaux P2, P3, P4, P5 et P6 à la concentration de 500 ng/ml. Les temps d'incubation étaient de 60, 90 et 120 minutes. HnS : hématies non sensibilisées.

Avec les sérums riches en anti-D, un début d'activité ADCC a été observé dès 60 minutes d'incubation pour l'ensemble de ces sérums (figure R.32). De la même façon qu'avec les Ac polyclonaux, les 5 sérums possédaient une activité de lyse avec des profils similaires. Toutefois, une supériorité a été observée pour le sérum S5 dont la valeur de DO était à 1,2 après 180 minutes d'incubation alors que le sérum S3 était à 0,8 pour un même temps d'incubation.

Cette différence de lyse avec le sérum S5 après 180 minutes d'incubation a été retrouvée, mais de moins grande importance, après une nuit d'incubation (figure R.29).

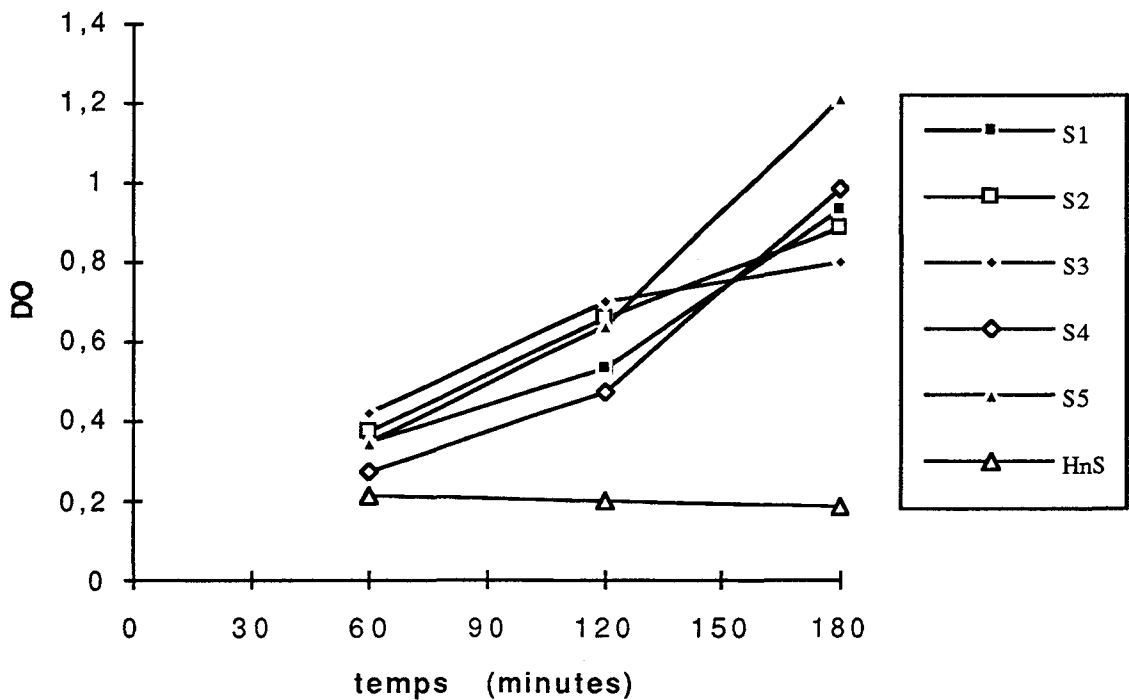


Figure R.32 : étude cinétique en ADCC avec les différents sérums anti-D. La sensibilisation des hématies a été réalisée avec les sérums riche en anti-D S1, S2, S3, S4 et S5 à la concentration de 500 ng/ml. Les temps d'incubation étaient de 60, 120 et 180 minutes. HnS : hématies non sensibilisées.

1.1.3. Etude de la concentration de sensibilisation en test d'ADCC

Une étude de l'influence de la concentration de sensibilisation sur l'activité ADCC du polyclonal anti-D a été entreprise. Avec 10 ng/ml, aucun effet n'a été observé, la valeur de DO étant identique à celle obtenue avec les hématies non sensibilisées $DO = 0,12$ (figure R.33).

A partir de 50 ng/ml et jusqu'à 500 ng/ml, l'activité ADCC augmente régulièrement en fonction de la concentration de sensibilisation. A la plus forte concentration testée, 1000 ng/ml, l'activité ADCC est encore plus élevée (DO = 1,2) mais une saturation de l'effet commence à apparaître.

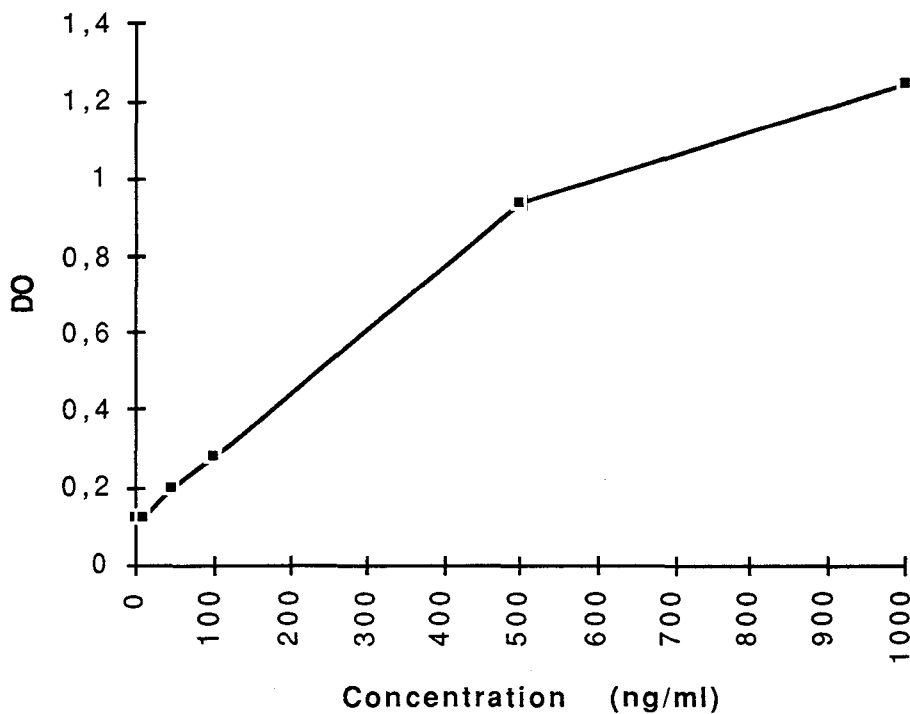


Figure R.33 : test d'ADCC sur cellules mononucléées avec l'Ac polyclonal anti-D P1. Les concentrations de sensibilisation utilisées étaient de 0, 10, 50, 100, 500 et 1000 ng/ml.

1.2. Etude en test phagocytose

1.2.1. Evaluation d'Ac polyclonaux et de sérums anti-D

En test de phagocytose, les 6 Ac polyclonaux anti-D testés ont donné des résultats comparables pour les deux concentrations de sensibilisation utilisées : 100 et 500 ng/ml. Les résultats de la figure R.34 correspondent à la concentration de 500 ng/ml.

Avec une concentration de sensibilisation de 500 ng/ml, les 5 polyclonaux P2 à P6 ont été capables d'induire une activité de phagocytose comparable à celle obtenue avec le polyclonal P1 (pourcentages de lyse de 106% en moyenne).

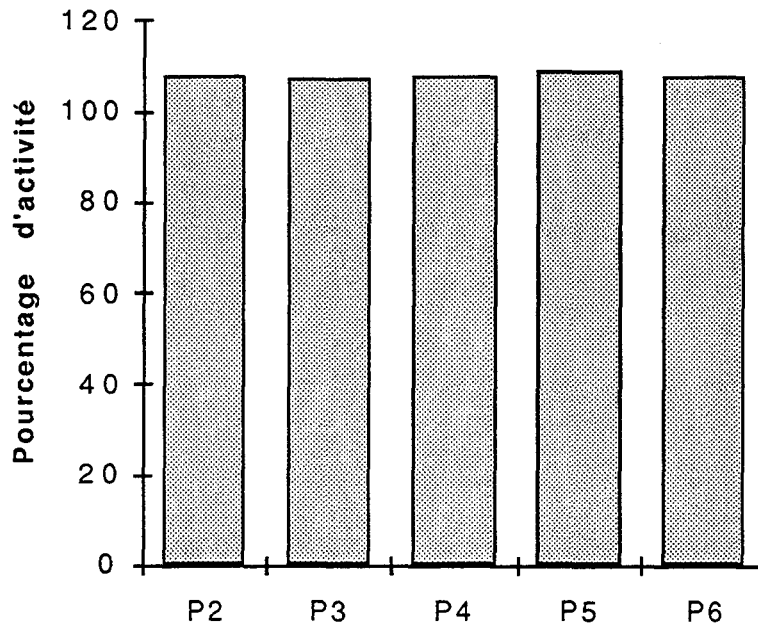


Figure R.34 : test de phagocytose sur monocytes avec les Ac polyclonaux anti-D. La sensibilisation des hématies a été réalisée avec les Ac P1, P2, P3, P4, P5 et P6 à la concentration de 500 ng/ml. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la valeur obtenue pour P1.

Par contre, des différences d'aptitude à induire une phagocytose ont été observées entre les différents sérums riches en anti-D. En effet, les valeurs de phagocytose obtenues avec les sérums par rapport à celle du polyclonal P1 allaient de 74% pour S4 à 119% pour S1 à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml (figure R.35A) et de 66% pour S4 à 102% pour S2 à la concentration de sensibilisation de 500 ng/ml (figure R.35B). De plus, les variations observées entre les sérums sont moins importantes avec la concentration de sensibilisation de 500 ng/ml par rapport à celle de 100 ng/ml à l'exception du sérum S4 qui reste faible aux deux concentrations.

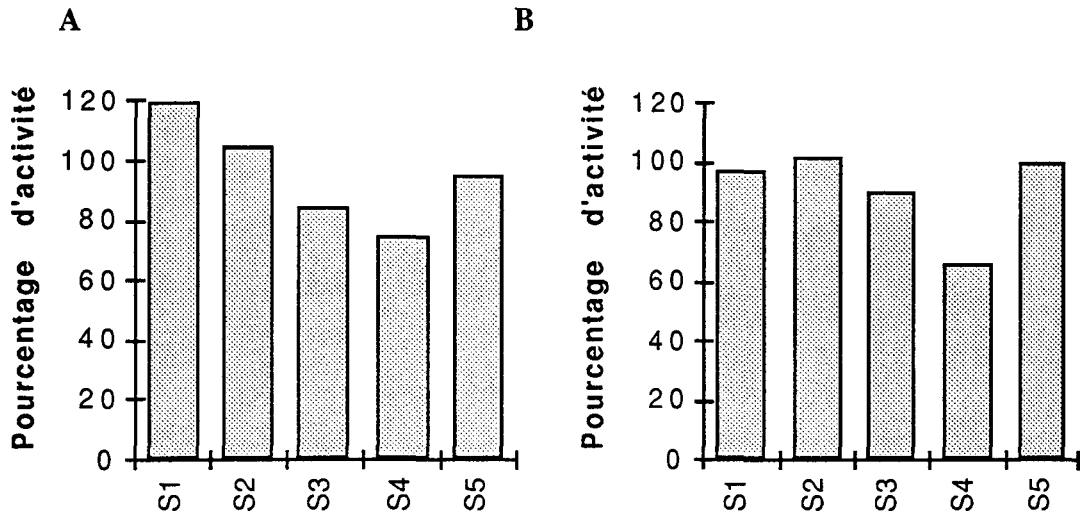


Figure R.35 : tests de phagocytose avec des hématies sensibilisées par les sérums riches en anti-D. Les hématies ont été sensibilisées avec les sérums riches en anti-D S1, S2, S3, S4 et S5 et le polyclonal anti-D P1, à la concentration de 100 ng/ml (A) et de 500 ng/ml (B). Les résultats ont été exprimés en pourcentages d'activité par rapport à la valeur obtenue pour P1.

1.2.2. Etude cinétique de la phagocytose avec des polyclonaux anti-D

Une étude cinétique de la phagocytose a été réalisée avec les polyclonaux anti-D pendant différentes périodes d'incubation (figure R.36). Dès 30 minutes d'incubation, une activité fonctionnelle non négligeable a déjà été observée avec des valeurs de DO de 0,7 pour P1, 0,92 pour P2, 0,85 pour P3, 0,96 pour P5 et 0,89 pour P6 alors qu'avec les hématies non sensibilisées les DO étaient de 0,36.

Les valeurs de DO augmentaient ensuite progressivement pour atteindre un maximum au temps 120 minutes. Pour une durée d'incubation supérieure (150 minutes), les valeurs de DO étaient toujours plus faibles.

Une homogénéité des résultats a été obtenue entre les différents anticorps reflétant ainsi leur aptitude tout à fait comparable à induire la phagocytose d'une quantité analogue d'hématies sensibilisées.

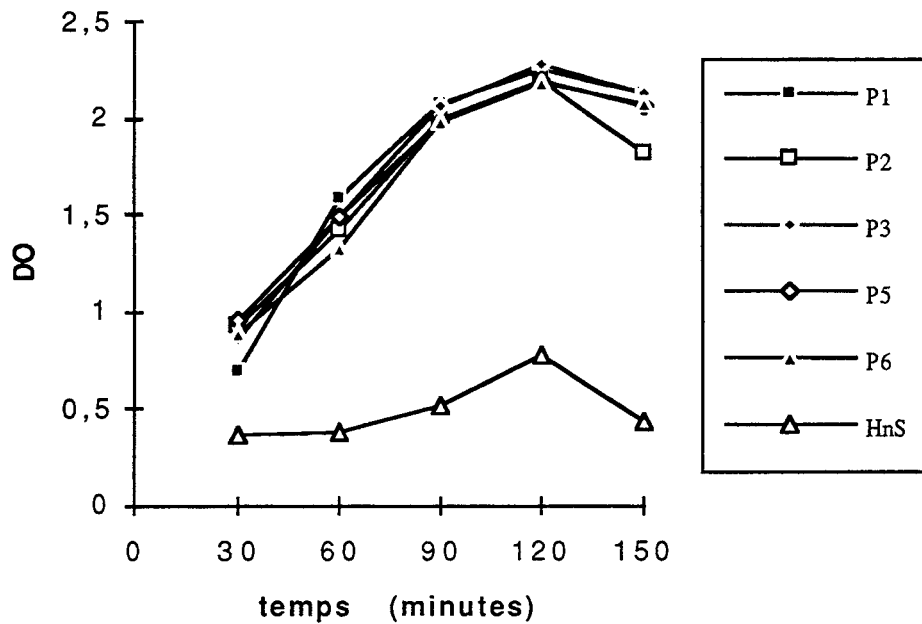


Figure R.36 : étude cinétique de la phagocytose avec les différents Ac polyclonaux anti-D. La sensibilisation des hématies a été réalisée avec les Ac polyclonaux P1, P2, P3, P4, P5 et P6 à la concentration de 500 ng/ml. Les temps d'incubation étaient de 30, 60, 90, 120 et 150 minutes. HnS : hématies non sensibilisées.

Une étude cinétique de la phagocytose avec les sérums anti-D a également été réalisée et une activité phagocytaire a également été observée dès 30 minutes d'incubation (résultats non présentés).

1.2.3. Etude de la concentration de sensibilisation en test phagocytose

Une étude de l'influence de la concentration de sensibilisation sur l'activité de phagocytose du polyclonal anti-D a été entreprise. Avec une concentration de 10 ng/ml, aucune réponse n'a été observée, la valeur de DO étant identique à celle obtenue avec les hématies non sensibilisées DO = 0,30 (figure R.37).

A partir de 50 ng/ml et jusqu'à 500 ng/ml, l'activité de phagocytose augmente régulièrement en fonction de la concentration de sensibilisation et à partir de 500 ng/ml, une saturation de la réponse a été observée.

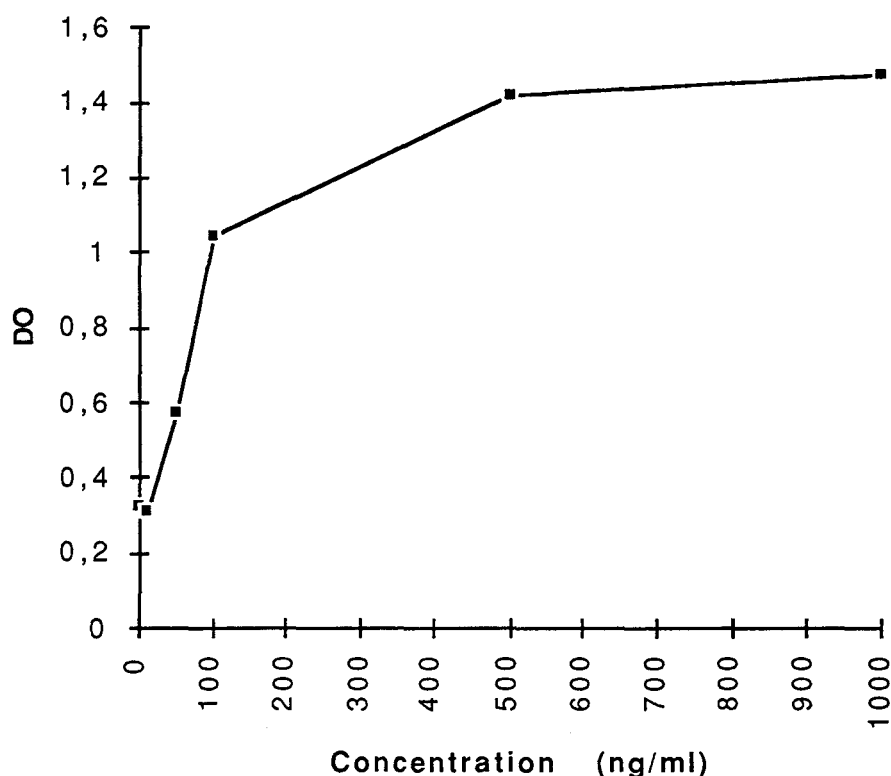


Figure R.37 : test de phagocytose sur monocytes activés avec l'Ac polyclonal anti-D P1. Les concentrations de sensibilisation utilisées étaient de 0, 10, 50, 100, 500 et 1000 ng/ml.

1.3. Etude de l'activation du complément par les Ac polyclonaux

1.3.1. Etude en test d'agglutination

Plusieurs Ac polyclonaux anti-D ont été testés afin de savoir si leur fixation à la surface d'hématies Rh(D) positif pouvait entraîner une activation du complément.

Pour cela, des essais d'activation du complément jusqu'à la fraction C_{3b} ont été réalisés sur les hématies sensibilisées avec des Ac polyclonaux anti-D, avec une révélation par agglutination en présence d'un anticorps anti-C_{3d}.

Des concentrations de sensibilisation d'hématies de 1 et de 10 µg/ml ont été testées. Aucune agglutination par l'Ac anti-C_{3d} (après incubation avec le sérum AB) n'a été observée avec les hématies sensibilisées alors que le témoin positif (hématies sensibilisées avec une IgM anti-Jk^b) présentait une agglutination très nette (+++). Les résultats du tableau R.14 présentent les agglutinations observées avec une sensibilisation de 10 µg/ml.

	Sans sérum	Avec sérum
HnS	-	-
H-P1	-	-
H-P2	-	-
H-P3	-	-
H-P4	-	-
H-P6	-	-
Témoin +	+	+++

Tableau R.14 : mise en évidence de l'activation du complément par un test d'agglutination à l'anti-C3d pour des hématies sensibilisées avec des anti-D à une concentration de 10 µg/ml. Le témoin positif était l'IgM anti-Jk^b et les hématies utilisées étaient de groupe 0 R₁r Jk^{b+}. HnS : hématies non sensibilisées, H-P : hématies sensibilisées avec un polyclonal anti-D.

1.3.2. Etude en cytométrie de flux

Les tests d'agglutination n'étant pas très sensible pour visualiser de faibles activations du complément, une observation en cytométrie de flux de la fixation de la fraction C_{3b} sur les hématies a donc été réalisée. Les pourcentages de cellules fluorescentes ont toujours été inférieurs à 10% lorsqu'elles étaient incubées avec les anti-D, alors qu'avec l'anti-Jk^b, 29% de cellules ont été marquées (tableau R.15). Ces résultats n'ont donc pas permis de mettre en évidence une activation du complément par les anti-D polyclonaux.

Ac testés	Pourcentage de cellules marquées
H-P1	4,9
H-P2	9,2
H-P4	7,0
H-P6	8,0
Témoin +	28,9

Tableau R.15 : pourcentage d'hématies marquées après sensibilisation des cellules avec les Ac polyclonaux anti-D (10 µg/ml) et incubation avec du sérum AB. H-P : hématies + polyclonal, témoin + : antiJk^b.

2. Evaluation des Ac monoclonaux anti-D

2.1. Evaluation des Acm en test d'adhérence sur monocytes activés

Les Acm anti-D testés, qu'ils soient de sous-classes IgG1 ou IgG3, ont été capables d'induire la formation de rosettes sur monocytes activés à partir d'une concentration de sensibilisation de 5 ng/ml pour l'Ac AD3 (IgG3), de 10 ng/ml pour les IgG1 AD1, HM16, P3X83 et P3X212 et de 50 ng/ml pour l'Ac P3X35 (tableau R.16). L'Ac AD3 (IgG3) a été observé comme l'Ac induisant le plus de rosettes, avec un pourcentage de monocytes activés formant rosettes de 68,2 % à 10 ng/ml alors que tous les autres Ac y compris le polyclonal

anti-D P1 étaient en dessous de 13% à la même concentration. De plus, les rosettes obtenues avec l'Ac AD3 ont toujours été beaucoup plus volumineuses (nombre d'hématies adhérentes) qu'avec les différents Ac de sous classe IgG1. Parmi les autres Acm, tous de sous-classe IgG1, les résultats d'adhérence ont été relativement hétérogènes avec une supériorité des Ac AD1 et P3X83, l'Ac HM16 étant le plus faible. Avec les Ac AD1, AD3, HM16 et P3X83 une diminution du pourcentage de rosettes a été observée aux fortes concentrations.

Concentr. ($\mu\text{g/ml}$)	P1	AD1	AD3	P3X35	HM16	P3X83	P3X212
5	85,1	72,8	ND	86,8	27,9	65,1	59,6
1	81,7	86	ND	62,5	40,5	80,6	58,8
0,1	87,7	63,8	73,7	54,5	49	74,7	49,3
0,05	55,4	68,9	92,3	2,5	19,3	54,6	14,2
0,025	ND	ND	88,7	ND	ND	ND	ND
0,01	7,3	12,2	68,2	0	2,5	5,9	2,6
0,005	ND	ND	37,5	ND	ND	ND	ND

Tableau R.16 : pourcentages de monocytes activés formant rosettes avec des hématies sensibilisées par les différentes concentrations d'Ac anti-D. ND : non déterminé.

2.2. Evaluation des Acm anti-D en test d'ADCC

2.2.1. Etude cinétique

Des tests d'ADCC ont été réalisés en incubant les hématies sensibilisées avec les anti-D pendant différentes périodes.

A la concentration de 100 ng/ml (figure R.38A), l'activité ADCC est difficile à mettre en évidence avant 2 heures d'incubation (valeurs de DO de l'ordre de 0,3). A partir de 3 heures d'incubation, l'effet observé est plus net, les valeurs maximales de DO ne sont toutefois pas supérieures à 0,4.

Avec une concentration de sensibilisation de 500 ng/ml, des différences plus importantes sont observées entre les Ac (figure R.38B). Les Ac P3X212, P3X83, AD1 et HM16 sont capables d'induire un effet ADCC dont l'intensité augmente en fonction du temps et dont la pente des courbes est comparable surtout après 2 heures d'incubation (DO de 0,45 à 0,6 après 3,5 heures). Par contre, avec les 2 Ac P3X35 et AD3, l'effet ADCC est moins rapide et moins intense (DO de 0,3 après 3,5 heures).

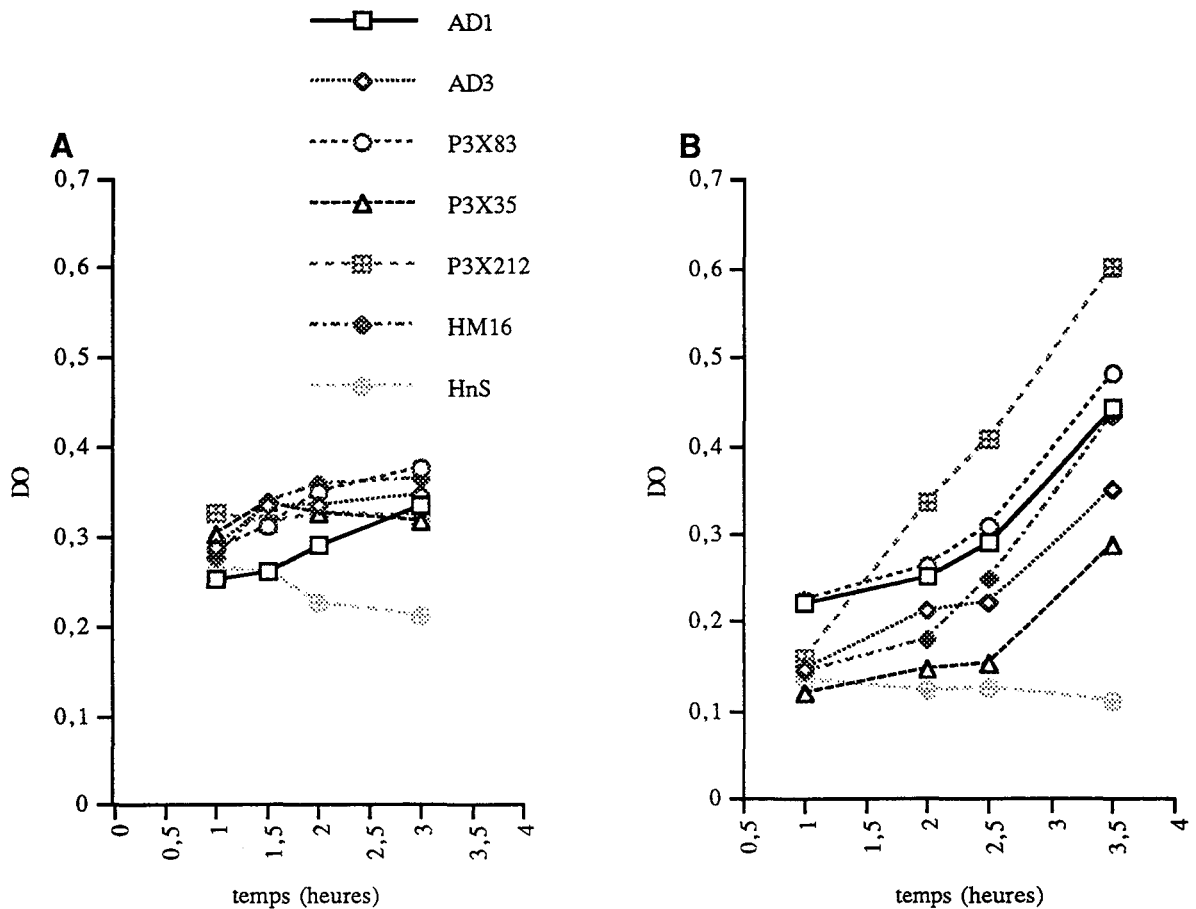


Figure R.38 : étude cinétique en ADCC avec les Acm anti-D. A la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml, les temps d'incubation étudiés étaient de : 1^h00 ; 1^h30 ; 2^h00 ; 3^h00 (A) et à la concentration de 500 ng/ml, les temps d'incubation étaient de : 1^h00 ; 2^h00 ; 2^h30 ; 3^h30 (B). HnS : hématies non sensibilisées.

2.2.2. Etude de la concentration de sensibilisation des hématies Rh(D) positif en test d'ADCC

L'activité ADCC des 6 Acm anti-D a été testée à différentes concentrations de sensibilisation de 10 ng/ml à 500 ng/ml (figure R.39). Plusieurs observations peuvent être faites :

1 - à 10 ng/ml, seul l'Ac HM16 est capable d'induire une réponse ADCC significative : DO de 0,52 pour un bruit de fond de 0,2

2 - à 100 ng/ml, l'Ac HM16 est nettement supérieur aux autres IgG1 : DO de 1,75 contre des DO de 0,6 à 1,2

3 - à 500 ng/ml, l'Ac HM16 ne présente plus la meilleure activité biologique et les Ac peuvent être séparés en 2 groupes : les Ac HM16, P3X83, et AD1 avec des DO proches de 2 et les Ac AD3, P3X212 et P3X35 avec des DO comprises entre 1 et 1,5.

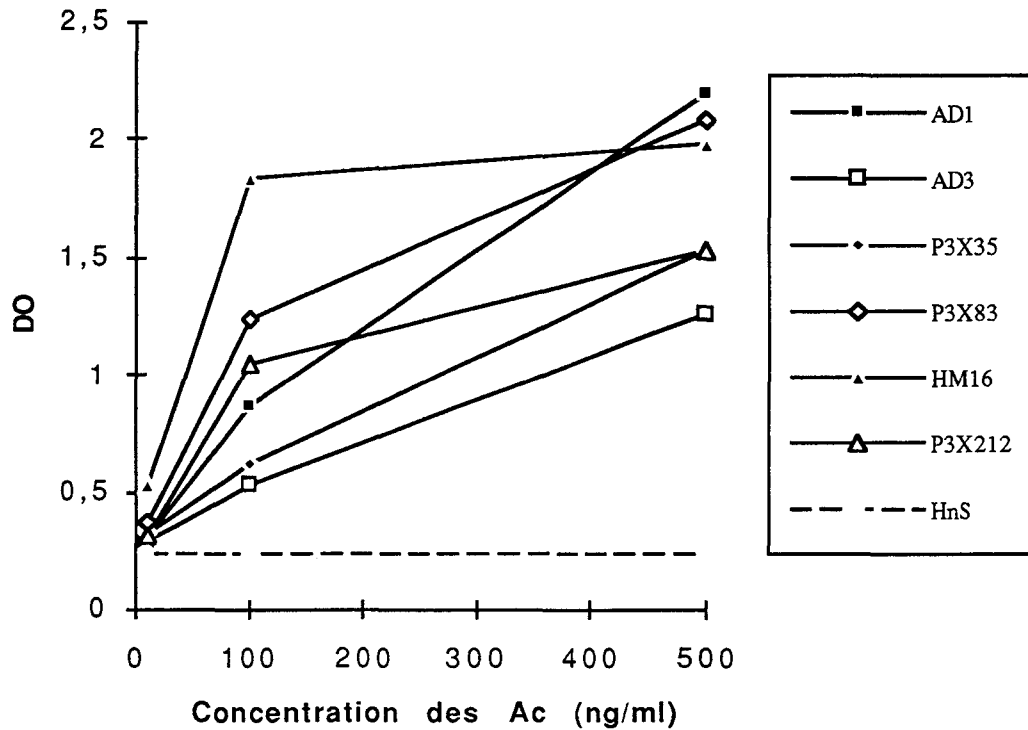


Figure R.39 : test d'ADCC sur cellules mononucléées avec différentes concentrations d'Acm anti-D. Les concentrations de sensibilisation utilisées étaient : 10, 100 et 500 ng/ml.

2.2.3. Comparaison des Acm en test d'ADCC sur cellules mononucléées

Une synthèse de plusieurs tests d'ADCC sur cellules mononucléées a permis de comparer les propriétés fonctionnelles des Acm utilisés à deux concentrations différentes (100 et 500 ng/ml) (figure R.40A et B). Les résultats montrent qu'à 100 ng/ml tous les Acm sont capables d'induire une réponse supérieure à 100% d'activité par rapport aux valeurs de DO obtenues avec le polyclonal anti-D P1 (figure R.40A). En effet, les pourcentages d'activité observés ont été pour l'Ac HM16 de 334% ; pour l'Ac P3X83 de 252% ; pour l'Ac P3X212 de 169% ; pour l'Ac AD1 de 144%. Seuls les Ac AD3 et P3X35 ont présenté une activité ADCC proche de celle obtenue avec le polyclonal P1 avec respectivement des valeurs de pourcentage d'activité de 131% et 123%.

Une grande variabilité dans la réponse ADCC a été observée entre les Acm anti-D malgré l'utilisation des mêmes conditions opératoires. Les coefficients de variation sur les moyennes variaient de 31% avec l'Ac P3X83 à 54% pour l'Ac P3X212.

Par contre, à la concentration de 500 ng/ml, les différents Ac présentent des activités proches de celle obtenue avec le polyclonal P1 (figure R.40B). Avec les deux Ac AD3 et P3X35, les pourcentages d'ADCC sont inférieurs à ceux obtenus avec le polyclonal anti-D : 83% et 93% respectivement. Les autres anti-D donnent des valeurs supérieures à 100% avec un maximum obtenu pour l'anticorps P3X83 : 129%. Les coefficients de variation sur les moyennes sont entre 17% avec l'Ac P3X212 à 35% avec l'Ac HM16.

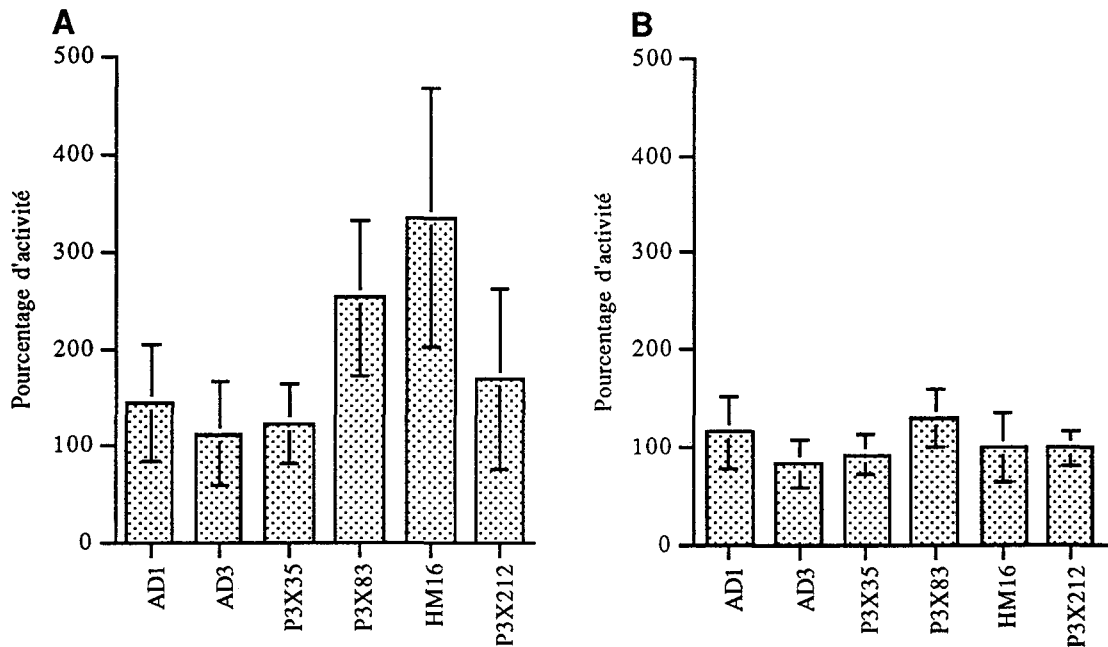


Figure R.40 : moyenne des résultats de 9 tests d'ADCC à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml (A) et de 7 tests à la concentration de 500 ng/ml (B). Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la valeur obtenue pour P1 (soit le rapport entre la valeur de DO obtenue pour un Acm sur la valeur de DO du polyclonal anti-D P1 dans le même test).

Deux autres tests d'ADCC ont été réalisés avec une forte concentration en Ac anti-D (10 µg/ml). Dans ces conditions, les variations observées entre les Ac sont nettement plus faibles (figure R.41). Tous les anti-D présentent une activité inférieure à celle du polyclonal anti-D (valeur à 100%) avec des valeurs allant de 53% avec l'Ac HM16 à 82% avec l'Ac AD3.

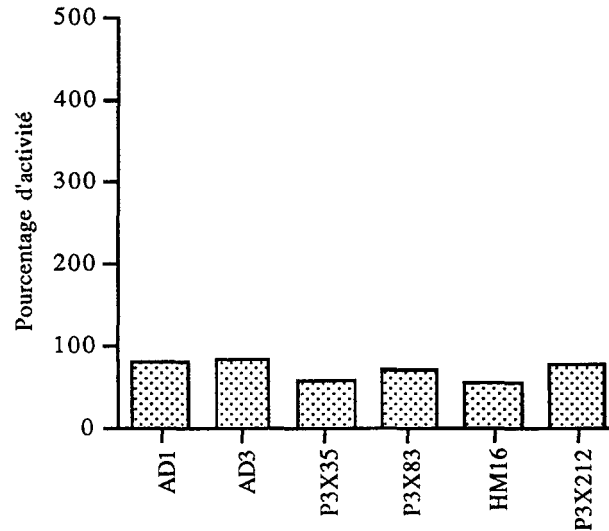


Figure R.41 : moyenne de deux tests d'ADCC à la concentration de sensibilisation de 10 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la valeur obtenue pour P1 (soit le rapport entre la valeur de DO obtenue pour un Acm sur la valeur de DO du polyclonal anti-D P1 dans le même test).

2.2.4. Comparaison de l'activité ADCC des Acm en fonction du pourcentage de lymphocytes

Plusieurs tests d'ADCC ont été réalisés avec une quantité moyenne de 5.10^5 monocytes par puits. Lors de chaque préparation, une évaluation du pourcentage de monocytes a été faite par rapport aux lymphocytes, ce qui a permis de présenter les résultats (figure R.42) en fonction de la quantité de lymphocytes présents dans le milieu réactionnel. Compte tenu des variations observées avec chaque Ac pour des proportions différentes de lymphocytes, des droites de corrélation ont été construites. Les résultats sont présentés sur la figure R.42 et permettent de faire deux observations.

1 - Avec certains Ac, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'activité ADCC et le nombre de lymphocytes présents, les valeurs de DO étant très variables. Les coefficients de corrélation obtenus avec les Ac AD1, P3X212 et AD3 étaient respectivement de 0,047, 0,057 et 0,354. Par contre, des valeurs de coefficients de corrélation supérieures ont été observées avec les Ac P3X35 : 0,74, HM16 : 0,76 et P3X83 : 0,81.

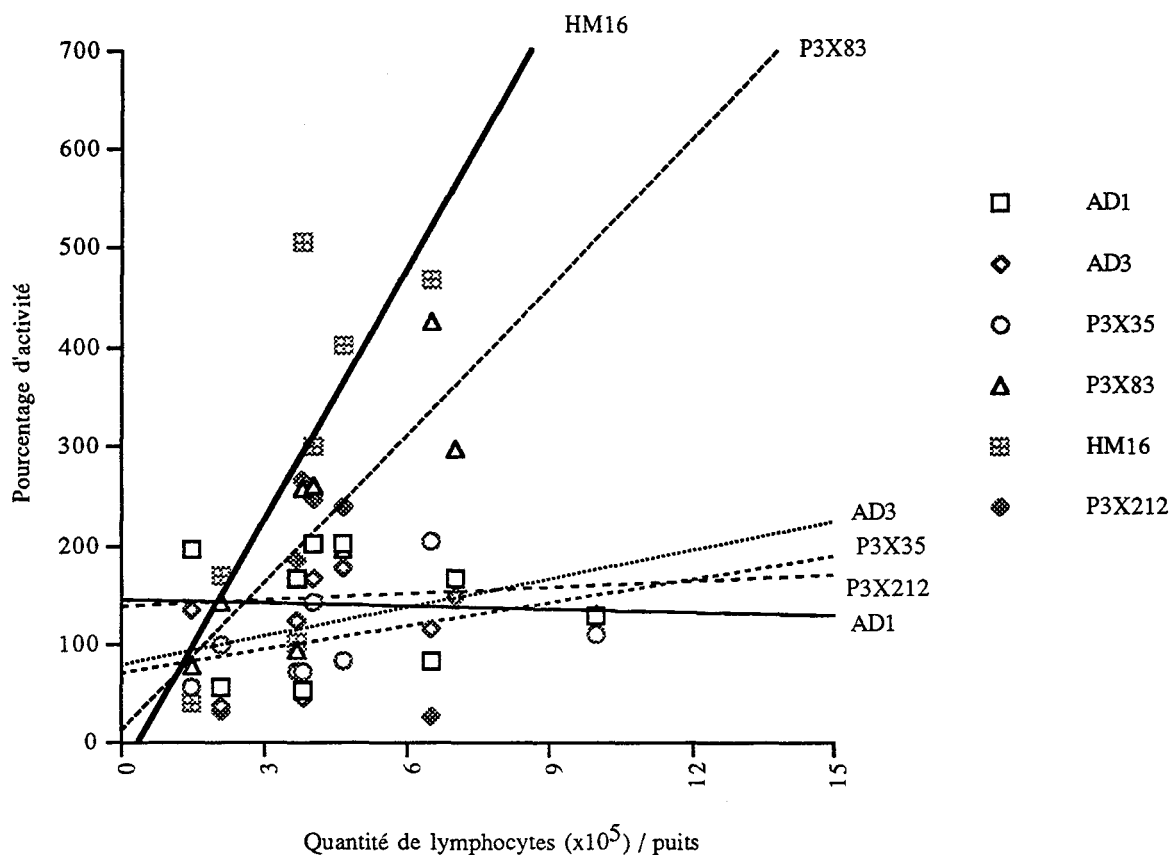


Figure R.42 : pourcentage d'activité des Ac anti-D (par rapport au polyclonal anti-D P1) en fonction de la quantité de lymphocytes dans le milieu réactionnel. La quantité de monocytes était fixée à 5.10^5 monocytes/puits et le nombre de tests réalisés étaient de 9 pour AD1, 8 pour AD3, P3X83 et P3X212 et de 7 pour HM16 et P3X35. La concentration de sensibilisation était de 100 ng/ml.

2 - Les Ac peuvent être classés en 2 groupes. Un premier groupe de 4 Ac (AD3, P3X35, P3X212 et AD1) pour qui l'activité ADCC ne semble pas être influencée par la proportion de lymphocytes. Par contre, avec les Ac HM16 et P3X83, les résultats d'ADCC obtenus sont plus importants quand la proportion de lymphocytes dans la suspension de cellules effectrices est plus élevée.

D'autres tests ADCC ont été réalisés en fixant cette fois, la quantité totale de cellules mononucléées à 10^6 cellules par puits. Les réponses en ADCC ont été observées en fonction de la quantité de lymphocytes et de monocytes dans les différentes préparations de cellules mononucléées (figure R.43). Les résultats d'ADCC obtenus à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml ont confirmé la prédominance des Ac P3X83 et HM16 en pourcentage d'activité par rapport au polyclonal anti-D lorsque la concentration en lymphocytes augmente. De plus, il a été clairement mis en évidence que l'activité du polyclonal augmentait

par rapport aux Acm lorsque la concentration en monocytes augmentait et inversement, l'activité des Acm par rapport à celle des polyclonaux est plus importante quand la proportion de monocytes est plus faible.

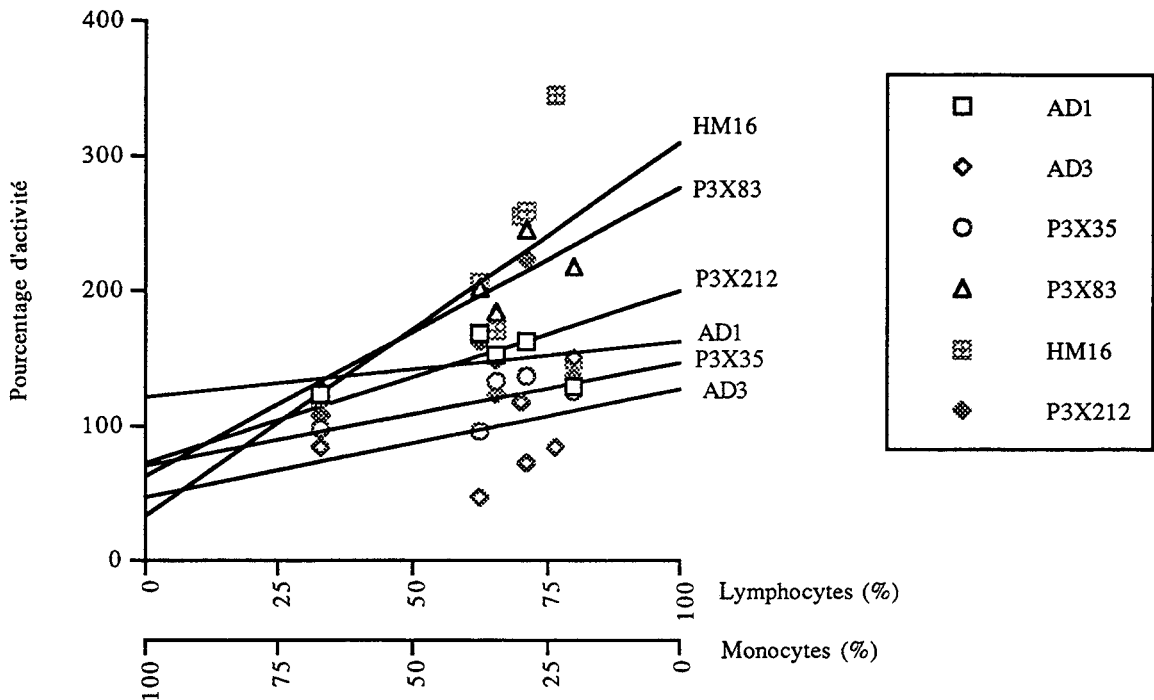


Figure R.43 : relation entre la réponse ADCC et les pourcentages de lymphocytes et de monocytes. La concentration de sensibilisation utilisée était de 100 ng/ml, la quantité de cellules effectrices dans le puits était de 10^6 cellules.

2.2.5. Comparaison des Acm AD1 et AD3 et du polyclonal anti-D P1 en test d'ADCC sur cellules U937 activées

Un test d'ADCC a été réalisé avec la lignée U937 comme cellules effectrices. Pour cela, les cellules ont été activées avec de l'interféron- γ et des hématies sensibilisées avec les Ac AD1, AD3 et le polyclonal anti-D ont été incubées une nuit avec ces cellules effectrices.

Les résultats obtenus (figure R.44) montrent l'absence d'ADCC lorsque les cellules U937 ne sont pas activées dans la mesure où les valeurs de DO étaient comparables à celles obtenues avec les témoins négatifs.

Par contre, lorsque les cellules sont activées, une réponse ADCC a été obtenue avec les Ac anti-D mais généralement plus faible qu'avec les cellules mononucléées. A la concentration de 500 ng/ml, les valeurs de DO obtenues sont significatives alors qu'à la concentration de 100 ng/ml les valeurs sont trop faibles pour pouvoir être interprétées.

De plus, les résultats de la figure R.44 montrent, pour les 2 concentrations utilisées, une réponse ADCC supérieure avec l'Ac AD1 par rapport à l'Ac AD3 en cellules mononucléées, alors qu'avec les cellules U937 activées, ces deux Ac induisent une réponse ADCC comparable. L'Ac polyclonal P1 a induit une réponse beaucoup plus faible que celle obtenue avec les Acm en présence des cellules U937, alors qu'avec les cellules effectrices, le polyclonal, notamment à 500 ng/ml, induit une réponse ADCC supérieure.

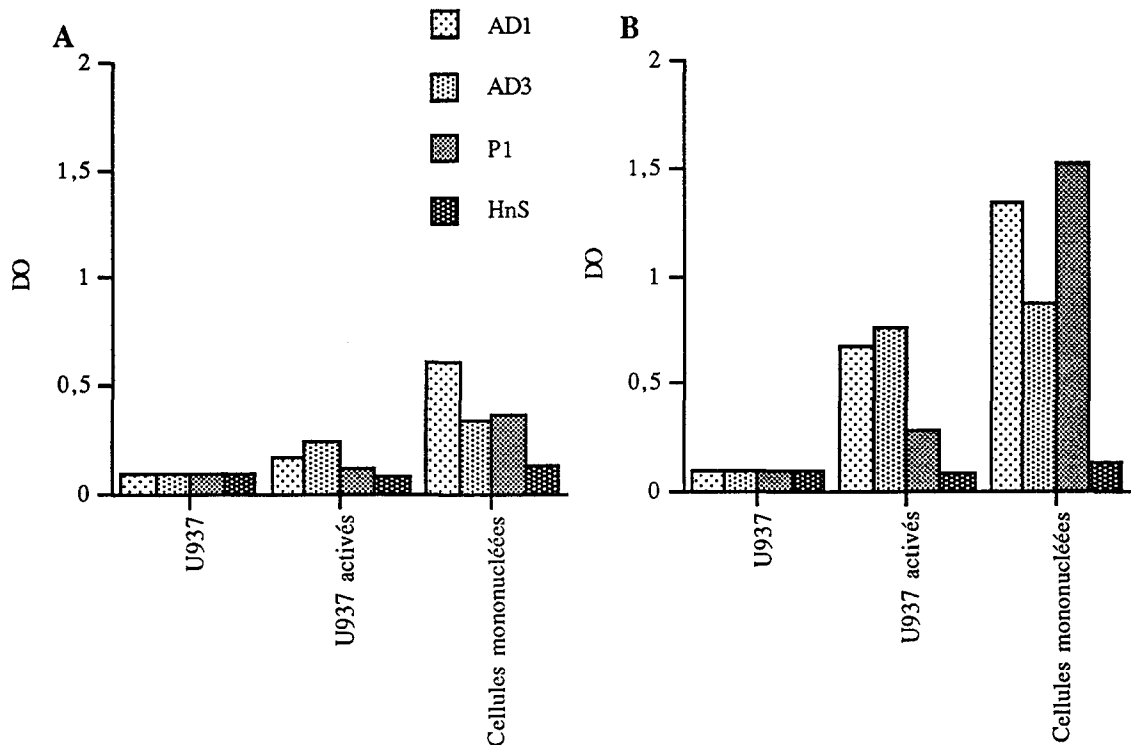


Figure R.44 : test d'ADCC sur cellules U937, U937 activées et cellules mononucléées. Les hématies ont été sensibilisées avec les Ac anti-D AD1, AD3 et le polyclonal P1 aux concentrations de 100 ng/ml (A) et 500 ng/ml (B).

2.2.6. Etude du ratio cellules mononucléées/hématies

L'influence du rapport nombre de cellules effectrices/nombre d'hématies sur l'activité ADCC a été étudiée avec les deux Ac : AD1 de sous-classe IgG1 et AD3 de sous-classe IgG3. Les résultats de la figure R.45 montrent que l'activité est plus importante (augmentation des valeurs de DO) lorsque la quantité d'hématies augmente. Cette quantité d'hématies utilisées dans le test a aussi une influence sur les résultats dans la mesure où le bruit de fond augmente en relation avec l'augmentation du nombre d'hématies présentes dans le milieu réactionnel : rapport 1/1, DO de 0,06 ; rapport 1/60, DO de 0,37.

L'Ac AD1 de sous-classe IgG1 a toujours donné des valeurs d'ADCC supérieures à celles obtenues avec l'Ac AD3 de sous-classe IgG3.

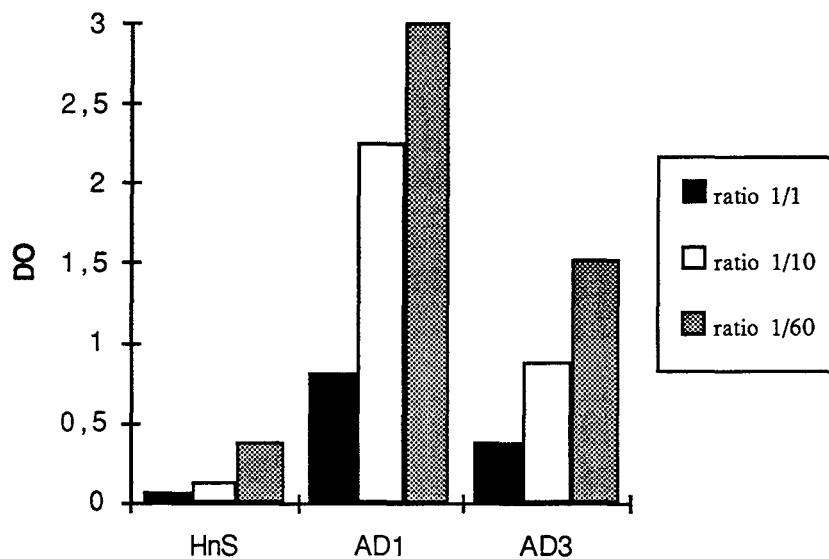


Figure R.45 : test d'ADCC à différents ratios cellules mononucléées/hématies. Les hématies ont été sensibilisées avec les Acm AD1 (IgG1) et AD3 (IgG3) à la concentration de 500 ng/ml et les ratio étudiés étaient 1/1, 1/10 et 1/60.

2.2.7. Inhibition de l'ADCC en présence d'IgG humaines

Une étude de l'inhibition de l'ADCC induite par les anti-D a été entreprise en ajoutant au milieu réactionnel des IgG polyvalentes.

Une première série d'expériences a été réalisée en ajoutant, 1 heure avant de mettre les hématies sensibilisées, une IgG d'origine monoclonale et de spécificité différente : un Ac monoclonal humain anti-p24 (anti-VIH) de sous-classe IgG1. Pour le polyclonal P1 et pour l'Ac AD1 aucune inhibition de l'ADCC n'a été observée (figure R.56) avec des concentrations d'IgG1 inférieures à 0,2 µg/ml : DO voisines de 1,2. Par contre avec une concentration de 2 µg/ml d'IgG1, la valeur de DO pour l'AD1 était de 1,03 et de 0,91 pour le polyclonal P1. Une inhibition partielle a donc été montrée. Avec l'anti-D AD3 aucune inhibition n'a été mise en évidence même avec 2 µg/ml d'IgG1 : DO moyennes de 0,8.

Des concentrations en anti-p24 supérieures à 2 µg/ml n'ont pas été testées dans ce test ce qui explique l'inhibition partielle de l'ADCC. Pour tenter d'obtenir une inhibition totale, une deuxième série d'expériences a été réalisée.

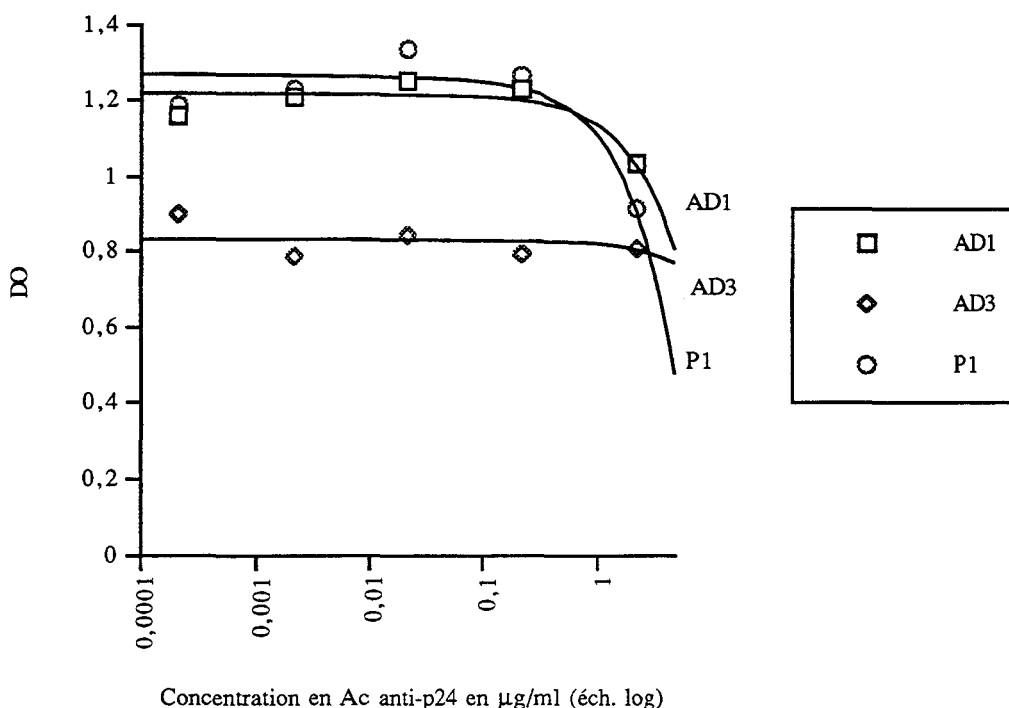


Figure R.46 : inhibition de l'ADCC par une IgG1 monoclonale anti-P24. La concentration de sensibilisation des Ac anti-D était de 500 ng/ml et les concentrations de l'anti-p24 utilisées dans le test étaient de 0, 0,0002 ; 0,002 ; 0,02 ; 0,2 ; 2 µg/ml.

Pour cela, des IgG polyvalentes ont été utilisées à différentes concentrations (de 0,1 à 10 µg/ml). Des profils d'inhibition comparables (figure R.47) ont été obtenus en présence de concentrations croissantes d'Ig polyvalentes pour les tests d'ADCC réalisés avec des hématies sensibilisées par les anti-D de sous-classe IgG1. Avec 10 µg/ml d'IgG polyvalentes, une inhibition presque complète a été obtenue : DO voisines de 0,3 pour des contrôles négatifs dont les DO sont de 0,26. Par contre, l'inhibition de l'ADCC médiée par l'Ac AD3, dont l'activité était la plus importante avec une concentration d'IgG polyvalentes de 0,1 µg/ml par rapport aux autres Ac, n'a pas été totale : DO de 0,48 avec 10 µg/ml d'Ig polyvalentes.

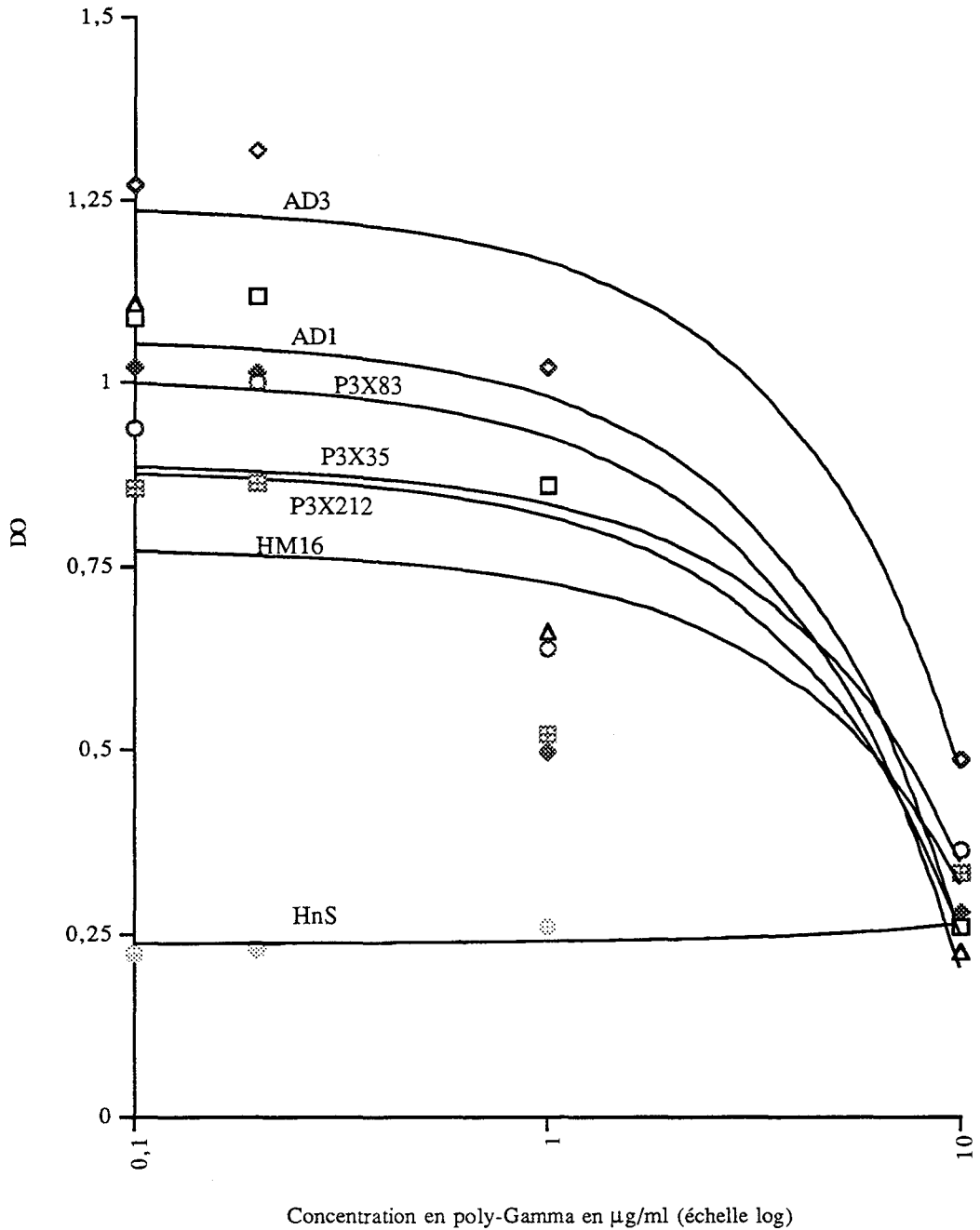


Figure R.47 : inhibition de l'ADCC par des IgG polyvalentes. La concentration de sensibilisation des Ac anti-D était de 500 ng/ml et les concentrations des IgG polyvalentes (poly-gamma) utilisées dans le test étaient de 0,1 ; 0,2 ; 1 et 10 µg/ml dans le puits. Les résultats à 0,1 µg/ml étaient équivalents aux résultats en absence d'IgG polyvalentes.

2.2.8. Comparaison de l'activité ADCC de 2 lots différents des anticorps AD1 et AD3

Deux lots d'Acm anti-D avaient été produits et conditionnés sous des noms différents : C77 et AD1 pour l'IgG1 190/31 ; C79 et AD3 pour l'IgG3 P3X229-14. Pour vérifier l'homogénéité de la réponse en ADCC entre les lots, les propriétés fonctionnelles de ces

Ac ont été comparées. Les résultats obtenus ont permis d'observer des réponses ADCC comparables, entre les lots (figure R.48). En effet, les valeurs de DO obtenues en ADCC à 500 ng/ml pour les Ac AD1 et C77 sont respectivement de 1,43 et de 1,53 et pour les Ac AD3 et C79 de 1,14 et 1,30. A la concentration de 100 ng/ml, les résultats obtenus avec les Ac AD1 et C77 étaient de 0,49 et de 0,45 et pour les Ac AD3 et C79 de 0,81 et de 0,89.

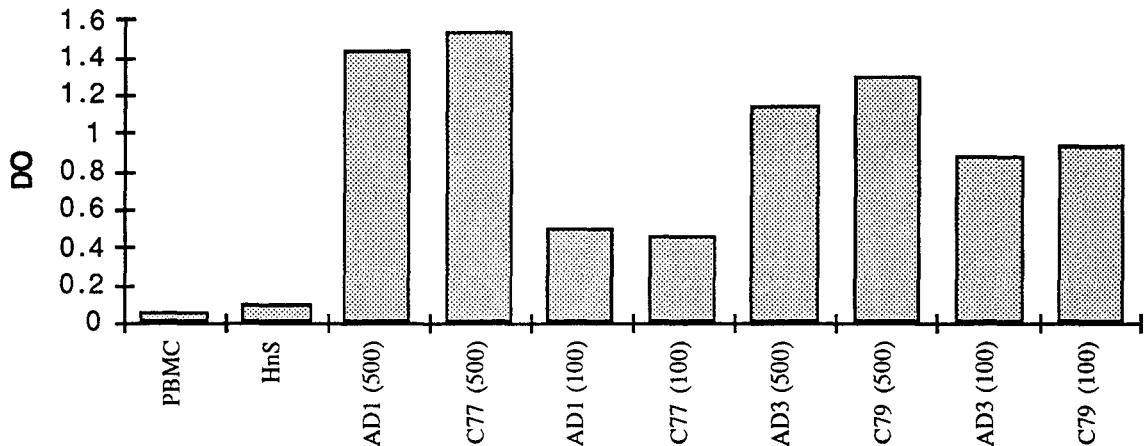


Figure R.48 : test d'ADCC sur les deux lots de production de l'Ac 190/31 (AD1 et C77) et de l'Ac P3X229-14 (AD3 et C79). Les concentrations de sensibilisation étaient de 100 et de 500 ng/ml (précisées à chaque fois entre parenthèses). PBMC : cellules mononucléées seules et HnS : hématies non sensibilisées.

2.3. Evaluation des Acm en test de phagocytose

2.3.1. Etude de la concentration de sensibilisation des hématies Rh(D) positif en test de phagocytose

L'activité de phagocytose des 6 Ac monoclonaux anti-D a été testée à différentes concentrations de sensibilisation : de 10 ng/ml à 500 ng/ml (figure R.49). Plusieurs observations peuvent être faites :

- 1 - à 10 ng/ml, aucune réponse n'a été observée pour l'ensemble des Acm.
- 2 - à la concentration de 100 ng/ml, tous les Acm induisent une phagocytose avec toutefois une plus faible activité pour l'Ac P3X212.
- 3 - à 500 ng/ml, une plus grande hétérogénéité a été observée entre les Acm : les deux Ac P3X212 et HM16 présentent une activité relativement faible, l'activité de l'Ac HM16 est même plus faible qu'avec la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml ; les Ac AD3 et P3X83 induisent une forte activité de phagocytose.

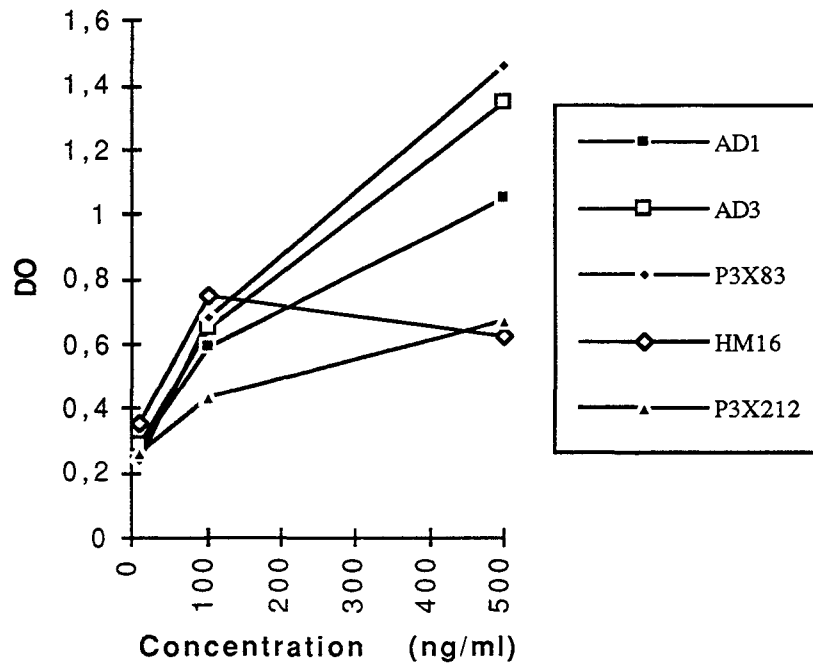


Figure R.49 : test de phagocytose sur monocytes activés avec les Acm anti-D. Les concentrations de sensibilisation utilisées étaient : 10, 100 et 500 ng/ml.

2.3.2. Comparaison des Acm en test de phagocytose sur monocytes activés

Une synthèse de plusieurs tests a permis de comparer l'efficacité des Acm à induire une phagocytose d'hématies Rh(D) positif sensibilisées avec deux concentrations différentes (100 et 500 ng/ml) (figure R.50A et B). Les résultats obtenus à la concentration de 100 ng/ml (figure R.50A) ont mis en évidence des différences entre les Acm quant à leur capacité à induire une phagocytose. Deux anti-D présentaient une activité inférieure à celle du polyclonal P1 avec des pourcentages d'activité de 66,5% pour l'Ac P3X35 et 78,9% pour l'Ac P3X212. Trois autres anti-D ont donné des valeurs comparables à celle obtenue avec le polyclonal anti-D : AD1, AD3 et HM16. Un seul Ac, P3X83, a présenté une activité un peu supérieure à celle du polyclonal anti-D : 135%. Une variabilité importante des résultats a été observée avec par exemple des coefficients de variation de 30% pour l'Ac P3X35 à 40% pour l'Ac HM16.

A la concentration de 500 ng/ml, par contre (figure R.50B), tous les Acm testés ont présenté des pourcentages d'activité inférieurs à la valeur obtenue avec le polyclonal P1 avec des valeurs extrêmes allant de 42% pour l'Ac P3X212 jusqu'à 90% pour l'Ac P3X83.

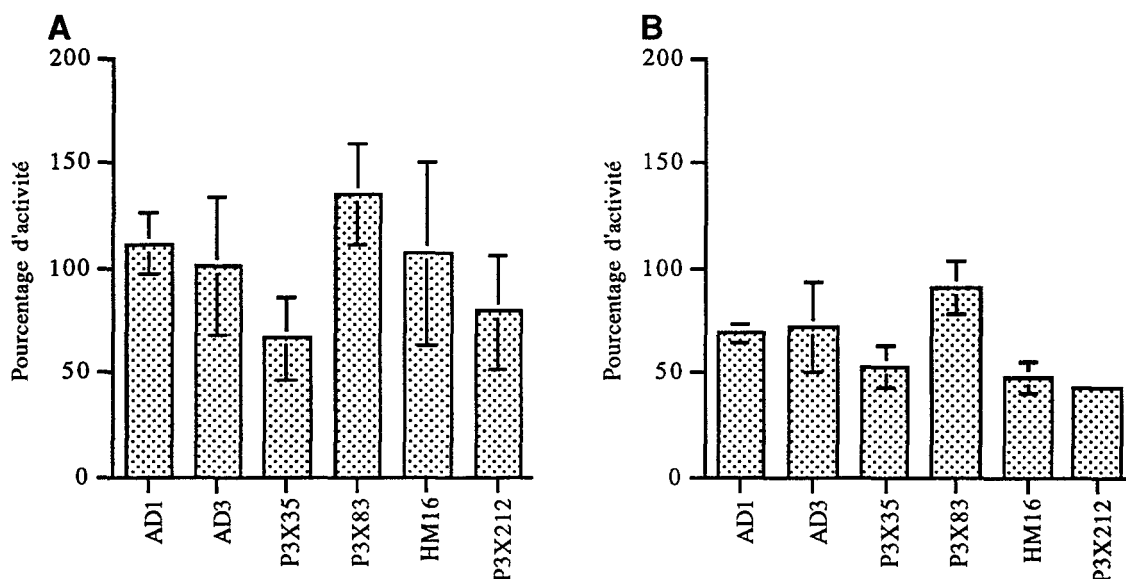


Figure R.50 ; moyenne de 6 tests de phagocytose à 100 ng/ml (A) et de 4 tests à 500 ng/ml (B). Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité correspondant à un rapport entre la valeur de DO obtenue pour un Acm et celle obtenue pour le polyclonal anti-D P1 dans le même test.

Deux autres tests de phagocytose ont également été réalisés à la concentration de 10 µg/ml. Les résultats de la figure R.51 ont confirmé la supériorité du polyclonal anti-D P1 à induire une phagocytose par rapport aux Acm de sous-classe IgG1 lorsque la concentration de la sensibilisation était élevée. Tous les pourcentages d'activité étaient inférieurs à 100%. Une réponse équivalente au polyclonal anti-D a toutefois été observée avec l'Ac AD3 dont le pourcentage d'activité était de 106%.

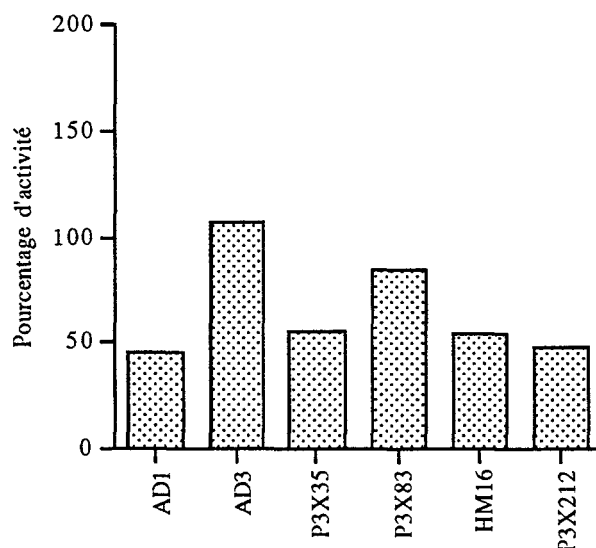


Figure R.51 ; moyenne de 2 tests de phagocytose à la concentration de sensibilisation de 10 µg/ml. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité correspondant au rapport entre la valeur de DO obtenue pour un Acm sur la valeur de DO du polyclonal anti-D P1 dans le même test.

2.3.3. Etude du ratio monocytes activés/hématies

L'influence du ratio monocytes activés/hématies a été étudiée sur la réponse en phagocytose des Acm. Les résultats obtenus (figure R.52) avec trois Acm de sous-classes différentes (IgG1 pour AD1 et P3X83 et IgG3 pour AD3) montrent, comme pour l'ADCC, une augmentation de la réponse en phagocytose pour l'ensemble des Acm lorsque le ratio passe de 1/1 à 1/10. En effet, les valeurs de DO obtenues pour l'Ac AD1 ont augmenté de 0,32 à 1,09 ; pour l'Ac AD3 de 0,57 à 0,85 et pour l'Ac P3X83 de 0,40 à 1,06 alors que les valeurs pour les hématies non sensibilisées n'ont augmenté que de 0,13 à 0,25.

Par contre, avec un ratio de 1/1, l'Ac le plus efficace était l'IgG3 AD3 alors qu'au ratio 1/10, c'est l'IgG1 AD1 qui a donné la meilleure phagocytose. Cette dernière observation est à interpréter avec réserve compte tenu des variations de réponses dues essentiellement aux cellules effectrices d'origines différentes.

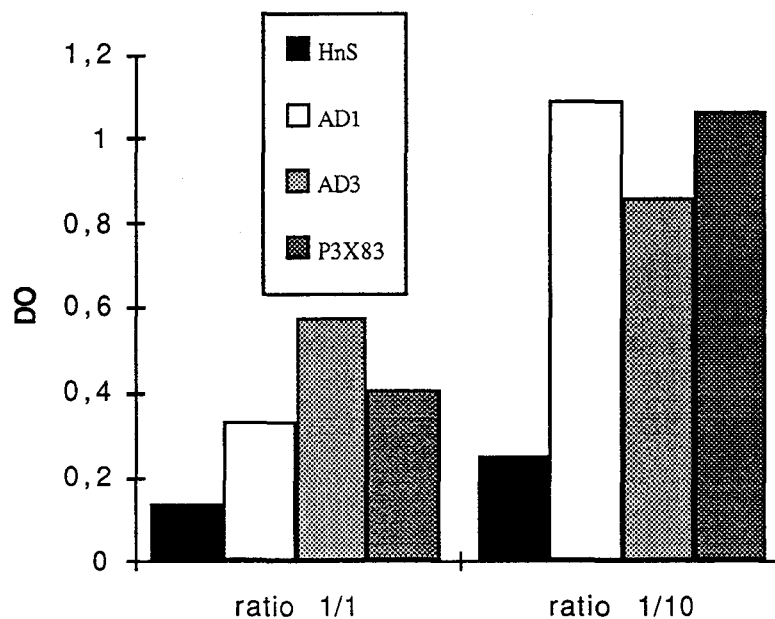


Figure R.52 : test de phagocytose à différents ratios monocytes activés/hématies. Les hématies ont été sensibilisées avec les Acm AD1, AD3 et P3X83 à la concentration de 500 ng/ml et les ratio testés étaient de 1/1 et de 1/10.

2.3.4. Inhibition de la phagocytose en présence d'IgG polyvalentes

En ajoutant des concentrations croissantes d'IgG polyvalentes 1 heure avant de mettre les hématies sensibilisées, une inhibition de la phagocytose a été observée (figure R.53). Cette inhibition a pu être mise en évidence à partir de concentrations d'IgG polyvalentes

de l'ordre de 1 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats obtenus avec l'Ac AD1 et le polyclonal anti-D P1 sont comparables. L'inhibition de la phagocytose médiée par l'Ac AD3 semble plus difficile à obtenir comme le montre la pente de la droite de régression qui est plus faible.

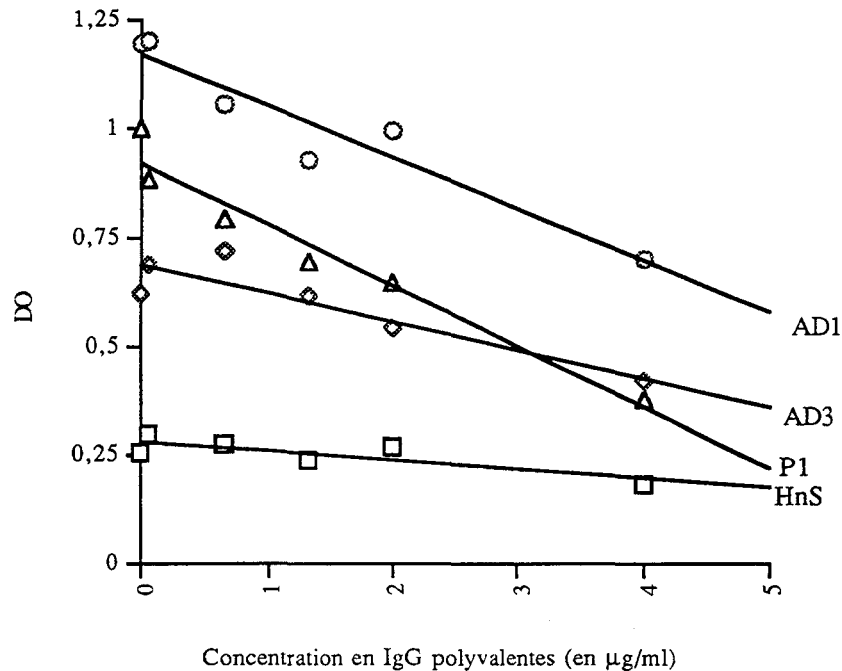


Figure R.53 : test de phagocytose en présence d'IgG polyvalentes. La concentration de sensibilisation des Ac anti-D étaient de 500 ng/ml et les concentrations des IgG polyvalentes utilisées dans le test de 0 ; 0,06 ; 0,6 ; 1,32 ; 2 et 4 $\mu\text{g/ml}$.

2.3.5. Comparaison de l'activité de phagocytose de 2 lots différents des Ac AD1 et AD3

Deux lots d'Ac anti-D avaient été testés en ADCC afin de vérifier l'homogénéité de la réponse fonctionnelle de ces Ac (voir D-2.2.8.). De même, un test phagocytose a été réalisé et les résultats obtenus (figure R.54) montrent une homogénéité de réponse entre deux lots d'Ac. En effet, les valeurs de DO enregistrées à 500 ng/ml étaient pour les Ac AD1 et C77 de 0,89 et 0,90 ; pour les Ac AD3 et C79 de 0,87 et 0,90. A la concentration de 100 ng/ml, les résultats obtenus avec les Ac AD1 et C77 étaient de 1,06 et 1,1 et pour les Ac AD3 et C79 de 0,93 et 0,85.

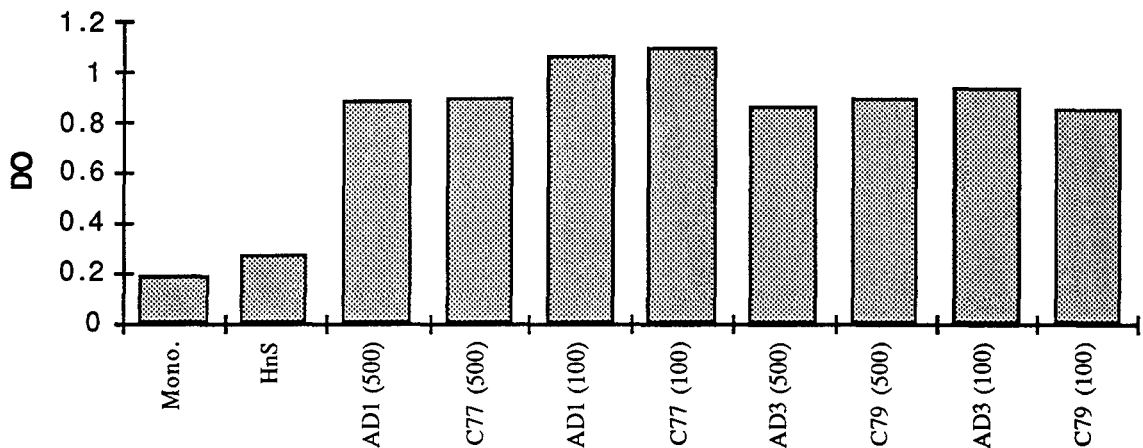


Figure R.54 : test de phagocytose sur les deux lots de production de l'Ac 190/31 (AD1 et C77) et de l'Ac P3X229-14 (AD3 et C79). Les concentrations de sensibilisation étaient de 100 et de 500 ng/ml (précisées à chaque fois entre parenthèses). Mono. : monocytes activés par adhérence et HnS : hématies non sensibilisées.

2.4. Activation du complément par les Ac anti-D

2.4.1. Observation de la fixation de la fraction C_{3b} sur les hématies en test d'agglutination

Un protocole comparable à celui utilisé avec les polyclonaux anti-D a été réalisé avec un Ac anti-Jk^b comme témoin positif. Des hématies sensibilisées avec 10 µg/ml des différents anticorps monoclonaux anti-D ont été incubées en présence de sérum AB puis d'anti-C_{3d}. Aucune agglutination n'a pu être mise en évidence alors que le témoin positif présentait une nette réactivité : agglutinat évalué à +++.

2.4.2. Observation de la fixation de la fraction C_{3b} sur les hématies en test cytométrique

La présence éventuelle de la fraction C_{3b} du complément a été évaluée en cytométrie de flux. Aucun signe d'expression de C_{3b} à la surface des hématies n'a pu être mis en évidence comme en témoigne les pourcentages de fluorescence inférieurs à 10% obtenus avec les différents Ac anti-D (tableau R.17). Un contrôle positif réalisé avec un anti-Jk^b a permis de mettre en évidence environ 30% de cellules marquées.

Acm testés	Pourcentage de cellules marquées
AD1	8,6
AD3	4,7
P3X83	8,1
P3X212	9,4
P3X35	4,9
HM16	6,1
Témoin +	28,9

Tableau R.17 : expression de la fraction C_{3b} à la surface d'hématies en cytométrie de flux. Les hématies ont été sensibilisées avec les anti-D, puis incubées avec du sérum AB. L'observation cytométrique a été réalisée après une incubation avec l'Ac anti- C_{3d} et avec une anti-Ig murine-FITC.

PARTIE E

Relation entre la réactivité des Ac anti-D et leur activité fonctionnelle

Les parties C et D du chapitre Résultats ont traité respectivement de la réactivité des Ac sur les globules rouges et de leurs activités fonctionnelles. Il semblait toutefois important de savoir s'il existait une corrélation entre la quantité d'anti-D fixés sur les hématies et les réponses obtenues dans les tests d'ADCC et de phagocytose.

Une première approche a été d'analyser les résultats de Sol-ELISA présentés à la partie C de ce travail (voir C-2.1.2. - figure R.27) avec les résultats d'activité fonctionnelle de la partie D (voir D-2.2.3. - figures R.40 et D-2.3.2. - figure R.50). Alors que des différences importantes d'activité biologique étaient observées entre, par exemple, les deux Ac HM16 et P3X83, les résultats de Sol-ELISA étaient relativement homogènes pour ces deux Ac. Toutefois, les écart-types obtenus sur les moyennes étant importants, que ce soient pour les tests fonctionnels et que pour les tests de Sol-ELISA, l'interprétation des résultats était donc très difficile.

De ce fait, il a semblé nécessaire de refaire des expériences d'ADCC et de phagocytose, en parallèle avec une quantification des anti-D fixés à la surface des globules rouges par les techniques de Sol-ELISA et de cytométrie de flux, en prenant les mêmes hématies sensibilisées.

1. Test d'ADCC et quantification des anti-D fixés

Plusieurs expériences d'ADCC ont été réalisées et une quantification des anti-D fixés à la surface des globules rouges utilisés en ADCC a été effectuée en parallèle.

1.1. Réalisation des tests aux concentrations de sensibilisation de 50 et 100 ng/ml

Les résultats de la figure R.55 montrent qu'il existe une relation entre la quantité d'IgG fixées (déterminée par Sol-ELISA) et la réponse ADCC aux concentrations de sensibilisation de 50 et 100 ng/ml.

En effet, à la concentration de 50 ng/ml, seul l'Ac HM16 a été observé avec une quantité non négligeable d'IgG fixées à la surface des globules rouges (figure R.55A) en corrélation avec une réponse ADCC élevée (figure R.55B). Pour les autres Acm, les réponses en Sol-ELISA et en ADCC étaient comparables aux témoins négatifs.

A la concentration de 100 ng/ml, les quantités d'anti-D fixées sur les hématies pour les Ac HM16 et P3X83 étaient supérieures aux autres Acm et les réponses ADCC induites par ces deux Ac étaient également plus élevées.

Les résultats de la figure R.55 ont, par conséquent, montré qu'aux concentrations de sensibilisation de 50 et 100 ng/ml, une corrélation pouvait être établie entre la quantité d'IgG fixées et la réponse ADCC et ce quel que soit l'Ac.

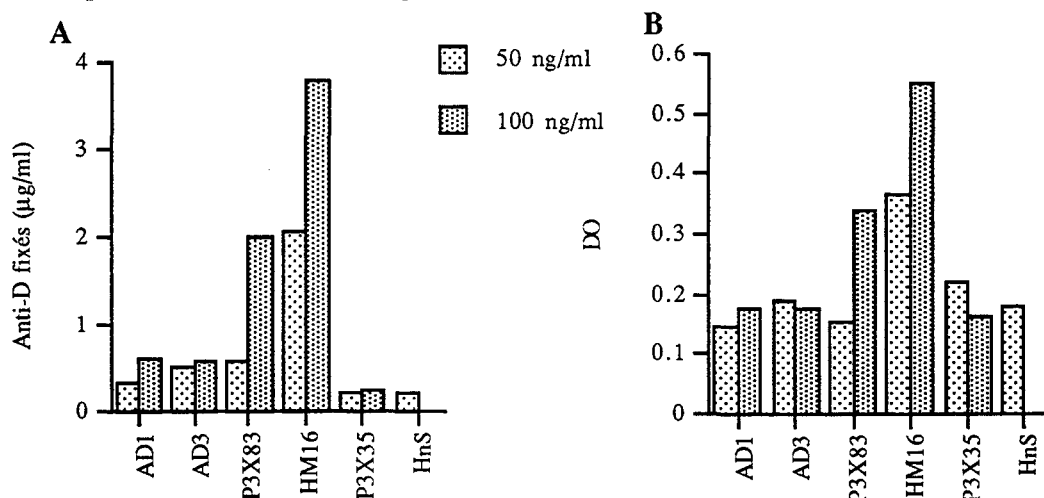


Figure R.55 : tests de Sol-ELISA (A) et d'ADCC (B) réalisés sur les mêmes hématies sensibilisées. Les Acm testés étaient AD1, AD3, P3X83, HM16 et P3X35 aux concentrations de sensibilisation de 50 et 100 ng/ml. HnS : hématies non sensibilisées.

Une autre expérience a été réalisée en mesurant la quantité d'IgG fixées, cette fois, par cytométrie en flux. Les concentrations de sensibilisation testées étaient de nouveau 50 et 100 ng/ml.

L'analyse des résultats obtenus a permis de confirmer ceux présentés précédemment à faible concentration, c'est à dire une corrélation entre la quantité d'IgG fixées et le niveau de réponse en ADCC. En effet, la première série de résultats (figure R.56) a permis de vérifier qu'à faible concentration (50 ng/ml), les quantités d'Ac HM16 fixés sur les globules rouges étaient supérieures (moyenne de fluorescence à 0,4) aux valeurs obtenues avec les autres Ac

(moyennes de fluorescence inférieures à 0,27 : valeur pour l'Ac AD1). A cette concentration de sensibilisation, l'Ac HM16 est, par ailleurs, très nettement supérieur aux autres Ac quant à sa capacité à induire une ADCC.

A la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml, il a été possible de corréler les variations obtenues entre les Ac lors du test cytométrique avec celles obtenues lors du test d'ADCC. Ainsi les Ac qui se fixent le mieux induisent une activité ADCC plus forte.

Toutefois, il n'a pas été possible d'observer un même niveau de réponse ADCC induite par deux Ac lorsque ceux-ci sont fixés sur les hématies en quantité égales. Par exemple, la moyenne de fluorescence pour l'Ac AD1 à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml est comparable à celle de l'Ac HM16 à la concentration de 50 ng/ml (respectivement de 0,36 et de 0,38) alors que les réponses ADCC induites par ces deux Ac sont différentes (respectivement à des DO de 0,29 et de 0,56).

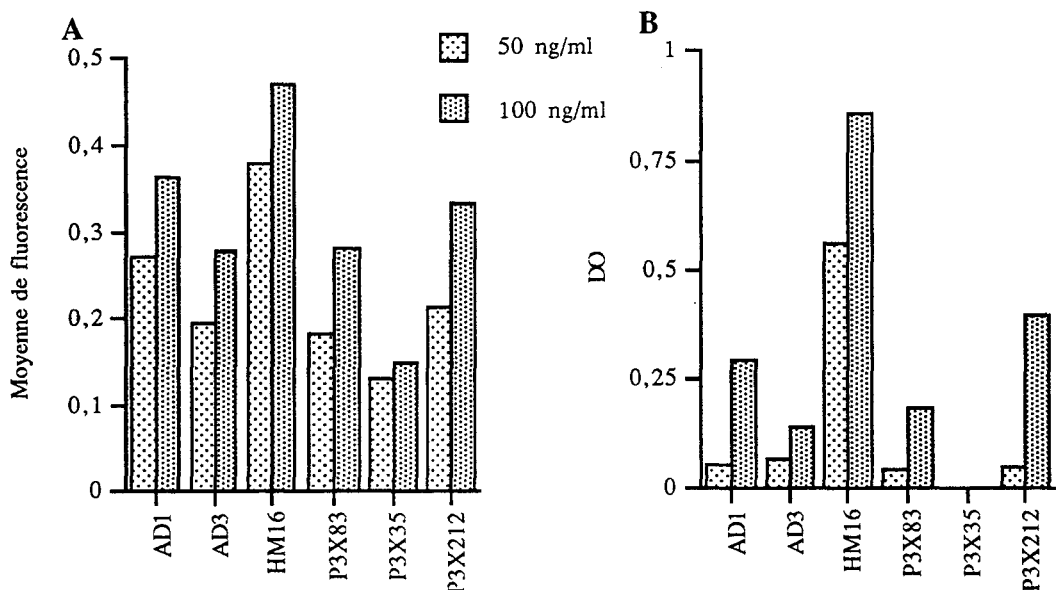


Figure R.56 : observation cytométrique de la quantité d'IgG fixées sur les hématies (A) et test d'ADCC (B). Les hématies ont été sensibilisées par tous les Ac aux concentrations de sensibilisation de 50 et 100 ng/ml.

1.2. Réalisation des tests aux concentrations de sensibilisation de 100 et 500 ng/ml

Un test d'ADCC a été réalisé aux concentrations de sensibilisation de 100 ng/ml et de 500 ng/ml. Les résultats de la figure R.57 ont montré un taux d'IgG fixées plus important à la concentration de 500 ng/ml par rapport à 100 ng/ml ainsi qu'une activité ADCC plus intense mais sans qu'il y ait de corrélation clairement établie. En effet, la quantité d'anti-D fixés sur les

hématies, à la concentration de sensibilisation de 500 ng/ml, est supérieure pour l'Ac HM16 à celle de l'Ac P3X83 mais ce dernier Ac a induit une réponse ADCC plus importante que l'Ac HM16.

De plus, pour des quantités d'anti-D fixés comparables, l'activité ADCC pouvait être différente. Par exemple, l'Ac AD1 avait un taux de fixation à 500 ng/ml comparable à celui de HM16 à la concentration de 100 ng/ml (respectivement à 3,39 et 3,77 µg/ml) alors que les réponses ADCC étaient pour ces deux Ac respectivement à des valeurs de DO de 0,75 et 0,55.

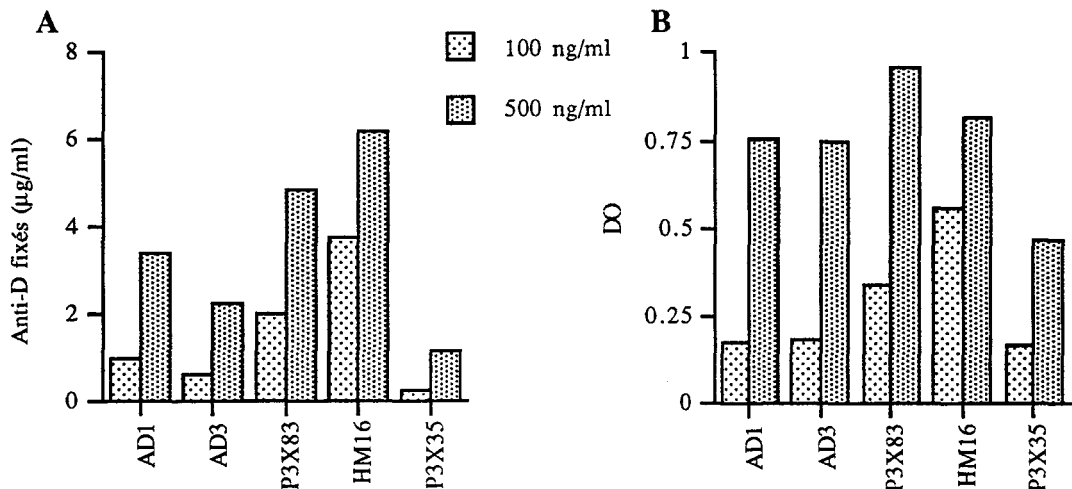


Figure R.57 : tests de Sol-ELISA (A) et d'ADCC (B) réalisés sur les mêmes hématies sensibilisées. Les Acm testés étaient AD1, AD3, P3X83, HM16 et P3X35 aux concentrations de sensibilisation de 100 et 500 ng/ml.

1.3. Réalisation des tests aux concentrations de sensibilisation de 500 et 1000 ng/ml

Une autre expérience a été réalisée cette fois avec des concentrations de sensibilisation plus importantes (500 et de 1000 ng/ml). Les résultats présentés à la figure R.58 ont permis de faire plusieurs constatations :

- l'Ac HM16 aux fortes concentrations est moins efficace à induire une ADCC. De plus, une saturation de la réponse a été observée (figure R.58B) malgré une augmentation de la quantité d'IgG fixées.

- l'Ac AD1 induit une activité ADCC élevée mais une saturation de la réponse ADCC a également été observée.

- l'Ac P3X83 induit la plus forte activité ADCC. De plus, à ces concentrations, la saturation de la réponse ADCC n'a pas été observée avec l'Ac P3X83, de même qu'avec les Ac P3X212 et P3X35.

- l'Ac AD3 (IgG3) induit, quant à lui, une activité ADCC inférieure aux IgG1, contrairement aux résultats précédents.

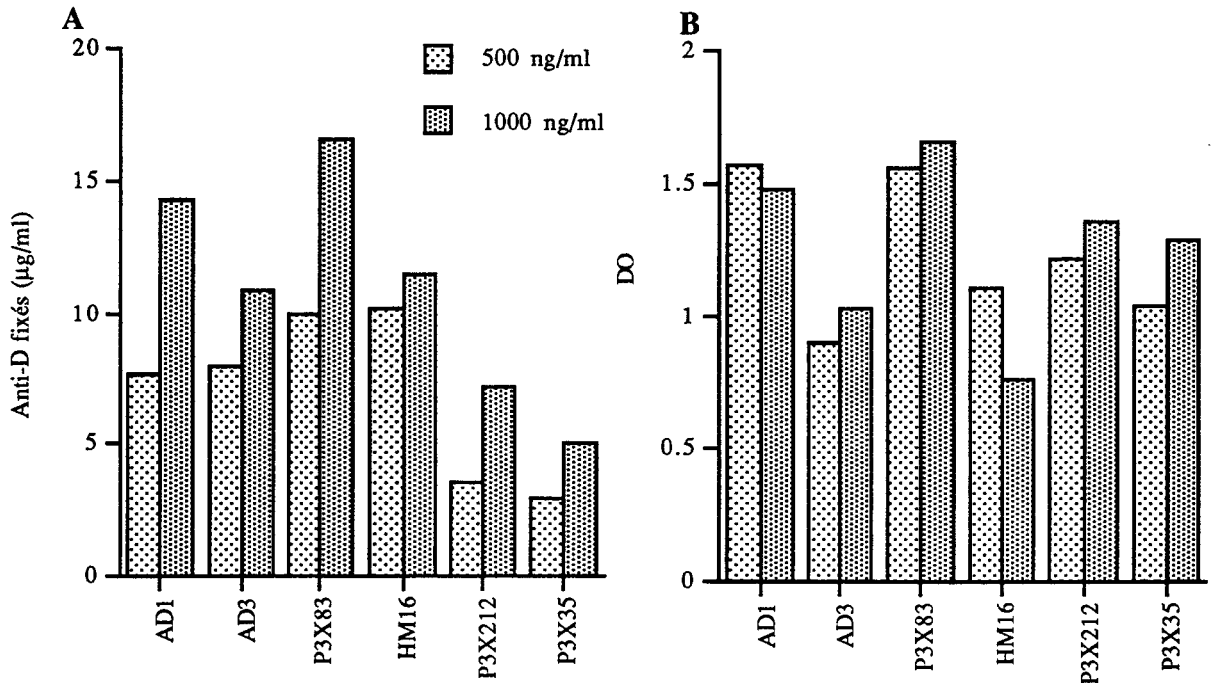


Figure R.58 : tests de Sol-ELISA (A) et d'ADCC (B) réalisés sur les mêmes hématies sensibilisées. Les Ac testés étaient AD1, AD3, P3X83, HM16, P3X35 et P3X212 aux concentrations de sensibilisation de 500 et 1000 ng/ml.

En résumé, les résultats précédents ont montré, qu'en règle générale à faible concentration de sensibilisation, plus il y avait d'Ac fixés sur les hématies plus la réponse ADCC était importante. Par contre, à une concentration plus élevée, cette corrélation ne pouvait plus être établie.

De plus, il semblerait qu'à des taux de fixation équivalents, deux Ac n'induiraient pas forcément la même réponse ADCC.

1.4. Relation entre la quantité d'IgG fixées sur les hématies et la réponse en ADCC pour le polyclonal anti-D P1 par rapport aux Ac monoclonaux anti-D

Les résultats obtenus à la partie D du chapitre Résultats ont mis en évidence une activité ADCC plus faible pour l'Ac polyclonal anti-D P1 par rapport aux Ac monoclonaux

anti-D lorsque les concentrations de sensibilisation sont faibles comme par exemple à 100 ng/ml. Par contre, à une concentration plus forte (500 ng/ml), la réponse ADCC du polyclonal anti-D P1 est, sinon supérieure, du moins équivalente à celles obtenues avec les Ac monoclonaux.

Le résultat du test d'ADCC de la figure R.59B illustre bien ce phénomène. En effet, la réponse ADCC de l'Ac polyclonal anti-D a été observée à une valeur de DO de 0,43 à la concentration de 125 ng/ml alors que tous les Acm anti-D étaient supérieurs à cette valeur (1,29 pour l'Ac HM16, 0,95 pour l'Ac P3X83, 0,83 pour l'Ac AD1, 0,72 pour l'Ac P3X212 et 0,58 pour l'Ac P3X35) sauf l'Ac AD3 observé à 0,37. Par ailleurs, lorsque la concentration de sensibilisation augmente, l'Ac polyclonal anti-D est capable d'induire une activité ADCC supérieure à celle obtenue avec certains Acm. En effet, les valeurs de DO obtenues à la concentration de 1000 ng/ml étaient de 1,35 pour l'Ac polyclonal anti-D, de 1,45 pour l'Ac P3X83, de 1,47 pour l'Ac AD1, de 1,36 pour l'Ac P3X212, de 1,35 pour l'Ac HM16, de 1,19 pour l'Ac P3X35 et de 1,02 pour l'Ac AD3.

La figure R.59A indique la quantification des anti-D fixés sur les mêmes hématies que celles utilisées en ADCC. Les résultats obtenus montrent une fixation d'anti-D inférieure pour le polyclonal anti-D P1 par rapport aux Acm AD1, HM16, P3X83 et AD3 lorsque la concentration était de 125 à 1000 ng/ml avec des différences de fixation assez significatives à la concentration de 1000 ng/ml.

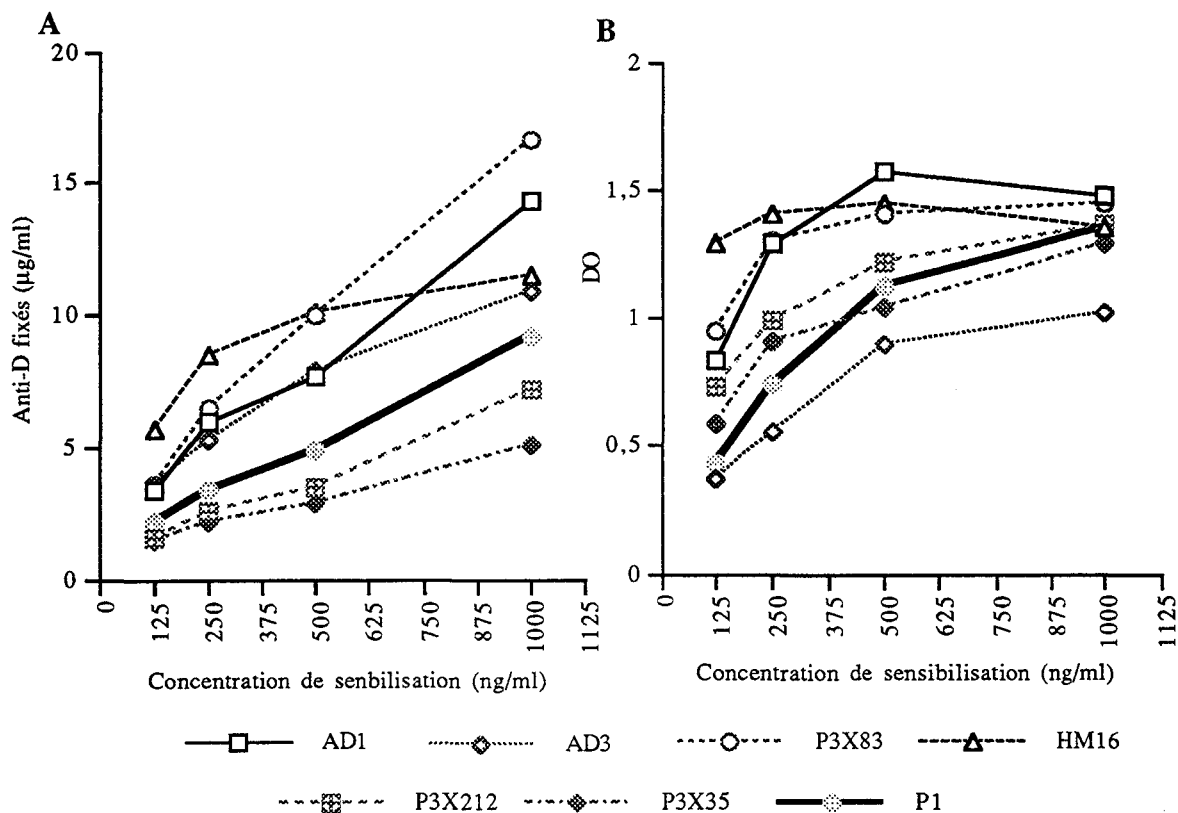


Figure R.59 : tests de Sol-ELISA (A) et d'ADCC (B) réalisés sur les mêmes hématies sensibilisées. Les hématies ont été sensibilisées avec tous les Acm anti-D ainsi qu'avec l'Ac polyclonal anti-D. Les concentrations de sensibilisation étaient de 125, 250, 500 et 1000 ng/ml.

2. Test de phagocytose et quantification des anti-D fixés sur les hématies

Une étude similaire à la précédente a également été réalisée en test de phagocytose. Les résultats obtenus (figure R.60) ont montré une corrélation entre la quantité d'IgG fixées et la réponse en phagocytose pour tous les Ac anti-D. En effet, l'Ac HM16 a été observé avec un taux d'IgG fixées supérieur aux autres Ac en corrélation avec une meilleure activité de phagocytose aux concentrations de 50 et 100 ng/ml. De plus, malgré l'augmentation de la fixation d'anti-D à la concentration de 500 ng/ml, la phagocytose induite par l'Ac HM16 n'augmentait plus. Par contre, et notamment avec les Ac AD1 et P3X83, l'augmentation de la fixation était corrélée avec une meilleure activité de la phagocytose.

D'autre part, lorsque 2 Ac se fixent sur les globules rouges en quantité comparable (comme par exemple entre les Ac AD1 et P3X83 ou les Ac P3X212 et P3X35), une réponse en

phagocytose comparable a également été observée. Par contre, cette relation n'a pas été observée entre l'Ac HM16 et les autres Acm.

Les résultats obtenus en phagocytose avec l'Ac polyclonal anti-D P1 ont été conformes aux moyennes présentées à la figure R.50 (voir D-2.3.2.) dans la mesure où l'activité de phagocytose était supérieure aux Acm à la concentration de 500 ng/ml (figure R.60B). En parallèle, ce même Ac polyclonal anti-D n'avait pas été observé avec une augmentation significative de la quantité d'IgG fixées (figure R.60A).

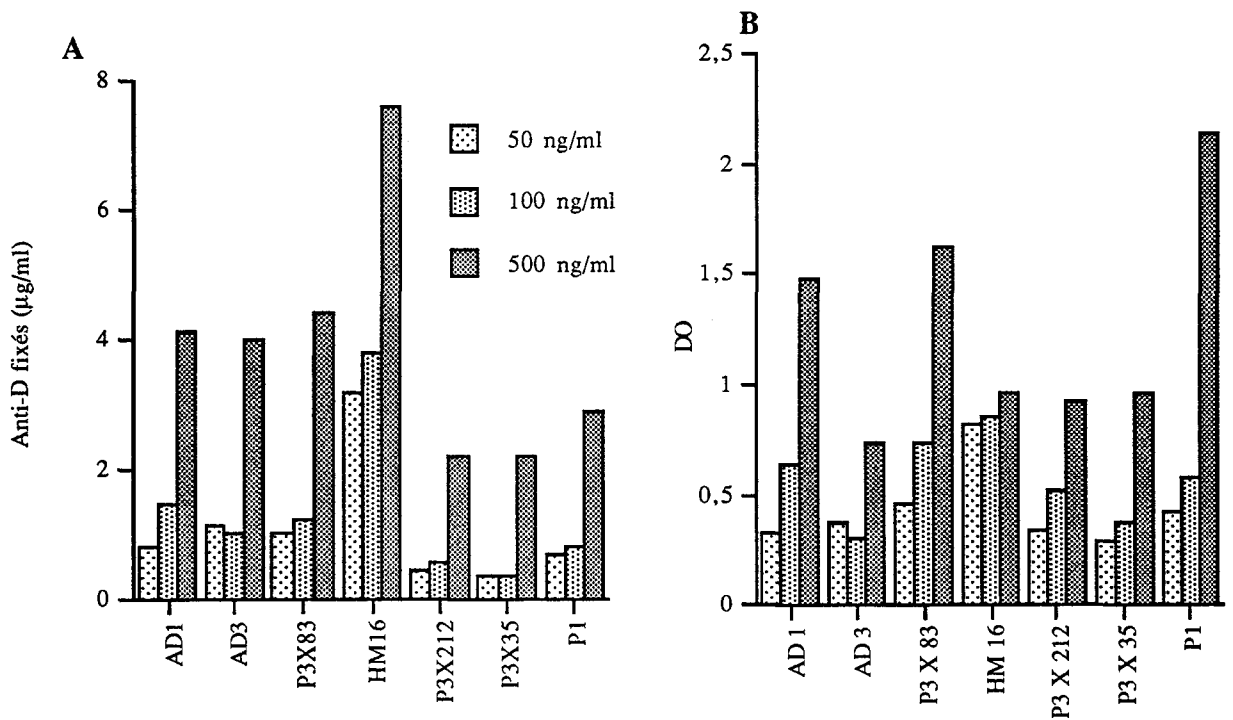


Figure R.60 : test de Sol ELISA (A) et de phagocytose (B) réalisés sur les mêmes hématies sensibilisées. Les Ac testés étaient AD1, AD3, P3X83, HM16, P3X212, P3X35 et l'Ac polyclonal anti-D P1 aux concentrations de sensibilisation de 50, 100 et 500 ng/ml.

PARTIE F

Etude de différentes combinaisons de deux Acm

Dans toutes les expériences présentées jusqu'à présent, les Ac monoclonaux ont toujours été testés individuellement. Compte tenu du fait que les Ig polyclonales spécifiques anti-D utilisées en thérapeutique sont constituées d'un mélange de plusieurs IgG anti-D, il est apparu logique d'essayer de mélanger des Acm anti-D.

Différentes combinaisons composées de deux Acm anti-D ont donc été testées de façon à voir si, d'une part, il était possible de fixer une quantité plus importante d'anticorps sur les hématies Rh(D) positif et, d'autre part, si l'association de deux anti-D pouvait entraîner une augmentation des réponses d'ADCC et de phagocytose.

Les chapitres présentés ci-dessous présentent les réponses obtenues dans les tests d'ADCC et de phagocytose. La quantification des anti-D fixés sur les globules rouges n'a pas fait l'objet d'une partie à part mais a été présentée en relation avec les tests fonctionnels.

1. Etude en test d'ADCC

1.1. Test d'ADCC avec des cellules mononucléées comme cellules effectrices

1.1.1. Mélange de deux Acm en quantités égales

Différents mélanges d'Acm, en quantité égale, ont été réalisés pour la sensibilisation des hématies. Pour cela, les concentrations utilisées devaient être non saturantes pour pouvoir être testées en ADCC. Par conséquent, les concentrations de 50 et 100 ng/ml ont été utilisées, puis des mélanges de 2 Acm ont été réalisés avec chaque Acm pris à la concentration de 50 ng/ml.

Si l'on compare les résultats d'ADCC (figure R.61A) obtenus avec les mélanges de 2 Acm à l'activité ADCC observée avec chaque Ac testé séparément à la concentration de sensibilisation de 50 ng/ml, les commentaires suivants peuvent être faits :

- une comparaison des valeurs obtenues en ADCC avec les différents mélanges d'Ac par rapport à ceux observés pour chaque Ac testés isolément à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml, n'a pas permis de mettre en évidence d'effet synergique. Par exemple, avec l'Ac HM16 testé seul à la concentration de 100 ng/ml, une DO de 0,86 a été obtenue ; les mélanges des Ac HM16 et AD1 ou de HM16 et P3X212 ont donné des valeurs de DO de 0,75 et 0,82 respectivement (figure R.61A). Des observations identiques peuvent être faites avec d'autres associations d'Ac.

- aucun effet de sommation n'a été obtenu avec les autres combinaisons d'Ac.

- l'association de 2 IgG1 semble donner de meilleurs résultats que le mélange d'une IgG1 et de l'IgG3 (AD3).

- par contre, une augmentation de l'effet ADCC a été enregistrée avec les mélanges suivants : AD1/HM16, AD1/P3X83, AD1/P3X212, HM16/P3X212 et P3X83/P3X212. Cet effet pourrait être dû à la concentration plus élevée du mélange (100 ng/ml) par rapport à celle des Ac testés isolément (50 ng/ml).

Une étude parallèle a été réalisée en cytométrie de flux avec les mêmes hématies que celles utilisées pour le test d'ADCC précédent afin de contrôler la fixation des Ac sur ces hématies Rh(D) positif (figure R.61B).

Une fluorescence légèrement plus importante a été observée en mélangeant les Ac AD1 et HM16 (fluorescence de 0,42) et les Ac AD1 et P3X83 (fluorescence de 0,35) par rapport aux Ac testés seuls à la concentration de 50 ng/ml. Les différences ne sont toutefois pas importantes. Par contre, si l'on compare les moyennes de fluorescence obtenues avec les mélanges et les Ac testés à la concentration de 100 ng/ml, aucun effet additionnel n'a été observé.

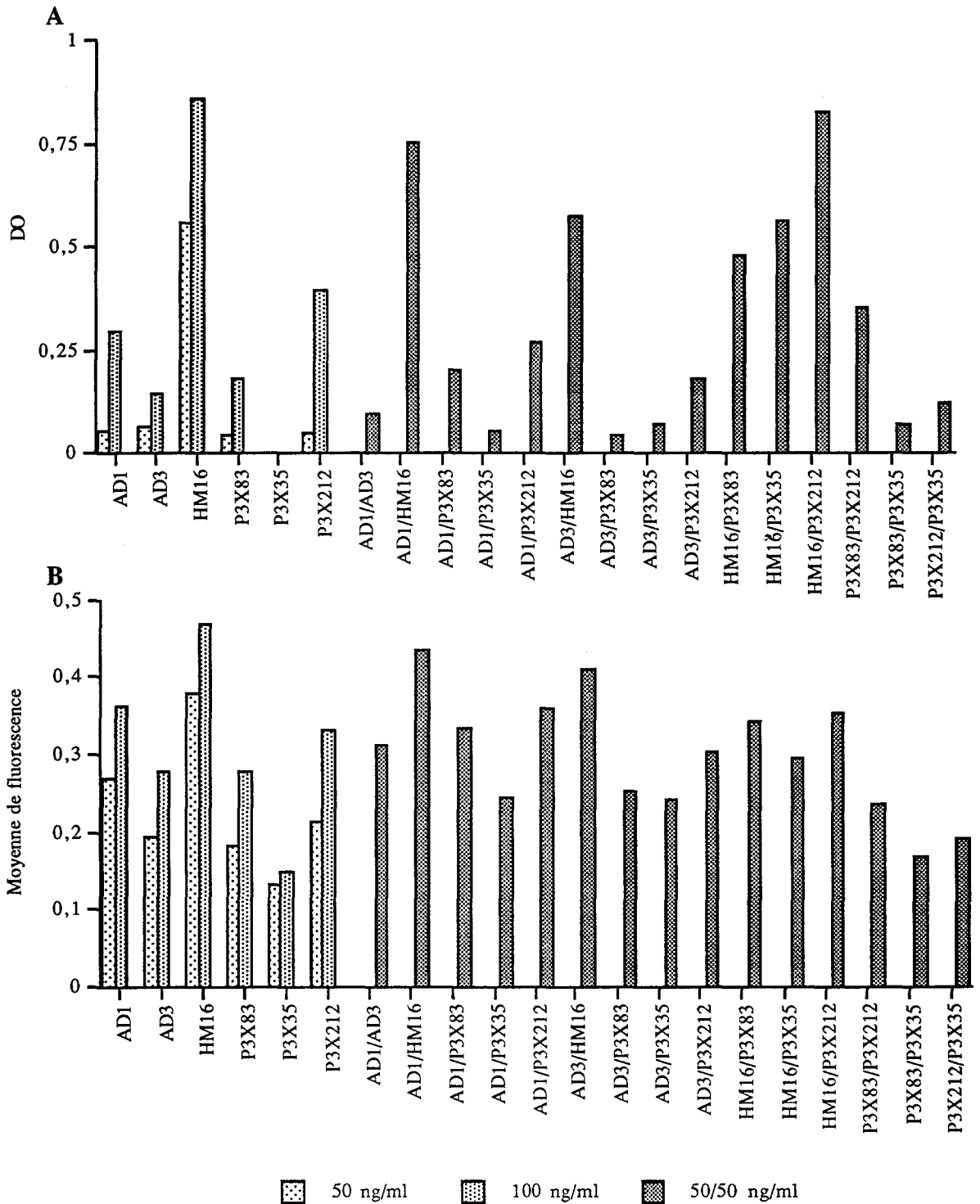


Figure R.61 : étude de différentes combinaisons de 2 Ac en test d'ADCC (A) et de cytométrie de flux (B). Les hématies ont été sensibilisées avec les Ac AD1, AD3, HM16, P3X83, P3X35 et P3X212 aux concentrations de sensibilisations de 50 et 100 ng/ml. Des hématies ont été ensuite sensibilisées avec des mélanges de deux Ac aux concentrations de 50/50 ng/ml.

Une autre expérience similaire à la précédente a été faite en contrôlant la fixation des Ac sur les hématies avec le test Sol-ELISA. Les résultats obtenus lors de cette deuxième expérience

ont confirmé les résultats précédents, à savoir l'absence de synergie pour les mélanges testés aussi bien en réponse ADCC (figure R.62A) que dans la quantité d'anti-D fixés (figure R.62B).

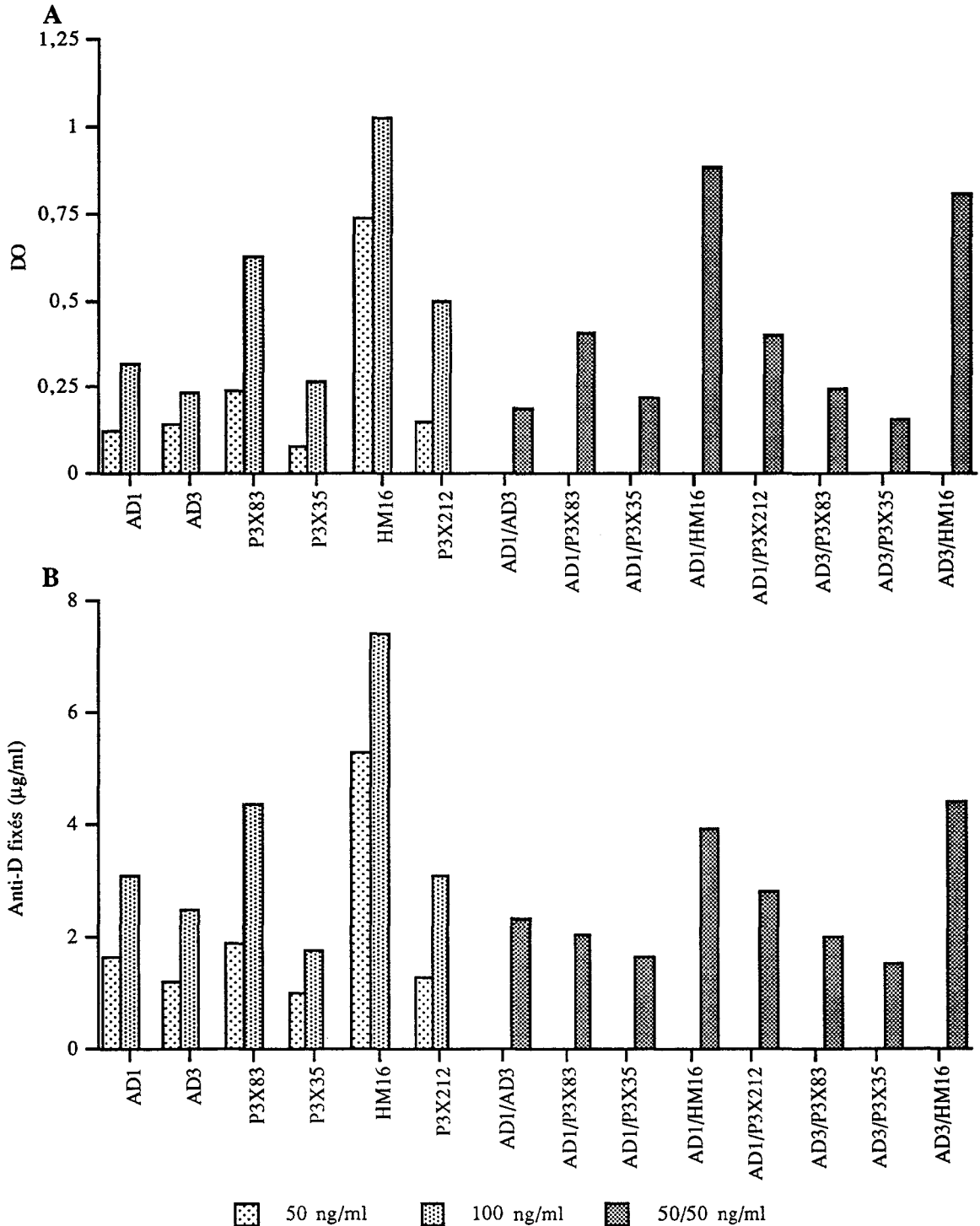


Figure R.62 : étude de différentes combinaisons de 2 Acm en test d'ADCC (A) et de Sol-ELISA (B). Les hématies ont été sensibilisées avec les Acm AD1, AD3, HM16, P3X83, P3X35 et P3X212 aux concentrations de sensibilisations de 50 et 100 ng/ml. Des hématies ont été ensuite sensibilisées avec des mélanges de deux Ac aux concentrations de 50/50 ng/ml.

1.1.2. Mélange de deux Acm en quantités variables

Une première étude en ADCC a été réalisée en sensibilisant des hématies avec des proportions différentes d'un mélange d'Ac AD1 (IgG1) et AD3 (IgG3). La concentration finale en Ac était de 1000 ng/ml et les proportions entre ces deux Acm étaient variables avec des proportions pour l'Ac AD1 de 0, 25, 50, 75 et 100%. De plus, chaque Ac avait été testé séparément à la concentration à laquelle il se trouvait dans le mélange afin d'évaluer la part de l'activité ADCC due à l'Ac isolé.

Les résultats obtenus (figure R.63) montrent que les réponses ADCC avec les hématies sensibilisées par les mélanges diminuent lorsque la proportion en IgG3 dans le mélange augmente. En effet, à la proportion de 100% d'IgG1 la valeur de DO était de 2,0, à 75% de 1,52, à 50% de 1,18, à 25% de 1,03 et à 0% (soit 100% d'IgG3) la valeur de DO était de 0,89.

Si l'Ac AD1 est testé seul, une activité ADCC importante a été obtenue ; elle est globalement comparable aux différentes concentrations de sensibilisation testées : DO de l'ordre de 2. L'activité ADCC induite par l'Ac AD3 est plus faible et diminue légèrement lorsque la concentration en Ac diminue : DO de 0,89 à la concentration de 1000 ng/ml et DO de 0,69 à la concentration de 250 ng/ml.

Ces résultats ont montré qu'il n'y avait pas de synergie d'action entre les 2 Ac AD1 et AD3. De plus, une inhibition de l'activité induite par l'Ac AD1 a été montrée pour chaque mélange contenant 25, 50 ou 75% d'IgG3 (figure R.63).

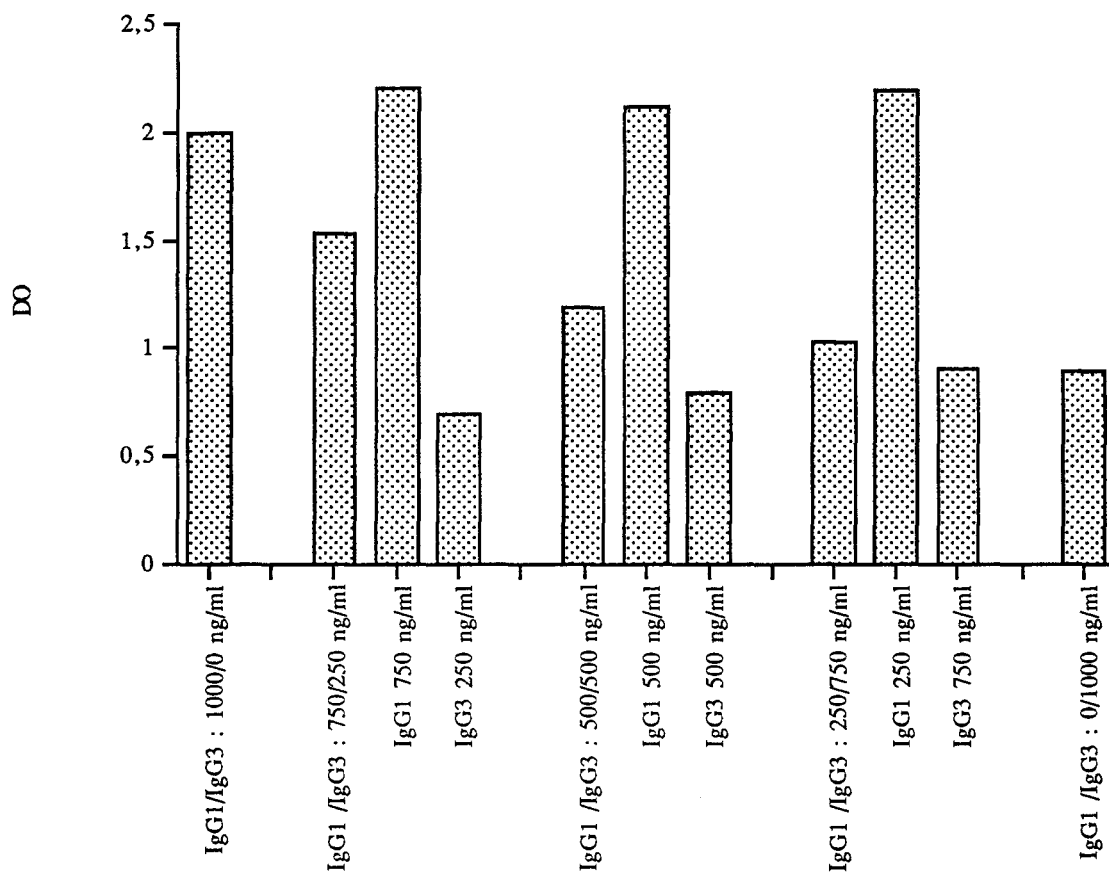


Figure R.63 : test d'ADCC avec des hématies sensibilisées par différents mélanges des Ac AD1 et AD3. La concentration finale de mélange était de 1000 ng/ml et les proportions d'IgG3, par exemple, étaient de 0 ; 25 ; 50 ; 75 et 100% (le complément étant réalisé avec l'IgG1). Les Ac seuls ont également été testés aux concentrations où ils se trouvaient dans les mélanges.

Une autre expérience a été réalisée en mélangeant à l'IgG3 AD3 une IgG1 parmi les Ac HM16, P3X83 et AD1. La concentration finale était cette fois plus faible que la précédente, soit 100 ng/ml.

Les résultats obtenus avec les mélanges contenant les Ac AD3/AD1 et AD3/P3X83 n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet synergique en ADCC (résultats non présentés). De plus, l'écart entre la réponse ADCC lorsque l'Ac AD3 est à 100% dans le mélange et la réponse ADCC lorsque l'IgG1 est à 100% est trop faible pour permettre une interprétation correcte.

Par contre les résultats obtenus avec le mélange d'Ac AD3/HM16 a permis de montrer une inhibition de l'activité ADCC de l'Ac HM16 lorsque l'Ac AD3 est en mélange dans une proportion supérieure à 50% (figure R.64)

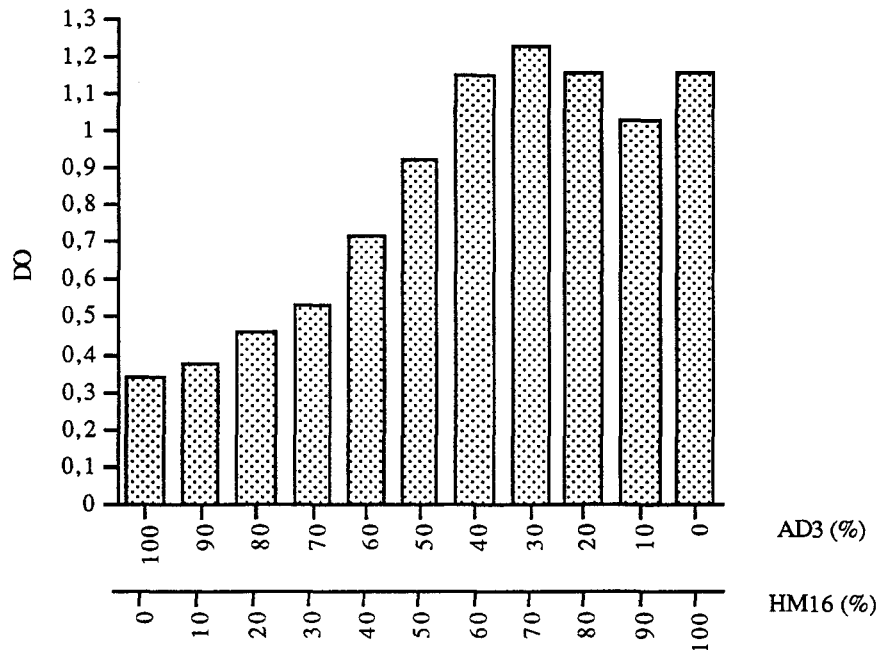


Figure R.64 : test d'ADCC avec des hématies sensibilisées par des mélanges composés des Ac AD3 et HM16. La concentration finale des mélanges était de 100 ng/ml et les proportions en AD3 et en HM16 étaient variables de 10 en 10%.

1.2. Test d'ADCC avec des monocytes activés comme cellules effectrices

Une étude de la réponse ADCC induite par des mélanges d'Ac m a également été réalisée avec des monocytes activés comme cellules effectrices. Les réponses obtenues (figure R.65) n'ont pas permis la mise en évidence de synergies quelle que soit la composition du mélange. De plus, l'utilisation de l'Ac AD3 en mélange avec une IgG1 ne permet pas l'obtention d'un signal supérieur à celui obtenu pour une IgG1 testée seule à 50 ng/ml.

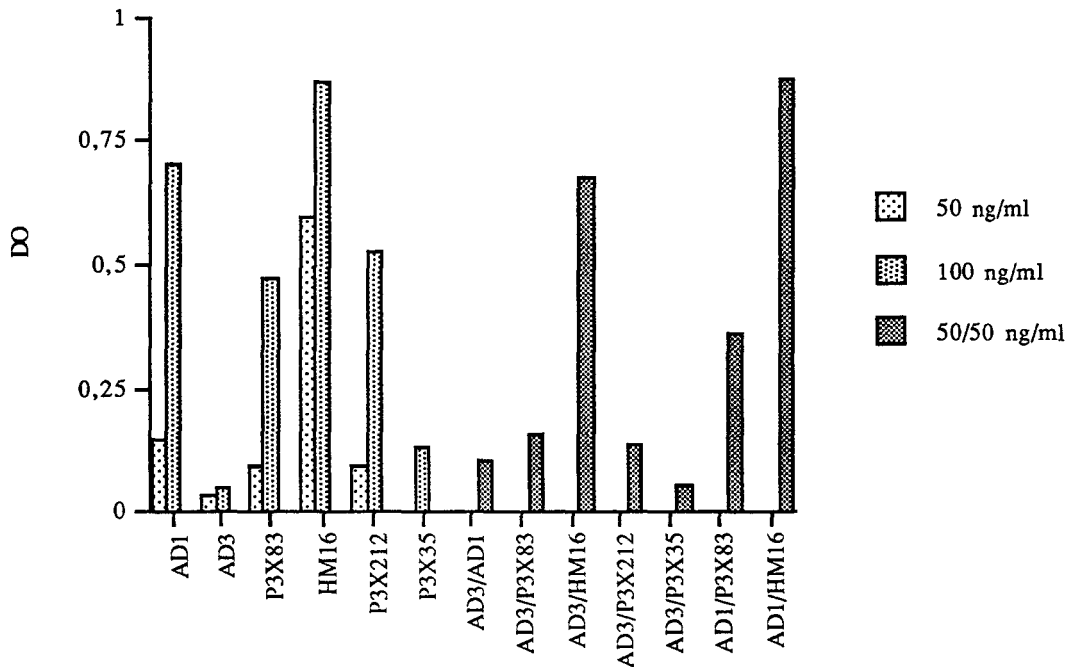


Figure R.65 : test d'ADCC avec des monocytes activés comme cellules effectrices. Les hématies ont été sensibilisées avec les Acm AD1, AD3, HM16, P3X83, P3X35 et P3X212 aux concentrations de sensibilisations de 50 et 100 ng/ml. Des hématies ont été ensuite sensibilisées avec des mélanges de deux Ac aux concentrations de 50/50 ng/ml.

2. Etude en test de phagocytose

2.1. Mélange de deux Acm en quantités égales

Trois tests de phagocytose ont été réalisés pour mettre en évidence si l'association de 2 Acm anti-D pouvait induire une activité supérieure à celle obtenue avec les Ac testés séparément. Pour cela, chaque Ac a été utilisé à 2 concentrations de sensibilisation : 50 et 100 ng/ml. Des mélanges de 2 Acm ont été préparés avec une concentration de 50 ng/ml pour chaque Ac (concentration finale de 100 ng/ml).

Les résultats des tests de phagocytose ont montré un effet synergique significatif lorsque les IgG1 sont associées avec l'Ac AD3 et aucun effet similaire n'a été obtenu avec les mélanges de 2 IgG1. Toutefois, l'association de l'Ac AD3 avec une IgG1 n'a pas toujours permis d'induire un effet synergique.

La figure R.66 est la représentation des résultats obtenus pour 1 des 3 tests de phagocytose. Dans ce test, une synergie avait été obtenue avec les mélanges des Acm suivants : AD3/HM16 et AD3/P3X212 mais pas avec AD3/AD1, AD3/P3X83 et AD3/P3X35.

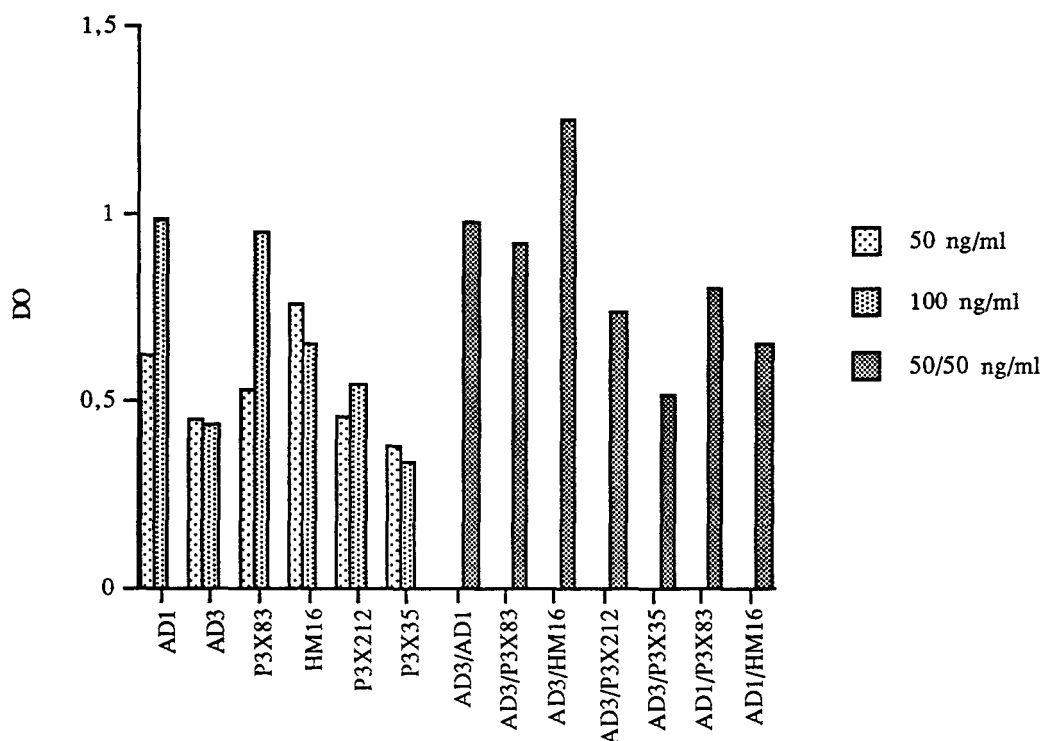


Figure R.66 : test de phagocytose avec des mélanges d'Acm anti-D. Les hématies ont été sensibilisées avec les Acm AD1, AD3, HM16, P3X83, P3X35 et P3X212 aux concentrations de sensibilisations de 50 et 100 ng/ml. Des hématies ont été ensuite sensibilisées avec des mélanges de deux Ac aux concentrations de 50/50 ng/ml.

Sur l'ensemble des trois tests de phagocytose, une synergie a toujours été obtenue avec les mélanges des Acm AD3/HM16 et AD3/P3X212. Une synergie avec le mélange des Acm AD3/P3X83 a été obtenue deux fois et une fois avec les mélanges AD3/AD1 et AD3/P3X35.

2.2. Mélange de deux Acm en quantités variables

Une étude en phagocytose a été réalisée en sensibilisant des hématies avec deux mélanges composés des Ac AD3/AD1 et AD3/HM16. La concentration finale était de 100 ng/ml et la proportion des Ac qui composaient les mélanges était variable de 10 en 10%.

Les résultats obtenus ont montré un effet synergique significatif lorsque le mélange est composé des Ac AD3 et HM16, confirmant ainsi les résultats précédents. La proportion optimale en Ac AD3 en mélange avec l'Ac HM16, pour l'obtention de cette effet, est de 60% (figure R.67A).

Les résultats de la figure R.67B n'ont pas mis en évidence d'effet synergique avec le mélange des Ac AD3 et AD1 quelle que soit la proportion en AD1 et en AD3 du mélange. Une meilleure activité en phagocytose a été observée avec l'Ac AD1 par rapport à l'Ac AD3 avec une augmentation régulière de la valeur de DO lorsque la proportion de l'Ac AD3 diminue de 70 à 40% signifiant une inhibition par l'Ac AD3 de la phagocytose induite par l'Ac AD1. Pour des proportions entre 10 à 30% d'Ac AD1 et entre 60 à 100%, les valeurs de DO sont constantes.

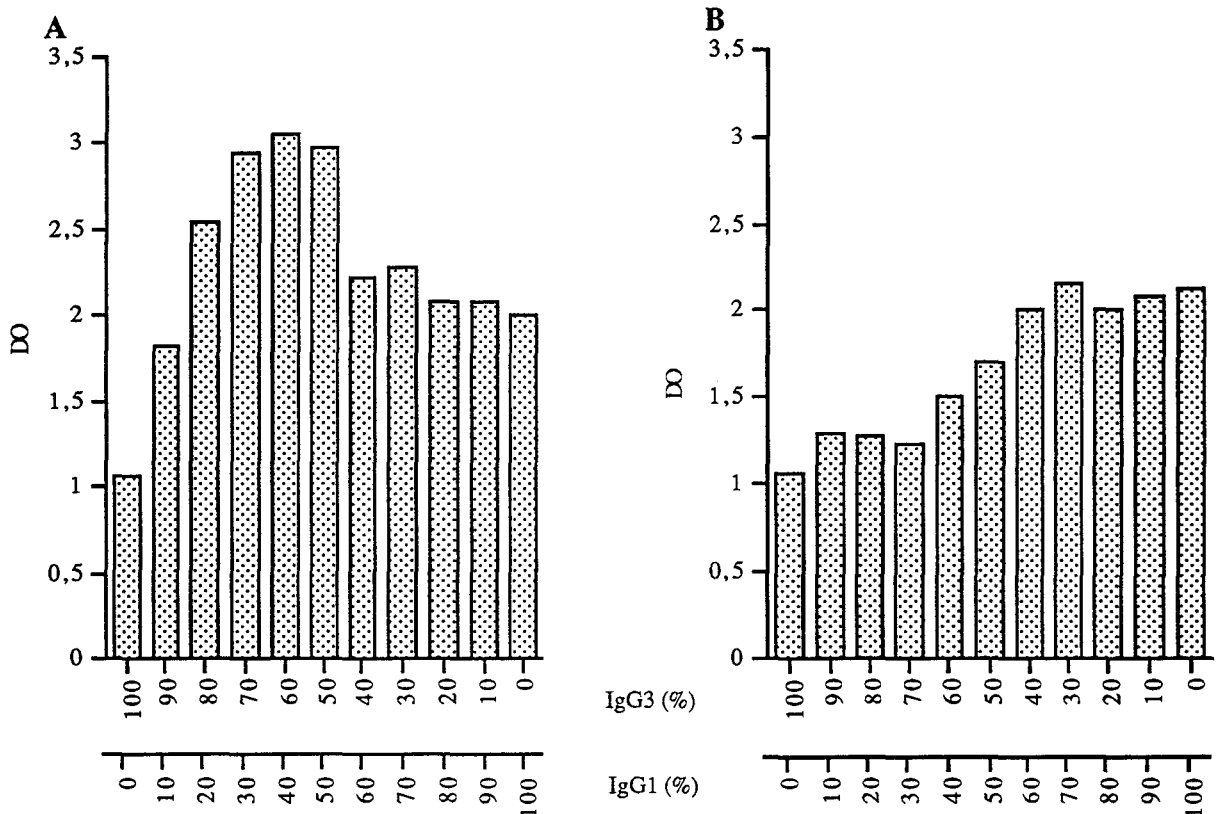


Figure R.67 : test de phagocytose avec des hématies sensibilisées par des mélanges d'Ac. Les mélanges étaient composés des Ac AD3 et HM16 (A) et de AD3 et AD1 (B). La concentration finale des mélanges était de 100 ng/ml et les proportions d'IgG1 (AD1 et HM16) et d'IgG3 (AD3) étaient variables de 10 en 10%.

PARTIE G**Troisième atelier international sur les anticorps monoclonaux. Evaluation fonctionnelle en tests d'ADCC et de phagocytose d'Acm anti-D.**

Plusieurs Ac monoclonaux ont été testés en ADCC et en phagocytose à l'occasion du 3^{ème} atelier international sur les Ac monoclonaux (Third International Workshop and Symposium on Monoclonal Antibodies Against Human Red Blood Cell and Related Antigens - Nantes - September 25-27, 1996). Une cinquantaine d'anticorps monoclonaux anti-D ont été proposés par une douzaine de laboratoires répartis dans le monde (France, Grande-Bretagne, Hollande, Belgique, Japon, Australie, ...). Un échantillon de chaque Ac anti-D a été distribué aux différents laboratoires participants pour une étude de l'activité fonctionnelle. Chaque laboratoire a du ensuite envoyer ses résultats aux organisateurs. Une présentation générale de toutes les données a été faite lors de la conférence internationale du 25-27 septembre 1996 à Nantes.

Les Ac monoclonaux anti-D étudiés dans ce travail ont été inscrits sous les numéros suivants : 63 : P3X35 ; 64 : P3X83 ; 65 : P3X212 ; 66 : AD3 ; 67 : HM16 et 181 : AD1. L'intérêt de ce travail a été de comparer les activités fonctionnelles en ADCC et en phagocytose de ces Acm par rapport aux différents Acm anti-D disponibles dans le monde.

Un premier travail a consisté à déterminer la concentration des différents anti-D par ELISA afin de pouvoir les utiliser aux mêmes concentrations. Les résultats de dosage obtenus ont été très variables avec des valeurs allant de 3 µg/ml à 109 µg/ml. Ces Acm ont été ensuite évalués en test d'ADCC et de phagocytose.

1. Evaluation des Ac monoclonaux anti-D en test d'ADCC

Les tests d'ADCC sur cellules mononucléées ont été réalisés avec l'ensemble des Ac, soit 50 produits différents. Les concentrations de sensibilisation utilisées ont été de 100 et de 500 ng/ml. Tous les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport au polyclonal anti-D P1 utilisé comme référence.

Les résultats obtenus (figures R.68A et B) montrent une très grande variation dans la réponse ADCC induite par les Ac monoclonaux. En fonction de cette activité ADCC, les différents anti-D ont été classés en 4 groupes :

1 - Les Ac 48, 70, 74, 78, 79, 83 et 119 n'ont induit qu'une très faible activité ADCC, voire même aucune, aussi bien à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml qu'à la concentration de 500 ng/ml.

2 - Les Ac 36, 45, 46, 49, 63, 64, 80, 94, 120 et 121 n'ont induit qu'une faible activité à 500 ng/ml (de 14 à 57%) mais aucune réponse n'a été observée à 100 ng/ml.

3 - Les Ac 47, 76, 77, 81, 82, 95, 96, 108, 114, 118 et 122 ont été capables d'induire une réponse ADCC à la concentration de sensibilisation de 500 ng/ml comparable à celle du polyclonal anti-D P1 tandis qu'à la concentration de 100 ng/ml, les réponses ADCC observées pour ces Ac étaient faibles. De plus, parmi ces Ac, les numéros 96 et 108 ont des réponses ADCC comparables aux deux concentrations de sensibilisation. L'Ac 114 induit une activité ADCC très nettement supérieure à la concentration de 500 ng/ml (239%) qu'à 100 ng/ml (60%).

4 - Les Ac 30, 31, 32, 66, 67, 68, 71, 72, 73, 75, 97, 104, 117, 117, 124 et 181 ont été considérés comme les plus efficaces à induire l'ADCC aux deux concentrations de sensibilisation mais surtout à la concentration de 100 ng/ml dont les réponses sont supérieures à 160% par rapport au polyclonal anti-D P1.

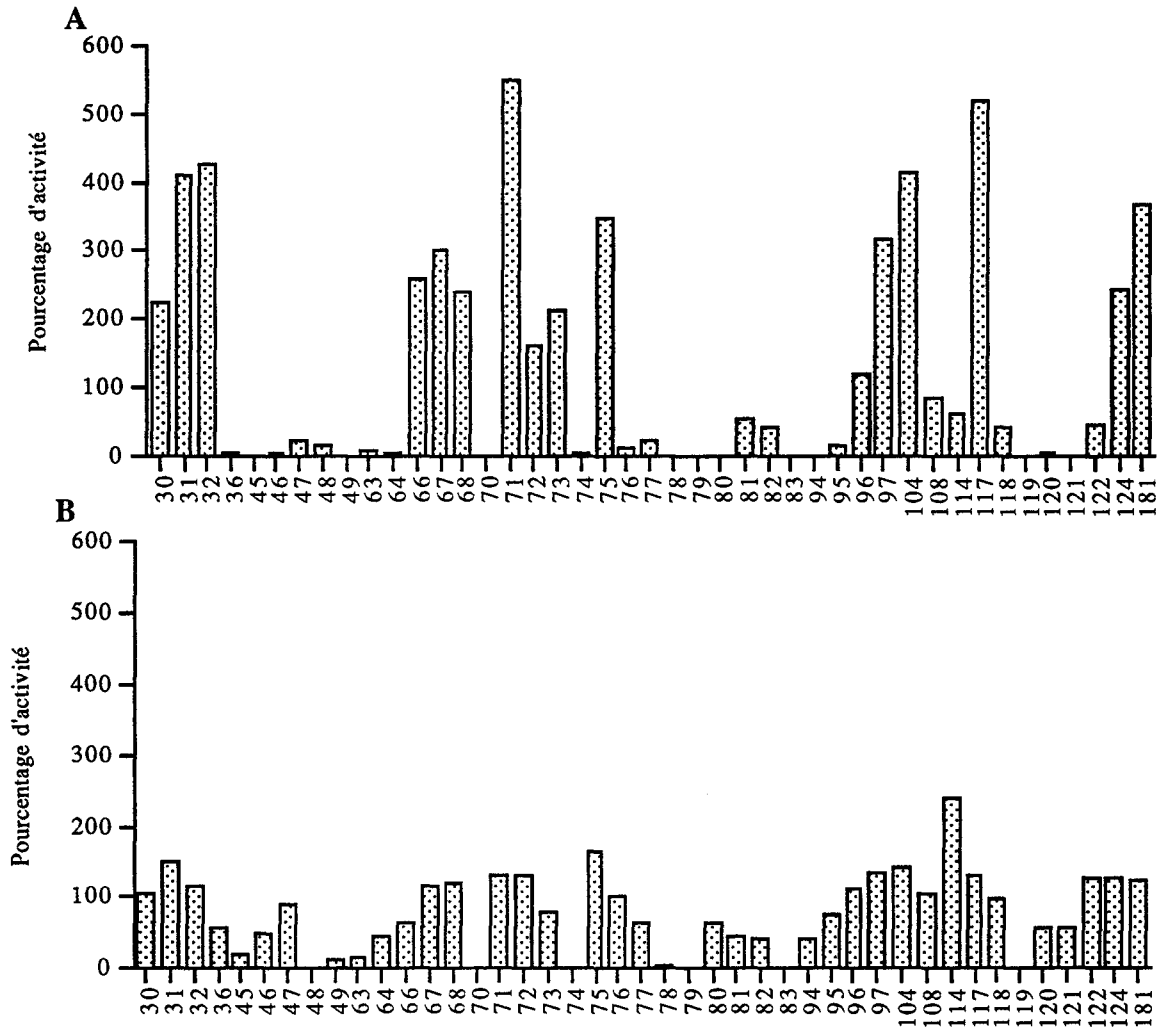


Figure R.68 : tests d'ADCC avec les Ac du Workshop. Les concentrations de sensibilisation étaient de 100 ng/ml (A) et de 500 ng/ml (B). Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la valeur obtenue pour le polyclonal anti-D P1.

2. Evaluation des Ac monoclonaux anti-D en test de phagocytose

Les tests de phagocytose n'ont été réalisés qu'avec 19 Ac monoclonaux anti-D aux concentrations de sensibilisation de 100 et 500 ng/ml (figure R.69).

D'après les valeurs obtenues, les Ac ont été classés dans différents groupes en fonction de leur activité de phagocytose :

1 - Les Ac 48, 70, 74, 94 et 120 n'ont induit aucune phagocytose aux deux concentrations de sensibilisation utilisées.

2 - Les Ac 31, 36, 49, 64, 68 et 76 n'ont induit qu'une faible réponse phagocytose par rapport au polyclonal anti-D P1 avec des valeurs allant de 10 à 43%.

3 - Les Ac 30, 32, 73, 77, 81, 104, 108 et 118 ont induit une réponse phagocytose supérieure à celle observée avec le polyclonal anti-D P1 au moins à une concentration de sensibilisation. Parmi ces Ac, les numéros 77 et 108 sont significativement plus actifs à 500 ng/ml (respectivement à 171 et 196%) qu'à 100 ng/ml (respectivement à 50 et 147%) et l'Ac 104 est le plus actif des Ac anti-D testés à 100 ng/ml (308%).

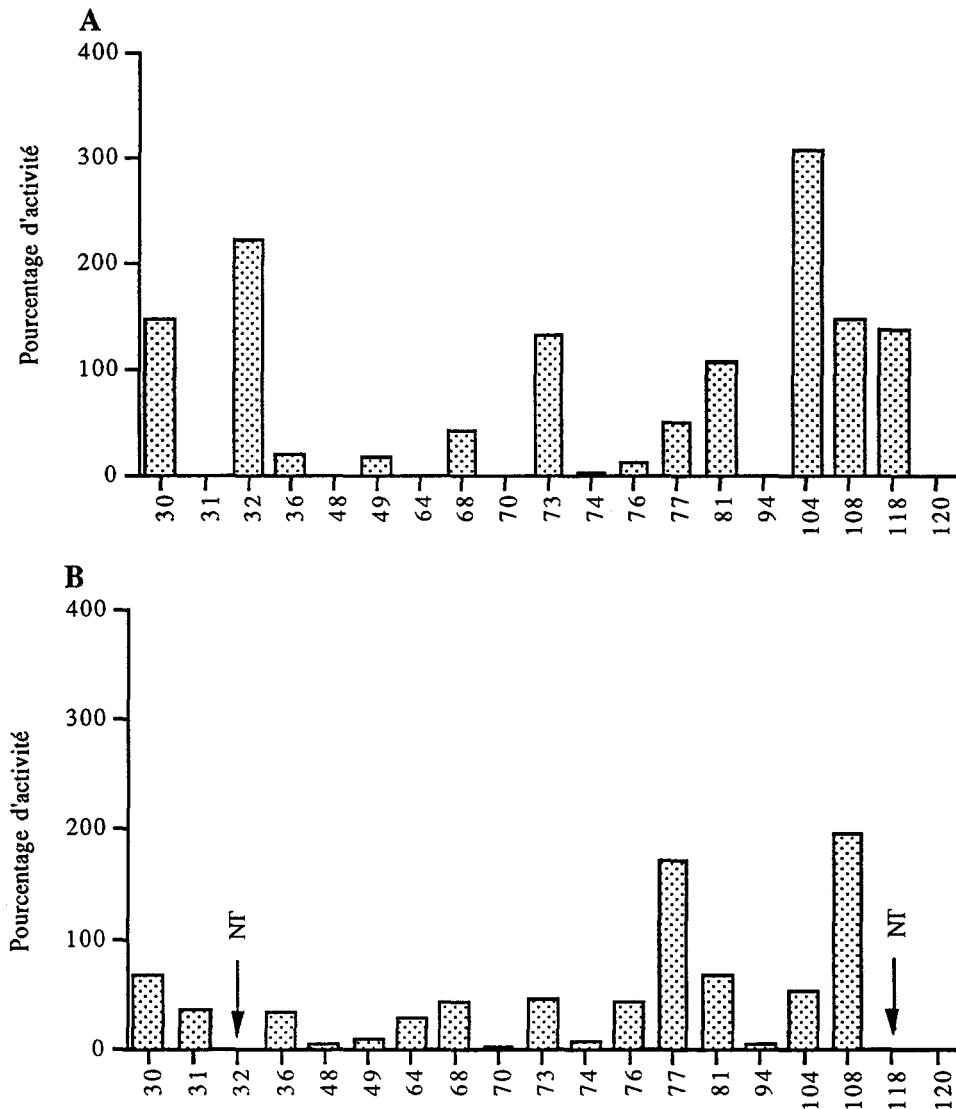


Figure R.69 : tests de phagocytose avec les Acm du Workshop. Les concentrations de sensibilisation étaient de 100 ng/ml (A) et de 500 ng/ml (B). Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport à la valeur obtenue pour le polyclonal anti-D P1. NT : non testé.

L'ensemble de ces résultats ne met pas en évidence de lien évident entre la sous-classe de l'Ac et les propriétés fonctionnelles d'ADCC et de phagocytose. En effet, des réponses hétérogènes ont été observées entre les IgG1 et les IgG3. L'Ac 104, de sous-classe IgG1, semble être intéressant dans la mesure où, à faible concentration de sensibilisation (100 ng/ml), il induit une forte activité ADCC ainsi qu'une forte activité de phagocytose.

PARTIE H
Ingénierie Moléculaire

Une étude complémentaire de la structure moléculaire des Ac anti-D a été réalisée en utilisant des outils de biologie moléculaire disponibles au laboratoire. Des séquençages nucléotidiques de gènes codant pour certaines chaînes lourdes (H) et légères (L) d'Ac ont donc été réalisés afin de déterminer si une corrélation pouvait être faite entre les séquences et certaines propriétés des Ac.

Des Ac recombinants ont été construits au laboratoire à partir du matériel génétique extrait des cellules productrices des Ac AD3 et HM16. Ces Ac recombinants ont été testés en ADCC et en phagocytose par rapport aux Ac natifs.

1. Clonage des chaînes lourdes et légères des IgG anti-D

1.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits selon le protocole décrit en matériels et méthodes (voir M.M. B-1.4.1.) à partir des cellules des différents hybridomes P3X83, HM16, P3X35, P3X212, P3X229-14 et P3X229-24. Les rendements d'extraction obtenus se situaient entre $103 \mu\text{g}/10^7$ cellules pour l'Ac P3X212 et $178 \mu\text{g}/10^7$ cellules pour l'Ac P3X229-24 et les indices de pureté obtenus par les rapports de DO 260/280 nm et 230/260 nm étaient proches respectivement de 2 et de 0,7 pour l'ensemble des extractions.

L'obtention des deux bandes principales après migration des ARN sur gel correspondant aux ARN ribosomiaux 28s et 18s, indiquerait que les ARN totaux sont non dénaturés. La figure R.70 montre un exemple de migration des ARN sur gel après l'extraction des cellules des hybridomes P3X83, P3X35, HM16 et P3X212.

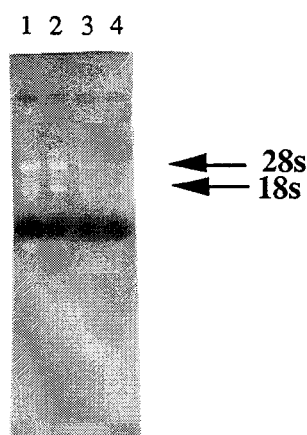


Figure R.70 : profil électrophorétique des ARN totaux extraits. Les dépôts ont été de 15 µg d'ARN par piste et sont dans l'ordre suivant : 1 : ARN de P3X83 ; 2 : ARN de P3X35 ; 3 : ARN de HM16 ; 4 : ARN de P3X212.

1.2. Amplification par PCR des séquences correspondantes aux chaînes lourdes et légères des immunoglobulines

Les ADNc, synthétisés à partir de l'ARN total par une transcription inverse, ont été amplifiés par PCR. Ces amplifications ont permis de préciser la nature des chaînes légères de chaque Ac. Les résultats du tableau R.22 montrent que des amplifications de chaînes kappa ont été obtenues pour les Ac P3X212 et P3X83 et que des amplifications de chaîne lambda ont été obtenues pour les Ac P3X35 et HM16.

Les résultats du tableau R.18 montrent également la présence d'une amplification de chaîne kappa et de chaîne lambda aussi bien pour l'hybridome P3X229-14 que pour l'hybridome P3X229-24.

	Chaîne légère
P3X35	Lambda
HM16	Lambda
P3X83	Kappa
P3X212	Kappa
P3X229-14	Kappa Lambda
P3X229 24	Kappa Lambda

Tableau R.18 : nature des chaînes légères amplifiées par PCR.

En effet, après migration sur gel des produits de PCR, des amplifications de chaînes légères de la taille attendue à 700 pb ont été obtenues avec les deux couples d'amorces kappa et lambda.

La figure R.71 montre un exemple de migration sur gel des amplifications par PCR des chaînes légères. Deux remarques peuvent être faites :

1 - des amplifications spécifiques à 700 pb ont été obtenues pour l'hybridome P3X83 avec le couple d'amorces kappa (K5'L/K3'L) (piste 3) mais pas avec le couple d'amorces lambda (LamH5'L/LamH3'L) (piste 8). Cependant, pour ce dernier couple d'amorce, une légère bande à la taille de 700 pb a été observée. Toutefois, comme l'intensité de la bande est beaucoup plus faible que celle obtenue à la piste 3, l'amplification a été considérée comme aspécifique.

Des amplifications ont été obtenues avec l'hybridome HM16 avec le couple d'amorces lambda (piste 9) mais pas avec le couple d'amorces kappa (piste 4).

Ces observations indiquent donc la spécificité kappa et lambda des amorces utilisées.

2 - le myélome P3X63 Ag8 653 étant le partenaire de fusion de certains hybridomes anti-D (voir M.M. A-1.3.), un ADNc synthétisé à partir d'ARN extraits des cellules de ce myélome a été utilisé comme témoin négatif. En effet, la figure R.71 montre une absence d'amplification avec l'utilisation des deux couples d'amorces kappa (pistes 5) et lambda (piste 10).

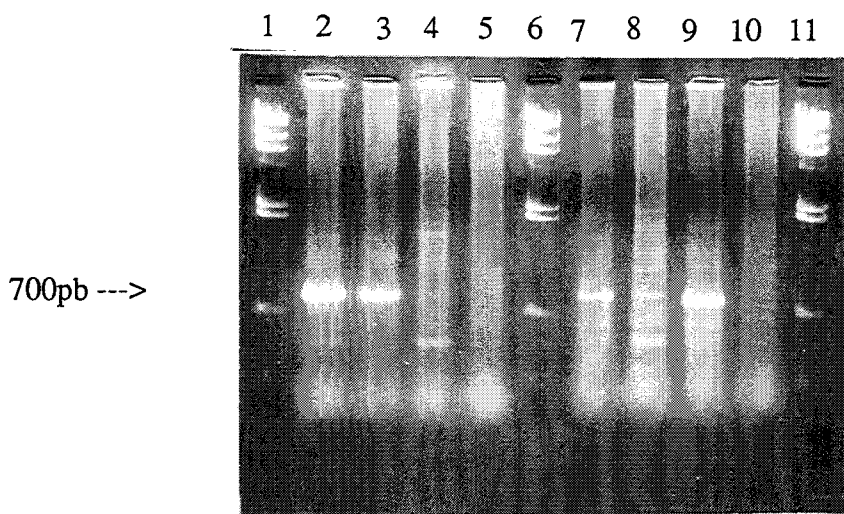


Figure R.71 : observation sur gel d'agarose des produits de PCR. Les pistes 1, 6 et 11 correspondent au marqueur de poids moléculaire (Lambda DNA-HindIII digest - Pharmacia) et les différentes réactions de PCR réalisées ainsi que l'ordre de chargement sont indiqués dans le tableau suivant :

	ADNc P3X229-14	ADNc P3X83	ADNc HM16	ADNc P3X63 Ag8 653
K5'L/K3'L	piste 2	piste 3	piste 4	piste 5
LamH5'L/LamH3'L	piste 7	piste 8	piste 9	piste 10

La sous-classe des chaînes lourdes des Ac anti-D était déjà connue. Les Ac P3X83, HM16, P3X35 et P3X212 sont des IgG1 et les Ac AD3 et P3X229-24 sont des IgG3. L'amorce s'hybridant en 3' était donc déterminée, seules les amorces s'hybridant en 5' restaient à préciser pour l'amplification des différentes chaînes lourdes.

Les gènes correspondants aux chaînes lourdes des hybridomes P3X83 et P3X212 ont été amplifiés avec le couple d'amorces HS1-5'L/H3'L, ceux des hybridomes P3X35, AD3 et P3X229-24 avec HS2-5'L/H3'L et celui de HM16 avec HS3-5'L/H3'L (tableau R.19).

	Nature	Amorces
P3X35	IgG1	HS2-5'L/H3'L
HM16	IgG1	HS3-5'L/H3'L
P3X83	IgG1	HS1-5'L/H3'L
P3X212	IgG1	HS1-5'L/H3'L
P3X229-14	IgG3	HS2-5'L/H3'L
P3X229-24	IgG3	HS2-5'L/H3'L

Tableau R.19 : nature des chaînes lourdes et le couple d'amorces utilisé pour l'obtention des amplifications par PCR.

1.3. Clonage des produits amplifiés

Pour chaque chaîne H et L, l'ADN amplifié a été purifié, digéré par EcoRI et introduit dans le vecteur de clonage PT7T3 18U digéré au préalable par EcoRI. Après électrotransformation d'*E. coli*, les clones recombinants ont été sélectionnés selon le protocole décrit en matériels et méthodes (voir M.M. B-1.9.).

2. Séquençage des chaînes lourdes et légères

Des séquençages d'acides nucléiques ont été réalisés pour les différentes chaînes d'Ac anti-D selon le protocole établi (voir M.M. B-2.). Pour cela, et afin d'optimiser la performance des séquençages, différentes techniques de préparation d'ADN ont été testées.

2.1. Séquençage du transcrit lambda de P3X229-14

L'hybridome P3X229-14 est sécréteur d'une IgG3/kappa (résultats non présentés). Toutefois, l'étude précédente a montré l'existence d'une transcription pour les chaînes légères kappa et lambda. Pour caractériser davantage cet hybridome, un séquençage du transcrit lambda a été entrepris. La séquence de la partie constante a été comparée à une séquence publiée : LBV Lambda (Kabat, 1987). La parfaite homologie entre les deux séquences a confirmé la nature lambda humaine de la chaîne (figure R.72).

LBV Lambda : AAGGCTGCCC CCTCGGTAC TCTGTTCCCA CCCTCCTCTG AGGAGCTTCA AGCCAACAAG
P3X229-14 : AAGGCTGCCC CCTCGGTAC TCTGTTCCCA CCCTCCTCTG AGGAGCTTCA AGCCAACAAG

LBV Lambda : GCCCACTGG TGTGTCTCAT AAGTGACTTC TACCCGGGAG CCGTGACAGT
P3X229-14 : GCCCACTGG TGTGTCTCAT AAGTGACTTC TACCCGGGAG CCGTGACAGT

LBV Lambda : GGCCTGGAAG GCAGATAGCA GCCCCGTCAA GGCGGGAGTG GAGACCACCA
P3X229-14 : GGCCTGGAAG GCAGATAGCA GCCCCGTCAA GGCGGGAGTG GAGACCACCA

LBV Lambda : CACCTCCAA ACAAAGCAAC AACAAGTACG CGGCCAGCAG CTACCTGAGC CTGACGCCTG
P3X229-14 : CACCTCCAA ACAAAGCAAC AACAAGTACG CGGCCAGCAG CTACCTGAGC CTGACGCCTG

LBV Lambda : AGCAGTGGAA GTCCACAAA AGCTACAGCT GCCAGGTAC GCATGAAGGG AGCACCGTGG
P3X229-14 : AGCAGTGGAA GTCCACAAA AGCTACAGCT GCCAGGTAC GCATGAAGGG AGCACCGTGG

LBV Lambda : AGAAGACAGT GGCCCCTACA GAATGTTC
P3X229-14 : AGAAGACAGT GGCCCCTACA GAATGTTC

Figure R.72 : comparaison de séquence de la partie constante du transcrit lambda de P3X229-14 avec la séquence LBV Lambda.

La séquence obtenue de la partie variable a mis en évidence la présence d'un codon stop (TAA) à 169 pb du codon initiateur (figure R.73).

1	ATGGCCTGGA	CTCCTCTCCC	TGTCCTGTTC	CTCTCTCACT	GCACAGGTTC
51	CCTCTCGCAG	GCTGTGCTGA	CTCAGCCGTC	TTCCCTCTCT	GCATCTCCTG
101	GAGCATCAGC	CAGTCTCACC	TGCACCTTGC	GCAGTGGCAT	CAATGTTGGT
151	ACCTACAGGA	TATGCTACTA	<u>ACAGCAGAAG</u>	CCAGGGAGTC	CTCCCCAGTA
201	TCTCCTGAGG	TACAAATCAG	ACTCAGATAA	GTGGCTGGCT	CTGGAGTCCC
251	AGCCGCTTCT	CTGGATCCAA	AGATACTTCG	CC	

Figure R.73 : début de la séquence nucléotidique du transcrit lambda de P3X229-14. Le codon stop (TAA) a été souligné.

Les séquençages des chaînes kappa et lambda de l'hybridome P3X229-24 ont également été effectués. Les séquences obtenues ont montré une parfaite homologie avec celles de P3X229-14.

2.2. Analyse des séquences des différentes chaînes d'Ac

Des séquences consensus de différentes chaînes H et L ont été réalisées selon le protocole décrit en matériels et méthodes (voir M.M. B-3.4.). Les séquences établies ne concernent que les Ac HM16, P3X83 et AD3 dans la mesure où ce travail est encore en cours de réalisation.

2.2.1. Analyse de la séquence des parties variables des Ac

2.2.1.1. Analyse des familles des gènes VL

Les séquences VL obtenues ont été comparées avec des séquences germinales publiées. Le nombre de gènes $V\kappa$ germinaux est estimé à environ 50 tandis que le nombre des gènes $V\lambda$ germinaux n'est pas encore réellement connu (Bye, 1992). La

comparaison s'est portée sur 28 séquences germinales pour les chaînes kappa (Bentley, 1980 ; Bentley, 1983 ; Jaenichen, 1984 ; Pech, 1984a ; 1984b ; Klobeck, 1985a ; 1985b ; Pech, 1985 ; Stavnezer, 1985 ; Chen, 1986 ; 1987a ; 1987b ; Straubinger, 1988 ; Pargent, 1991 ; Scott, 1991) et 7 pour les chaînes lambda (Anderson, 1984 ; Alexandre, 1989 ; Brockly, 1989 ; Siminovitch, 1989 ; Bernard, 1990 ; Frippiat, 1990 ; Combriato, 1991).

Une homologie de séquence a été observée avec Humkv325 (sous groupe V κ III) pour les Ac P3X83 et AD3 (figure R.74) et avec IGLV3S1 (sous-groupe V λ III) pour l'Ac HM16 (figure R.75). Le tableau R.20 permet de situer l'emplacement des mutations obtenues sur les séquences VL par rapport à leur séquence germinale.

Humkv325:	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSYS	SSYLAWYQOK	PGQAPRLLIY
AD3 :	-----	-----	-----	-RF----- I	-----
P3X83 :	-T-----	-----	-----G	-N-----H-	-----
Humkv325:	<u>GASSRATGIP</u>	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	<u>OYGSSP</u>
AD3 :	-----v-	-----	-----	-----	R--G-L
P3X83 :	---N-----	-----	-----T---	S-----	---N-Y

Figure R.74 : séquence en amino-acides déduites des séquences nucléotidiques de la région VL des anti-D AD3 et P3X83 en comparaison avec le gène germinale le plus homologue. Les pointillés indiquent un acide aminé identique à celui de la séquence du gène germinale. Les CDR ont été soulignés et sont dans l'ordre CDR1, CDR2 et CDR3. Les références pour le gène germinale humkv325 sont : Chen, 1987a et Bye, 1992.

IGLV3S1 :	SSELTQDPAV	SVALGQTVRI	TCQGDLSRSY	YASWYQKPG	QAPVLVIYQK
HM16	-----	-----	--R-----	-----	-----D-
IGLV3S1 :	<u>NNRPSGIPDR</u>	FSGSSGNTA	SLTTTGAQAE	DEADYYCNSR	<u>DSSGNH</u>
HM16 :	H-----	-----	---A---G	----- -T-	H---YL

Figure R.75 : séquence en amino-acides déduites des séquences nucléotidiques de la région VL de l'anti-D HM16 en comparaison avec le gène germinale le plus homologue. Les pointillés indiquent un acide aminé identique à celui de la séquence du gène germinale. Les CDR ont été soulignés et sont dans l'ordre CDR1, CDR2 et CDR3. La référence pour le gène germinale IGLV3S1 est : Frippiat, 1990.

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
P3X83	1	2	1	1	2
HM16	0	1	0	2	2
AD3	0	2	1	0	1

Tableau R. 20 : nombre de changement en acides aminés dans le "framework" (FR) et les CDR des anti-D P3X83, HM16 et AD3 en comparaison à leur gène germinale respectif.

2.2.1.2. Analyse des familles des gènes VH

Les séquences VH obtenues ont été comparées avec des séquences germinales publiées. Le nombre de gènes VH germinaux est estimé à 75-100 gènes (Berman,

1988 ; Walter, 1990). La comparaison a été réalisée avec 74 gènes VH germinaux compilés par Tomlinson *et al.* (Tomlinson, 1992).

Une homologie de séquence a été observée avec VH4-21 (sous-groupe VHIV) pour l'Ac HM16 (figure R.76), avec hv1263 (sous-groupe VHI) pour l'Ac P3X83 (figure R.77) et avec hv3019b9 (sous-groupe VHIII) pour l'Ac AD3 (Figure R.78). Le tableau R.21 permet de situer l'emplacement des mutations obtenues sur les séquences VH par rapport à leur séquence germinale.

VH4-21: QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGFS GYYSWIRQP PGKGLEWIGE
HM16 : ----- --R----- S----- ----T----- -----

VH4-21: INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCAR
HM16 : ----- -----S-- ----- -V-A----- -----

Figure R.76 : séquence en amino-acides déduites des séquences nucléotidiques de la région VH de l'anti-D HM16 en comparaison avec le gène germinale le plus homologue. Les pointillés indiquent un acide aminé identique à celui de la séquence du gène germinale. Les CDR ont été soulignés et sont dans l'ordre CDR1 et CDR2.

hv1263: QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYAISWVRQA PGQGLEWMGR
P3X83 : ----- -----S-G ---V----- -----

hv1263: IPILGIANY AOKEQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR
P3X83 : ---F--TT- ----- ---G--T MEM RS---T--- -----

Figure R.77 : séquence en amino-acides déduites des séquences nucléotidiques de la région VH de l'anti-D P3X83 en comparaison avec le gène germinale le plus homologue. Les pointillés indiquent un acide aminé identique à celui de la séquence du gène germinale. Les CDR ont été soulignés et sont dans l'ordre CDR1 et CDR2.

hv3019b9: QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRA PGKGLEWVAV
AD3 : ----- --R--G----V --V--RVSL- TN----- ---- - - -Y

3019b9: IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAR
AD3 : L-----E- ----- -----F --VV----- -----

Figure R.78 : séquence en amino-acides déduites des séquences nucléotidiques de la région VH de l'anti-D AD3 en comparaison avec le gène germinale le plus homologue. Les pointillés indiquent un acide aminé identique à celui de la séquence du gène germinale. Les CDR ont été soulignés et sont dans l'ordre CDR1 et CDR2.

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3
P3X83	2	1	0	3	8
HM16	2	1	0	0	3
AD3	8	2	0	3	3

Tableau R. 21 : nombre de changement en acides aminés dans le "framework" (FR) et les CDR des anti-D P3X83, HM16 et AD3 en comparaison à leur gène germinale respectif.

2.2.2. Analyse de la séquence des parties constantes des chaînes lourdes

L'obtention de la séquence des parties constantes des chaînes lourdes a permis, d'une part, de comparer les 2 IgG1 entre-elles (HM16 et P3X83) et, d'autre part, de comparer les séquences obtenues avec des séquences publiées. L'objectif de ces comparaisons est de savoir s'il est possible d'interpréter les différences de fonctionnalité entre les Ac. Par ailleurs, il est possible de définir l'allotype des Ac à partir de leur séquence.

Une comparaison de la séquence des parties constantes des chaînes lourdes a été réalisée pour les Ac HM16 et P3X83 avec la séquence gamma 1 publiée (IgG1) (Kabat, 1987) et pour l'Ac AD3 avec la séquence gamma 3 (IgG3) (Kabat, 1987).

La première comparaison (figure R.79) a montré 1 changement pour l'Ac HM16 par rapport à la séquence IgG1 de l'acide aminé 215 d'une alanine (A) en valine (V). Deux changements ont été observés pour l'Ac P3X83 au niveau des acides aminés 215 et 252 respectivement d'une alanine (A) en valine (V) et méthionine (M) en valine (V).

IgG1 :	118	ASTKGP	SVFP	LAPSSK	STSG	GTAALG	CLVK	DYFPEP	VTVS	WNSGALT	SGV
HM16 :	118	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P3X83 :	118	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IgG1 :	168	HTFPAVL	QSS	GLYSLSS	VVT	VPSSSL	GTQT	YICNVNH	KPS	NTKV	DKKAEP
HM16 :	168	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	V--
P3X83 :	168	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	V--
IgG1 :	218	KSCDKT	HTTCP	PCPAPELL	G	PSVFL	FPPKP	KDTLMIS	RTP	EVTCV	VVDVS
HM16 :	218	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P3X83 :	218	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	V-----	-----	-----
IgG1 :	268	HEDPQV	KFNW	YVDGVQ	VHNA	KTKPRE	QQYN	STYRVVS	VLT	VLHQ	NWLDGK
HM16 :	268	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P3X83 :	268	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IgG1 :	318	EYKCKV	SNKA	LPAPIE	KTIS	KAKGQP	PREPQ	VYTLPP	SRDE	LTKN	QVSLTC
HM16 :	318	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P3X83 :	318	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IgG1 :	368	LVKGFY	PSDI	AVEWES	NGQP	ENNYKT	TPPV	LSDG	SFFLY	SKLT	VDKSRW
HM16 :	368	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P3X83 :	368	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IgG1 :	418	QQGNV	FSCSV	MHEALH	NHNT	QKSL	SLSPG				
HM16 :	418	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
P3X83 :	418	-----	-----	-----	-----	-----	-----				

Figure R.79 : séquences en amino-acides déduites des séquences nucléotidiques de la région constante des chaînes H des anti-D P3X83 et HM16 en comparaison avec la séquence gamma 1 (IgG1). Les pointillés indiquent un acide aminé comparable.

La comparaison de la partie constante de la chaîne lourde de l'Ac AD3 avec la séquence gamma 3 (IgG3) (figure R.80) a montré l'existence de 4 mutations en acides aminés : 1 mutation au niveau de la région charnière de l'IgG3 et les 3 autres mutations aux positions 295, 296 et 297. Les changements sont respectivement : arginine (R) en thréonine (T) ; glutamine (Q) en asparagine (N) ; tyrosine (Y) en phénylalanine (F) et asparagine (N) en lysine (K).

IgG3 :	118	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV
AD3 :	118	-----	-----	-----	-----	-----
IgG3 :	168	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YTCNVNHKPS	NTKVDKRVEL
AD3 :	168	-----	-----	-----	-----	-----
IgG3 :	218	KTPL <u>GD</u> TTHT	CPRCPEPKSC	<u>DTPPPCPRCP</u>	<u>EPKSCDTPPP</u>	<u>CPRCPEPKSC</u>
AD3 :	218	-----	-----	-----	-----	-----
IgG3 :	231	<u>DTPPPCPRCP</u>	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED
AD3 :	231	-----T--	-----	-----	-----	-----
IgG3 :	271	PEVQFKWYVD	GVEVHNAKTK	LREEQ YNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK
AD3 :	271	-----	-----	----NFK---	-----	-----
IgG3 :	321	CKVSNKALPA	PIEKTISKTA	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK
AD3 :	321	-----	-----	-----	-----	-----
IgG3 :	371	GFYPSDIAVE	WESSGQPENN	YKTPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG
AD3 :	371	-----	-----	-----	-----	-----
IgG3 :	421	NIFSCSVMHE	ALHNRFTQKS	LSLSPGK		
AD3 :	421	-----	-----	-----		

Figure R.80 : séquence en amino-acides déduites de la séquences nucléotidique de la région constante de la chaînes H de l'anti-D AD3 en comparaison avec la séquence gamma 3 (IgG3). Les pointillés indiquent un acide aminé comparable. Le souligné simple correspond à la partie supplémentaire de la région charnière d'une gamma 3 par rapport à une gamma 1 ; le double souligné correspond à 2 acides aminés supplémentaires dans la séquence de gamma 3 par rapport à la séquence de gamma 1 (Burton, 1986). Les soulignés simples et doubles ne sont pris en compte dans la numérotation.

Les séquences en acides aminés de la partie constante des chaînes lourdes permettent de déterminer l'allotype des Ac.

Les Ac HM16 et P3X83 sont d'allotype G1m(1,17) car à la position 214 (figure R.79), l'acide aminé est une lysine (K) ce qui correspond à l'allotype G1m(17) et aux positions 356 et 358, les acides aminés sont respectivement un acide aspartique (D) et une leucine (L) ce qui correspond à l'allotype G1m(1) (Loghen, 1986).

La détermination de l'allotype pour AD3 est plus délicate et les données suivantes ont été obtenues à partir des travaux compilés chez Loghen (Loghen, 1986) et Bach (Bach, 1990). La présence de la proline en position 291 et de la phénylalanine en 296 indiquent un allotype

G3m(b) (figure R.84). De plus, la présence de la lysine en position 276 permet la détermination de l'allotype G3m(5,14). La présence de la sérine en position 384 semblerait indiquer un allotype G3m(10,11,13) et la présence de la phénylalanine en position 436 confirmerait l'allotype G3m(11). L'allotype de l'Ac AD3 serait donc G3m(5,10,11,13,14).

3. Analyse des Ac recombinants en test d'ADCC et de phagocytose

Des Ac recombinants ont été obtenus au laboratoire avec le matériel génétique préparé à partir des hybridomes produisant les Ac HM16 et AD3. Ces deux Ac recombinants ont été notés rHM16 et rAD3. De plus, des Ac recombinants ont été obtenus à partir des constructions génétiques suivantes :

Pour l'Ac recombinant : swHM16

- chaîne H : région constante de la chaîne H de HM16 / VH de AD3,
- chaîne L : chaîne L de AD3

Pour l'Ac recombinant : swAD3

- chaîne H : région constante de la chaîne H de AD3 / VH de HM16,
- chaîne L : chaîne L de HM16

Plusieurs commentaires peuvent être faits à partir des résultats obtenus en test d'ADCC (figure R.81) :

- tout d'abord, une réponse ADCC supérieure a été observée pour l'Ac HM16 par rapport à l'Ac AD3. En effet, les pourcentages d'activité obtenus pour AD3/HM16 et HM16/AD3 étaient respectivement de 35 et de 303.

- les réponses ADCC sont comparables entre HM16 et rHM16 ainsi qu'entre AD3 et rAD3 avec des pourcentages d'activité pour rHM16/HM16 et rAD3/AD3 proches de 100%.

- le changement de la partie VH ainsi que la chaîne légère d'un Ac change son activité par rapport à l'activité de l'Ac possédant la même partie constante de la chaîne lourde. En effet, SwAD3 semble induire une lyse légèrement supérieure à l'Ac AD3 (pourcentage d'activité pour swAD3/AD3 de 117%), alors que swHM16 induit une réponse très nettement inférieure à celle de HM16 (pourcentage d'activité pour swHM16/HM16 de 58%).

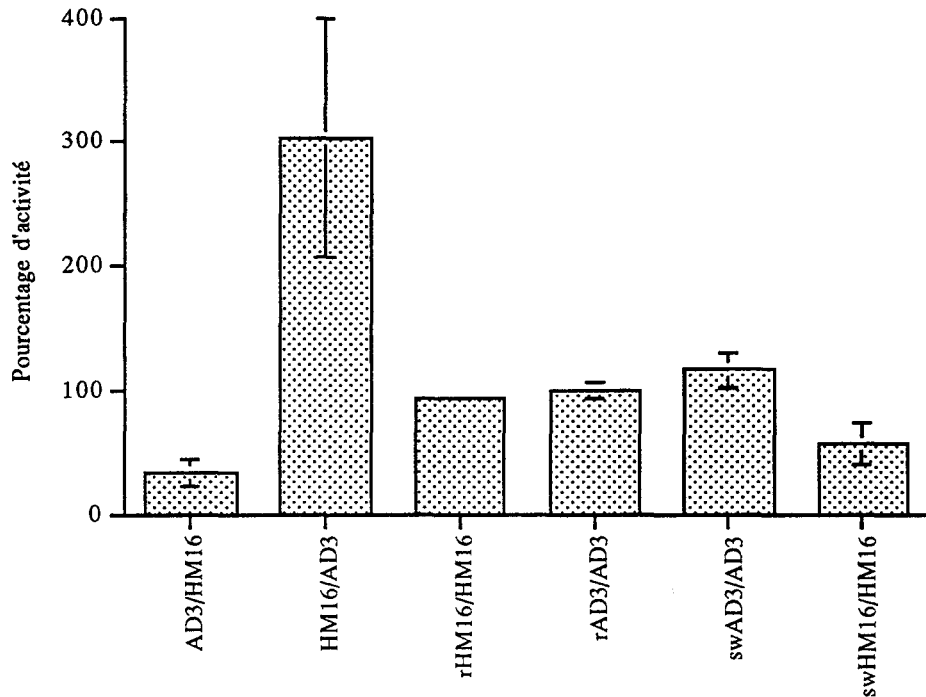


Figure R.81 : évaluation de la réponse ADCC des Ac recombinants. Les hématies ont été sensibilisées avec les Ac recombinants (rHM16, rAD3, swAD3 et swHM16) et les Ac natifs HM16 et AD3 à la concentration de 100 ng/ml. Les résultats correspondent à une moyenne de 3 tests d'ADCC.

Un test phagocytose a tout d'abord montré (figure R.82) que l'activité de l'Ac AD3 était supérieure à celle de l'Ac HM16 (pourcentage d'activité pour AD3/HM16 de 204%). De plus, des activités de phagocytose comparables ont été observées entre HM16 et rHM16 ainsi qu'entre AD3 et rAD3 avec des pourcentages d'activité pour rHM16/HM16 et rAD3/AD3 proches de 100%.

Par ailleurs, le changement de la partie VH ainsi que la chaîne légère d'un Ac a changé son activité de phagocytose par rapport à l'Ac possédant la même partie constante de la chaîne lourde. En effet, SwAD3 semble induire une phagocytose légèrement supérieure à l'Ac AD3 (pourcentage d'activité pour swAD3/AD3 de 112%), alors que swHM16 induit une réponse très nettement inférieure à celle de HM16 (pourcentage d'activité pour swHM16/HM16 de 46%).

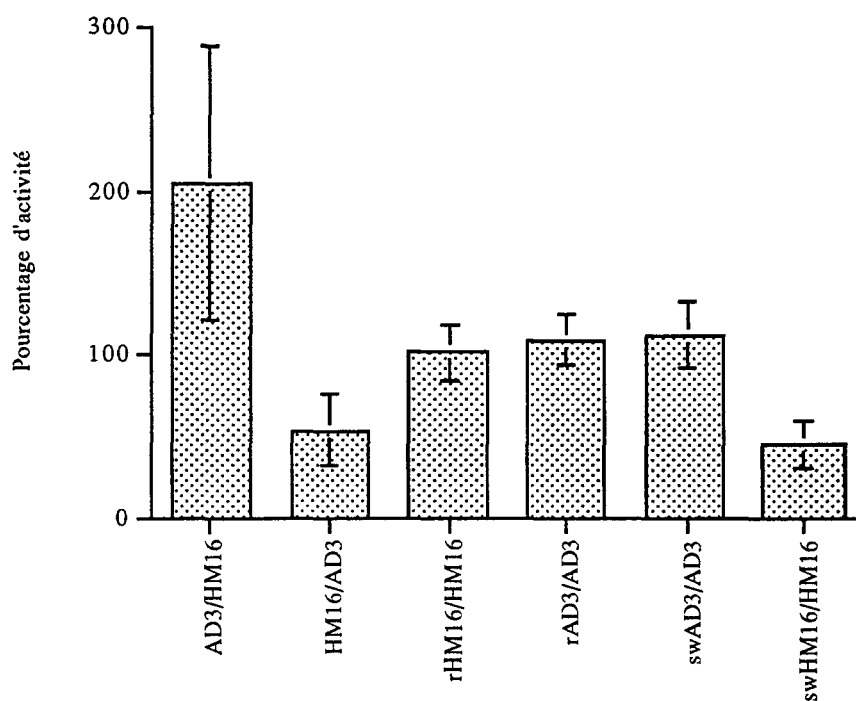


Figure R.82 : évaluation de la réponse phagocytose des Ac recombinants. Les hématies ont été sensibilisées avec les Ac recombinants (rHM16, rAD3, swAD3 et swHM16) et les Ac natifs HM16 et AD3 à la concentration de 500 ng/ml. Les résultats correspondent à une moyenne de 3 tests de phagocytose.

DISCUSSION
-
CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont été présentés en 8 parties distinctes afin d'essayer de clarifier le compte-rendu.

Ce chapitre a donc pour but de reprendre certains résultats, de les analyser de façon critique et de les commenter par rapport aux données bibliographiques existantes. Pour suivre une certaine logique, la discussion sera conduite de la façon suivante :

- Dans un premier temps, avant de mener une étude précise de la caractérisation des anticorps monoclonaux anti-D, il fallait disposer d'une quantité suffisante d'anticorps sous forme purifiée et surtout connaître le plus précisément possible la concentration de chaque produit.

- Dans un deuxième temps, plusieurs tests ont dû être mis au point avec l'objectif d'étudier et de comparer les activités biologiques des anti-D. Des expériences ont donc été réalisées pour définir les conditions optimales de chaque test, conditions qui une fois définies ne seront plus modifiées lors de l'évaluation des anti-D.

- Le troisième temps de la discussion sera consacré à l'analyse des résultats obtenus avec les anti-D. Pour cela, une caractérisation et une étude de l'activité biologique des Ig polyclonales anti-D ont été réalisées avant de mener l'analyse des propriétés fonctionnelles des anti-D monoclonaux dans la mesure où les polyclonaux constituent le produit de référence. Les résultats obtenus avec les Ac monoclonaux seront ensuite comparés d'une part aux polyclonaux et d'autre part aux nombreuses données bibliographiques publiées sur le sujet. L'objectif final de ce travail est de mieux comprendre le mécanisme d'action des anti-D pour sélectionner 1 ou 2 Ac monoclonaux humains anti-D qui puissent être utilisés en substitution des Ig polyclonales anti-D.

- Dans un dernier temps, les principales données obtenues au cours de ce travail seront resituées dans le contexte actuel de la prévention de l'allo-immunisation foetomaternelle. Enfin, l'analyse des résultats permettra de proposer de nouvelles orientations pour poursuivre l'étude du mécanisme d'action des anti-D, tant au point de vue de l'élimination des hématies Rh(D) positif que de l'immunosuppression contre l'antigène Rh(D).

1 - Production, purification et dosage des anti-D

La caractérisation complète des anticorps, qu'ils soient d'origine polyclonale ou monoclonale, nécessite de disposer de quantités suffisantes de produit.

En ce qui concerne les Ig polyclonales anti-D, plusieurs lots, de provenances différentes, ont été récupérés et surtout, le LFB étant directement producteur, des quantités non négligeables de produit ont été mises de côté pour être utilisées comme matériel de référence.

Les six anticorps monoclonaux ont été produits par culture en suspension (spinner ou cytotoculteur) avec des milieux de culture de composition assez semblable, à l'exception des anticorps AD1 et AD3 qui ont été produits par Biotest-Pharma en milieu sans SVF mais en présence d'insuline et de transferrine humaines. Comme cela a été fait pour les 2 anticorps AD1 et AD3, il serait logique d'utiliser un système de production analogue à celui qui sera utilisé pour la valorisation industrielle des produits. En effet, des modifications de structure fine de certaines glycoprotéines ont déjà été décrites en fonction du milieu ou du système de culture utilisés (haute ou basse densité cellulaire) (Goochee, 1992 ; Kumpel, 1994 ; Lifely, 1995), pouvant entraîner des différences d'activité fonctionnelle (Kumpel, 1994 ; Hadley, 1995).

La faible concentration en Ac obtenue dans les surnageants de culture (de l'ordre de 5 µg/ml) a été améliorée par de nouveaux clonages réalisés après les productions décrites dans ce travail.

Actuellement au laboratoire, six autres anti-D sont en cours de développement et d'emblée un protocole de production identique est utilisé : production d'un lot de 170 litres de surnageant en cytotoculteur avec un milieu contenant 3% de SVF.

Pour obtenir des résultats homogènes et limiter les risques d'interférences avec les contaminants contenus dans les plasmas bruts ou les surnageants de culture, il a été nécessaire de purifier les anti-D.

Les Ig polyclonales anti-D ont été préparées selon un protocole bien établi au LFB : un fractionnement éthanolique suivi d'étapes de purification et de traitement à la pepsine pH4 (inactivation virale). Le produit commercialisé contient essentiellement des IgG dont seulement une fraction correspond à des anti-D : environ 1 IgG anti-D pour 500 IgG polyvalentes.

Chaque lot d'Ig polyclonales spécifiques anti-D est obtenu après un mélange de plusieurs centaines de plasmas provenant de donneurs immunisés. Cette technique permet d'obtenir des lots de qualité relativement homogène.

Concernant les Ac monoclonaux, compte-tenu de la composition des milieux de culture et de l'addition de protéines exogènes pour favoriser la culture des cellules productrices, il a été nécessaire de procéder à une purification des anticorps monoclonaux anti-D. Dans le cadre de cette étude, un protocole simple a été retenu : utilisation d'une étape de chromatographie d'affinité avec de la protéine A. Ce type de purification ne pourra pas être choisi pour une préparation d'un lot d'anticorps à usage clinique compte-tenu de l'origine bactérienne de la protéine A et des problèmes de validations de tels gels chromatographiques. De plus, la protéine A fixe les IgG bovines présentes dans le SVF des cultures cellulaires. Par conséquent, des IgG bovines sont présentes dans les préparations d'Ac anti-D purifiés. Cependant, il a été montré que les IgG bovines ne se fixaient pas sur les hématies Rh(D) positives humaines et qu'il n'y avait donc pas d'interférence pour la fixation des anti-D sur la membrane des globules rouges.

A titre indicatif, les 2 anticorps AD1 et AD3, préparés pour un essai clinique, ont été produits dans un milieu sans SVF et ont été purifiés par 4 étapes chromatographiques d'échanges d'ions en technique HPLC (Biotest Pharma).

Une fois purifiés les anticorps anti-D doivent être dosés. C'est une étape essentielle du travail. En effet, une mauvaise détermination de la concentration peut avoir des conséquences importantes en particulier dans les expériences de comparaison d'anticorps. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour déterminer la concentration en anti-D d'un échantillon comme par exemple des tests d'hémagglutination (Esposito, 1971), des techniques de détection indirecte par fixation d'un deuxième anticorps anti-IgG humaine marqué soit à l'iode 125 (Hughes-Jones, 1967) soit à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Austin, 1995). Toutefois, la méthode de dosage la plus couramment utilisée est une technique par autoanalyseur qui est d'ailleurs la méthode de référence des pharmacopées française et

européenne. Elle est appliquée aussi bien pour le dosage des anti-D sériques au cours d'une MHNN afin de prévoir la sévérité de la maladie (Contreras, 1995) que pour déterminer la concentration en anti-D dans les préparations d'Ig anti-D polyclonales (Armstrong-Fisher, 1995).

La technique utilisée en routine au LFB pour le dosage des anti-D polyclonaux est donc celle de l'autonalyseur. Cette technique consiste à mesurer le pouvoir agglutinant des préparations et, par comparaison avec un anti-D de référence qualifié, à déterminer la concentration qui est exprimée en $\mu\text{g/ml}$ (Gunson, 1972). En fonction des laboratoires, plusieurs protocoles différents sont utilisés. De façon à garder un certain consensus, la technologie utilisée par le Laboratoire des Groupes Sanguins de l'ETS de Lille, est conforme au protocole de la pharmacopée française.

Parallèlement à cette technique autoanalyseur, le protocole Sol-ELISA a été développé avec le Département Production du LFB pour essayer de quantifier les polyclonaux anti-D et ainsi proposer une alternative au dosage par autoanalyseur. Ce travail a permis de démontrer la faisabilité de cette application. Des résultats concordants ont été obtenus entre les deux techniques autoanalyseur et Sol-ELISA avec un bon coefficient de corrélation. Les avantages du Sol-ELISA sont sa rapidité de mise en oeuvre, sa grande sensibilité et le fait qu'aucun appareillage sophistiqué ne soit nécessaire. Récemment des auteurs ont décrits une application identique du Sol-ELISA (Hirvonen, 1995). Cette technique pourrait d'ailleurs être inscrite à la pharmacopée en tant que référence à la place du test autoanalyseur.

La détermination de la concentration des Ac monoclonaux est un point délicat et des variations de dosages ont été observées entre les laboratoires en fonction de la technique, du protocole et du standard utilisés (Gunson, 1972, Kumpel, 1989, Tippett, 1990).

Trois techniques différentes ont été utilisées pour déterminer la concentration des Ac purifiés. Une mesure de la DO à 280 nm a été réalisée mais les valeurs obtenues ne peuvent être précises et fiables que si les Ac sont correctement purifiés. Un dosage ELISA a également été réalisé avec une technique validée au laboratoire en utilisant des IgG polyvalentes comme référence. Les paramètres suivants ont été contrôlés : spécificité, seuil de détection, linéarité, sensibilité et précision (répétabilité et reproductibilité). Le choix des Ac utilisés comme

standards (gamme étalon) est alors important. Il fallait s'assurer que l'utilisation, par exemple, d'IgG polyclonales pour le dosage ELISA d'une IgG1 soit possible. En effet, il a été montré dans ce travail qu'un anti-D de sous-classe IgG1 devait être utilisé pour doser des IgG1 et que des IgG polyvalentes pouvait convenir pour le dosage des IgG3. Les dosages ELISA ont toutefois donné des valeurs supérieures à celles obtenues avec la technique autoanalyseur. Une explication peut être avancée par le fait que dans un dosage ELISA, l'Ac anti-IgG utilisé reconnaît spécifiquement les IgG humaines et que, dans un dosage autoanalyseur, la mesure est liée à l'agglutination des globules rouges Rh(D) positif qui est une conséquence de la réactivité des Ac anti-D vis à vis de l'Ag D.

Compte tenu des limites des tests ELISA et des mesures de DO, toutes les manipulations effectuées dans ce travail ont été faites en prenant comme valeur de référence les dosages réalisés par autoanalyseur. Compte tenu des écart-types relevés entre les différents dosages par autoanalyseur, chaque Ac purifié a été dosé plusieurs fois et à des intervalles de temps différents. Les variations sont inhérentes au fait que des hématies de donneurs différents sont utilisées pour les dosages et que, même si les hématies ont le même phénotype OR_2R_2 , des variations importantes dans l'expression des antigènes D ont été décrites (Salmon, 1991).

Un autre aspect à ne pas négliger concerne la conservation des Ac monoclonaux purifiés. Généralement, les produits sont aliquotés en petites fractions et conservés congelés à -20°C . Après décongélation, un tube ne sera pas recongelé. Les Ig polyclonales spécifiques anti-D sont conservées, quant à elles, à $+4^{\circ}\text{C}$ sous forme lyophilisée. Après reconstitution, les anti-D peuvent être utilisés pendant une période de 1 mois s'ils sont stockés à $+4^{\circ}\text{C}$ en condition stérile.

2. Mise au point des techniques

la plupart des laboratoires qui pratiquent des études d'activité fonctionnelle avec des Ac anti-D utilisent des hématies marquées au ^{51}Cr . L'usage de la radioactivité n'est pas toujours possible compte tenu des autorisations nécessaires à la manipulation des radioéléments. De

plus, dans certaines entreprises, l'emploi de substances radioactives est proscrit, ce qui est d'ailleurs le cas du LFB sur le site industriel de Trévis. C'est pourquoi il a été nécessaire de mettre au point une technique colorimétrique pour pouvoir évaluer l'activité biologique des anti-D.

L'équipe de Kaiho *et al* (Kaiho, 1985) avait décrit l'utilisation du 2,7 diaminofluorène pour doser l'hémoglobine dans le cadre d'études sur la différenciation des érythrocytes. Le principe de la technique consiste à utiliser la propriété pseudopéroxydasique de l'hémoglobine pour oxyder les deux groupements amines du 2,7 diaminofluorène (DAF ou 2,7 fluorenediamine $C_{13}H_{12}N_2$) en 2,7 dinitrofluorène (figure D.1) (Kaiho, 1985 ; Worthington, 1987 ; Gebran, 1992). Cette oxydation permet l'obtention d'un composé bleuté : le bleu de fluorène dont la quantité sera évaluée par mesure de DO à 620 nm (Gebran, 1992). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'hémoglobine libérée.

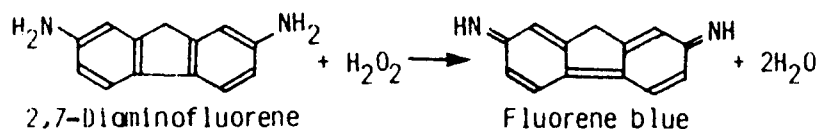


Figure D.1 : formation du bleu de fluorène à partir du 2,7-diaminofluorène par l'activité pseudopéroxydasique de l'hémoglobine (Kaiho, 1985).

Cette technologie a été reprise par Gebran *et al.* (Gebran, 1992) pour mesurer l'activité de phagocytose et d'ADCC avec l'utilisation de cellules effectrices murines. Compte tenu des résultats intéressants obtenus par ces deux équipes, le test au 2,7 diaminofluorène (DAF) a été utilisé pour remplacer le marquage d'hématies au ^{51}Cr .

Dans un premier temps, il a été nécessaire de contrôler la faisabilité du test, et en particulier sa sensibilité, puis de définir les conditions optimales permettant d'évaluer la capacité des anti-D à induire une lyse spécifique (ADCC) et une phagocytose d'hématies Rh(D) positif sensibilisées (Ducrot, 1996).

Le test au DAF est une technique sensible capable de doser l'hémoglobine contenue dans un minimum de 10^4 hématies. De plus, une linéarité du dosage est obtenue entre 10^4 et 2.10^5

hématies. Les résultats des études fonctionnelles pourront donc être exprimés soit en quantité d'hémoglobine libérée (mesure de DO) soit en nombre d'hématies lysées ou phagocytées. Pour ce dernier mode d'expression, la quantité moyenne d'hémoglobine contenue dans un nombre donné d'hématies a été définie et une courbe d'étalonnage avec des concentrations d'hémoglobine fixées doit être réalisée lors de chaque dosage.

2.1. Mise au point du test d'ADCC

A partir de ces résultats, les conditions expérimentales pour mesurer l'activité de la lyse cellulaire anticorps dépendante (ADCC) ont été mises au point. Des cellules mononucléées humaines séparées à partir de buffy coats ont été essentiellement utilisées comme cellules effectrices. L'approvisionnement en buffy coats était aisé compte tenu de la proximité du service Plasma de l'ETS de Lille. Généralement, les buffy-coats étaient traités au maximum 24 heures après les prélèvements sanguins. Après séparation sur Percoll, le pourcentage moyen de monocytes dans les suspensions cellulaires de 25 +/- 11% était similaire à celui obtenu par Hadley *et al* (Hadley, 1989b). Une concentration de 10⁶ cellules par puits a, le plus souvent, été utilisée avec un ratio moyen de 1 cellule mononucléée pour 5 hématies. La majorité des tests a été réalisée après 18 heures d'incubation à 37°C.

Pour minimiser les variations dues à l'hétérogénéité des différentes préparations de cellules effectrices, un mélange de trois suspensions cellulaires provenant de trois donneurs différents a toujours été utilisé. Cette hétérogénéité a déjà été décrite (Munn, 1977 ; Armstrong, 1987 ; Hadley, 1988 ; Armstrong-Fisher, 1995). Les différences pouvaient être expliquées par des proportions variables de lymphocytes et de monocytes entre les différentes préparations. De plus, les cellules effectrices expriment différents récepteurs pour la partie Fc des IgG (FcγR) : FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16) (Fridman, 1992 ; Sarmay, 1992a ; Winkel, 1993 ; Jefferis, 1994) en proportion variable selon le type cellulaire (Gergely, 1992).

Enfin, la spécificité du test ADCC a été vérifiée dans la mesure où tous les contrôles réalisés soit avec des cellules effectrices seules, soit avec des cellules effectrices et des hématies non sensibilisées soit avec des hématies sensibilisées seules ont donné des valeurs de DO faibles, toujours inférieures à 0,2.

Les activités ADCC de certains Ac détectées par la technique ^{51}Cr et par coloration au DAF ont été comparées. Les résultats obtenus avec les hématies marquées au ^{51}Cr ont montré une activité de lyse supérieure pour les Ac monoclonaux par rapport au polyclonal anti-D P1. Par contre, les différences décrites entre les Ac monoclonaux sont retrouvées dans les deux techniques. Même si le marquage des hématies au ^{51}Cr est encore utilisé dans la plupart des laboratoires pour la réalisation de tests d'ADCC avec des cellules mononucléées (Hadley, 1989b ; Kumpel, 1990b), avec des monocytes (Fleer, 1978 ; Wiener, 1988 ; Hadley, 1989c ; Gorick, 1991), ou avec des lymphocytes (Urbaniak, 1979a, 1979b ; Armstrong, 1987 ; Kumpel, 1988), l'emploi de produits non radioactifs est un avantage non négligeable. La préparation des solutions pour le test au DAF est simple, non cancérigène et les réactions sont faciles à mettre en oeuvre à la différence des manipulations de produits radioactifs qui nécessitent des locaux agréés et un matériel spécialisé.

2.2. Mise au point du test de phagocytose

La mise au point du test de phagocytose par la technique au DAF a permis de réaliser des études quantitatives à la différence de plusieurs autres techniques déjà décrites. En effet, certaines équipes ont utilisé pour la mesure de l'activité de phagocytose une observation microscopique des cellules effectrices. Les résultats sont alors présentés comme un pourcentage de monocytes ayant ingéré au moins une hématie ou comme un pourcentage de monocytes ayant non seulement ingéré mais aussi fixé à leur surface des hématies sensibilisées (Hunt, 1980 ; 1981). Les auteurs parlent alors d'index d'association correspondant au nombre total d'hématies adhérees et phagocytées (Schanfield, 1981) ou d'index d'attachement correspondant au nombre d'hématies adhérees ou d'index de phagocytose correspondant au nombre d'hématies ingérées (Branch, 1984).

Des techniques basées sur la chemiluminescence ont été également mises au point afin de mesurer la réponse métabolique des monocytes après la phagocytose d'hématies sensibilisées (Hadley, 1988, 1989b, 1992b). En effet, les radicaux oxygénés générés par les monocytes durant l'érythrophagocytose réagissent avec le luminol produisant un signal lumineux (Hadley,

1988). Toutefois, la mesure de la phagocytose par la technique à la chemiluminescence n'est que semi-quantitative.

D'autres techniques utilisant notamment la cytométrie de flux ou la spectrophotométrie permettent de faire des mesures de la phagocytose en utilisant notamment un marqueur devenant fluorescent sous l'action des composés oxygénés présents dans la cellule au moment de la destruction intracellulaire (Perticarari, 1994). La quantification de la phagocytose est alors possible avec la mesure de billes de polystyrène couplées à la fluorescéine se trouvant à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules effectrices (Uff, 1993).

A partir du protocole expérimental décrit par Gebran *et al.* (Gebran, 1992), un nouveau type de test phagocytose a été mis au point au laboratoire en reprenant le principe de l'oxydation du DAF en bleu de fluorène par l'activité pseudopéroxydasique de l'hémoglobine déjà décrit pour les études d'ADCC.

L'évaluation de la phagocytose a cependant dû être faite dans des conditions expérimentales différentes de celles utilisées pour l'ADCC. En effet, le bon fonctionnement du test requiert l'utilisation de SVF au cours des incubations. La nécessité d'ajouter du SVF pour obtenir une phagocytose avait déjà été décrite par Wiener *et al.* (Wiener, 1988) pour dissocier la mesure de l'index d'association de l'index de phagocytose. Il n'a donc pas été possible de réaliser un test d'ADCC et un test de phagocytose simultanément avec les mêmes cellules effectrices.

La mesure de l'activité phagocytose est réalisée en plaque de culture de 24 puits avec $2 \cdot 10^6$ cellules effectrices par puits et un ratio de 1 cellule pour 5 hématies. Les cellules effectrices utilisées correspondent à la fraction adhérente des cellules mononucléées humaines. Compte tenu du délai de l'incubation à 37°C, les cellules effectrices ont été qualifiées de monocytes activés et non de macrophages. En effet pour travailler avec des macrophages, il aurait fallu prolonger le temps d'incubation à 37°C mais dans ces conditions, il est très difficile de récupérer les cellules adhérentes sans les détériorer. Certaines équipes qui travaillent à la préparation de cellules activées pour des applications thérapeutiques ont mis au point les conditions de préparations de macrophages humains activés. De telles cellules activées ont été obtenues par une équipe de recherche clinique et transférées à l'équipe de Recherche et

Développement Biotechnologies du LFB des Ulis et seront utilisées pour comparer les activités fonctionnelles des anti-D.

Dans les préparations cellulaires utilisées au cours de ce travail, les monocytes activés représentent en moyenne 65% des cellules. Les autres cellules correspondent essentiellement à des lymphocytes B qui sont également adhérents à 37°C. Tous les résultats qui ont été présentés correspondent réellement à la phagocytose d'hématies sensibilisées c'est à dire aux hématies internalisées dans les cellules effectrices. Pour obtenir ces résultats, il a fallu s'assurer de l'élimination complète des hématies adhérentes. Après plusieurs essais, les hématies non phagocytées ont été éliminées par lavages en tubes sans que les cellules effectrices soient altérées.

L'étude cinétique réalisée a montré la rapidité avec laquelle les hématies sensibilisées peuvent être phagocytées. Une nette activité a été décelée dès les 30 premières minutes d'incubation pour atteindre un maximum à 90 minutes. Après 120 minutes, les valeurs de DO ont toujours été plus faibles. Cette observation pourrait être expliquée par un début de dégradation de l'hémoglobine par les enzymes lysosomiales des cellules effectrices. L'hémoglobine serait ainsi altérée et perdrait une partie de son activité pseudopéroxydasique. Malgré la présence de nombreuses enzymes dans les cellules effectrices, les contrôles du test de phagocytose, réalisés avec des cellules effectrices seules ou des cellules et des hématies non sensibilisées ont donné des valeurs relativement faibles de DO mettant ainsi en évidence la spécificité du test.

2.3. Mise au point du test de Sol-ELISA

Afin d'essayer d'évaluer la quantité d'anti-D qu'il est possible de fixer sur les hématies Rh(D) positif, deux techniques ont été développées : le CELISA et le Sol-ELISA.

Le CELISA est un test ELISA sur cellules. Plusieurs conditions expérimentales ont été essayées en ce qui concerne la fixation des hématies à la surface des puits de plaques pour immuno-dosage ainsi que différentes conditions de saturation. Toutefois, il n'a pas été possible de supprimer la fixation aspécifique des IgG polyvalentes. Ainsi les tests réalisés avec les Ig polyclonales spécifiques anti-D ne peuvent être considérés comme fiables en raison de la

proportion importante d'IgG dans les préparations. De plus, les résultats obtenus avec les Ac monoclonaux ont toujours été très faibles et donc difficilement exploitables. Compte tenu des nombreux problèmes de mise au point rencontrés, le développement du test CELISA n'a pas été poursuivi. Cette étude sera toutefois utilisée pour la réalisation d'études d'interactions antigène/anticorps avec un BIAcore 2000 et un BIAlite (Biosensor - Pharmacia). Ce type de biocapteur permet d'avoir des informations en temps réel sur les constantes d'association et de dissociation d'Ac vis à vis de leur ligand (Karlsson, 1993). Des premiers essais ont été réalisés en fixant les hématies sur le sensor chip avec la concanavaline A. Pour cela, la lectine a été immobilisée de manière covalente sur la matrice de dextran carboxylé du sensor chip. Quelques résultats ont déjà été obtenus mais ils sont trop préliminaires pour pouvoir être présentés.

Le Sol-ELISA a été développé à partir du protocole proposé par Kumpel (Kumpel, 1990c). Cette technique consiste à fixer les anti-D sur des hématies et, après lavage et lyse des hématies, à doser les IgG anti-D par ELISA.

En présence d'Ig polyvalentes, aucune fixation aspécifique n'a été démontrée. Ce test Sol-ELISA a donc permis de mesurer de façon précise la quantité d'anti-D fixés sur des hématies Rh(D) positif. Des résultats spécifiques ont été obtenus aussi bien avec les Ig polyclonales anti-D qu'avec les Ac monoclonaux anti-D. Pour simplifier les calculs et la présentation des résultats de Sol-ELISA, les données ont été exprimées en quantité d'anti-D fixée en $\mu\text{g/ml}$. Une étude de validation réalisée avec le polyclonal P1 a montré une bonne répétabilité du test. Par contre, des variations importantes ont été obtenues lors d'une étude de la reproductibilité ; variations inhérentes à l'utilisation d'hématies de donneurs différents.

2.4. Mise au point du test d'activation du complément

Pour contrôler si les Ac anti-D sont capables d'induire une activation du complément, deux techniques d'agglutination ont été développées à partir de protocoles utilisés couramment en immuno-hématologie. En effet, certains Ac sériques peuvent activer le complément avec un dépôt de fractions $\text{C}_{3\text{b}}$ à la surface des hématies. Cette activation peut être à l'origine d'anémies hémolytiques, les hématies étant éliminées après reconnaissance des récepteurs du complément exprimés par certaines cellules monocytaires (Ehlenberger, 1977).

La mise en évidence de fractions C_{3b} à la surface d'hématies a été faite par agglutination en utilisant un Ac monoclonal d'origine murine anti- C_{3d} . Pour vérifier la fonctionnalité des tests, un Ac monoclonal anti- Jk^b a été utilisé (Lecointre-Coatmelec, 1991). Un contrôle de l'expression de C_{3b} a également été fait à l'aide de la cytométrie de flux en utilisant un anti- C_{3d} murin et un deuxième Ac couplé à la fluorescéine.

L'étape de mise au point des tests utilisés au cours de ce travail a été indispensable pour pouvoir présenter des résultats fiables et faire des études comparatives des propriétés fonctionnelles entre les anti-D polyclonaux et les Ac monoclonaux anti-D. Toutes les données présentées correspondent à des manipulations réalisées en respectant rigoureusement les conditions expérimentales définies lors des mises au point. Pour certaines manipulations, des procédures et des fiches de travail ont été écrites en conformité avec les recommandations des Bonnes Pratiques de Laboratoire. Cet aspect réglementaire du travail est nécessaire à mettre en place dans la mesure où certains produits décrits pourront être utilisés en expérimentation clinique. C'est le cas des deux Ac monoclonaux AD1 et AD3. D'autre part, le test de dosage des IgG par ELISA a été validé conformément aux recommandations en vigueur : étude de la spécificité, de la sensibilité, de la linéarité, du seuil de détection et de la précision (répétabilité et reproductibilité) de la technique.

L'utilisation de ces tests a permis une meilleure caractérisation des propriétés fonctionnelles des anti-D. De plus, les tests d'ADCC et de phagocytose par coloration au DAF ont été inclus dans la réalisation d'une étude de la stabilité de lots d'Acm anti-D et ont été utilisés pour l'évaluation d'Acm anti-D lors du troisième atelier international sur les Ac monoclonaux. Le test Sol-ELISA a complété les dosages réalisés par la technique autoanalyseur pour le LFB - Lille sur les préparations d'Ig polyclonales spécifiques anti-D.

3. Etude du mécanisme d'action des anti-D

Le remplacement des Ac polyclonaux anti-D par des Ac monoclonaux dans la prévention de l'allo-immunisation à l'Ag D implique nécessairement une évaluation de ces Ac en tests *in*

vitro. La méconnaissance du mode d'action des Ac polyclonaux anti-D utilisés en prophylaxie (Woodrow, 1975 ; McCann, 1988 ; Kumpel, 1990a ; Contreras, 1994) entraîne par conséquent une difficulté dans le choix des tests à utiliser. Il semblerait, toutefois, que l'élimination *in vivo* des hématies foetales hors de la circulation maternelle soit un des phénomènes importants (Cf. introduction 4.1.), plusieurs mécanismes pouvant être impliqués simultanément. C'est pourquoi les différents Ac anti-D ont été testés pour leur capacité à induire la formation des rosettes et à induire les mécanismes de lyse extra-cellulaire et de phagocytose. La possibilité d'une éventuelle action du complément dans l'élimination des hématies Rh(D) positif n'a pas été exclue et la capacité des Ac anti-D à activer le complément a donc été testée.

La fixation des anti-D sur les sites antigéniques D étant l'étape préalable à l'activation des cellules effectrices, une étude de la réactivité des Ac anti-D a également été réalisée. Pour cela, une quantification des anti-D fixés sur les hématies Rh(D) positif a été réalisée par la technique Sol-ELISA et par cytométrie de flux. Des tests d'agglutination sur hématies OR_{1r} et sur hématies Rh(D) partiel ont également été réalisés.

A chaque analyse présentée ci-dessous, les résultats obtenus avec les polyclonaux seront, dans un premier temps, discutés puis, dans un deuxième temps, la discussion portera sur les résultats obtenus avec les 6 Ac monoclonaux anti-D. Ces derniers résultats seront généralement comparés à un polyclonal anti-D (polyclonal anti-D P1) utilisé comme témoin positif.

3.1. Etude de la réactivité des anti-D

3.1.1. Etude avec les Ac polyclonaux anti-D

Une étude de la répétabilité et de la reproductibilité du test Sol-ELISA a montré des variations importantes dans les quantités d'anti-D fixés à la surface des globules rouges lorsque les donneurs d'hématies sont différents. Ces différences de fixation peuvent être expliquées par une hétérogénéité de l'expression des antigènes D à la surface des hématies de donneurs différents même lorsque celles-ci sont du même phénotype (OR_{1r}) (Salmon, 1991).

Avec plusieurs polyclonaux anti-D utilisés à la concentration de sensibilisation de 1 µg/ml, l'étude cytométrique réalisée a montré des quantités d'Ac fixés sur les globules rouges

comparables. Toutefois, il semblerait qu'à cette concentration de sensibilisation la fixation des Ac sur l'Ag D soit proche de la saturation. Il convient donc d'interpréter les résultats précédents avec prudence. Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par Armstrong-Fisher *et al.* (Armstrong-Fisher, 1995) dans la mesure où cette équipe avait observé des quantités d'anti-D fixés sur les globules rouges comparables avec 5 lots de polyclonaux anti-D.

3.1.2. Etude avec les Ac monoclonaux anti-D

De grandes disparités dans la quantité d'anti-D fixés ont été par contre observées en cytométrie en flux avec les six Ac monoclonaux anti-D utilisés à la concentration de sensibilisation de 1 µg/ml. Ces variations concernaient aussi bien la moyenne de fluorescence que le pourcentage de cellules marquées.

Parmi tous les Ac monoclonaux, l'Ac HM16 est celui qui se fixe en plus grande quantité et l'Ac AD3 celui qui se fixe le moins bien. Ces différences dans les quantités d'Ac fixés sur les globules rouges sont encore plus nettes à de faibles concentrations de sensibilisation et peuvent être expliquées soit par des variations d'affinité des Ac, soit par des différences d'accessibilité des épitopes de l'Ag D pour un Ac (Hughes-Jones, 1987), soit par des différences d'expression des épitopes reconnus.

Compte tenu de ces résultats, deux concentrations de sensibilisation ont été retenues pour la réalisation des analyses fonctionnelles :

- une faible concentration de 100 ng/ml, pour différencier les propriétés de fixation des différents Ac et pour repérer les Ac qui réagissent le mieux,

- une concentration moyenne de 500 ng/ml qui se situe avant le plateau de saturation de la fixation des Acm sur les sites antigéniques D.

Un autre argument qui est intervenu dans le choix de ces concentrations de sensibilisation des hématies Rh(D) positif a été fourni par les études cliniques déjà réalisées. En effet, 24 heures après l'injection de 300 µg d'anti-D par voie intraveineuse chez des sujets volontaires, une concentration moyenne d'environ 35 ng/ml d'anti-D plasmatiques peut-être mise en évidence (résultats de l'étude de pharmacocinétique avec 16 volontaires Rh(D) négatif, essai

clinique LFB-Biotest, 1996). Une étude préliminaire a également été faite en injectant 300 µg des Ac AD1 et AD3 par voie intramusculaire à quatre volontaires sains et les concentrations d'anti-D plasmatiques retrouvés après 48 heures étaient d'environ 20 ng/ml. D'autre part, 24 heures après des injections de 1100 µg d'anti-D (Callaghan, 1993) et de 1500 µg d'anti-D (Goodrick, 1994) par voie intramusculaire, les concentrations d'anti-D plasmatiques retrouvées ont été, respectivement, de 400 ng/ml et de 100 ng/ml.

Une étude complémentaire de la réactivité des anti-D monoclonaux à l'aide des techniques d'agglutination a permis d'observer une supériorité de l'Ac AD3 à agglutiner les hématies Rh(D) positif. Ce résultat pourrait être dû à la sous-classe IgG3 de l'Ac en raison d'une différence de longueur de la région charnière par rapport aux IgG1 (voir Discussion 3.2.2.1.) ou d'une aggrégation spécifique des IgG3 par rapport aux IgG1 due à une auto-association des régions CH3 des IgG3 (Greenspan, 1992). Des résultats analogues ont été rapportés par Kumpel au cours des études des anti-D du troisième atelier international sur les Ac monoclonaux (1996). En ce qui concerne les résultats des titres et des scores obtenus pour les IgG1, les interprétations doivent être faites avec prudence compte tenu de la sensibilité moyenne des techniques d'agglutination, des erreurs liées aux nombreuses dilutions et de la subjectivité dans la lecture des intensités d'agglutination. Actuellement, il n'est plus envisageable de se baser uniquement sur de telles techniques pour déterminer la concentration d'Ac anti-Rhésus par exemple. Ces tests sont toutefois utilisés en routine dans tous les laboratoires d'immuno-hématologie (Goudemand, 1980).

L'utilisation d'hématies Rh(D) partiel dans les tests d'agglutination a permis de comparer la réactivité des anti-D monoclonaux et de définir que les 6 anti-D monoclonaux testés reconnaissent 4 épitopes différents de l'antigène D.

Une connaissance plus précise des épitopes reconnus ne permet pas d'expliquer les différences de fixation décrites précédemment entre les Acm. En effet, les différences de quantité d'anti-D fixés sur les hématies entre les Ac AD3, HM16, P3X212 et P3X35 notamment ne peuvent être imputées à une différence d'expression des différents épitopes sur la

membrane des globules rouges dans la mesure où les Ac AD3 et HM16 reconnaissent le même épitope (ép. D/6,7) de même que les Ac P3X212 et P3X35 (ép. D/5). La structure de l'Ac doit donc être à l'origine de ces variations comme l'indique les différences obtenues dans les tests d'agglutination des hématies entre les Ac.

Par ailleurs, un autre intérêt de connaître les épitopes de l'Ag D reconnus par les Ac est de pouvoir constituer des mélanges d'Ac qui reconnaîtraient des catégories d'hématies différentes mais ce point sera discuté ultérieurement (voir Discussion 3.4.).

L'analyse de la réactivité des anti-D sur un panel d'hématies Rh(D) partiel est une bonne approche pour définir les épitopes reconnus. Jusqu'à présent toutes les études ont été faites à l'aide de tests d'agglutination mais il pourrait être envisageable de tester la fixation des anti-D sur les hématies Rh(D) partiel avec la technique Sol-ELISA mise au point.

3.2. Etude des propriétés fonctionnelles des anti-D

3.2.1. Etude avec les polyclonaux et les sérums anti-D

Une étude a été réalisée avec le polyclonal anti-D P1 mais aussi avec d'autres polyclonaux anti-D afin de définir leurs propriétés fonctionnelles.

3.2.1.1. Etude en test d'ADCC

Les premiers résultats ont montré qu'une augmentation de l'activité ADCC avait été obtenue avec le polyclonal P1 en fonction de la concentration de sensibilisation des hématies pour des valeurs allant de 50 ng/ml à 500 ng/ml. Pour des concentrations supérieures, une saturation de l'activité est observée à cause de la saturation de la fixation des Ac sur les FcγR présents sur les cellules effectrices. Par conséquent, les concentrations de sensibilisation choisies (100 et 500 ng/ml) au cours de l'étude sur la réactivité des Ac, permettent une bonne interprétation de l'activité ADCC des Ac.

Testés en ADCC, les 6 polyclonaux anti-D ont été observés avec des propriétés de lyse extra-cellulaire comparables. Une activité ADCC a pu être décelée à partir de 90 minutes d'incubation pour l'ensemble des polyclonaux. Après une nuit d'incubation, les variations de la réponse ADCC entre les différents polyclonaux testés étaient très faibles que ce soit avec des cellules mononucléées ou des monocytes activés utilisés comme cellules effectrices. La

similitude de la réponse ADCC obtenue avec les 6 polyclonaux anti-D peut être expliquée par le fait que chaque produit est préparé à partir d'un mélange de plusieurs centaines de plasmas provenant de nombreux donneurs différents. Le fait de mélanger les prélèvements réduirait les écarts d'activité ADCC. Des variations de la réponse ADCC entre différents lots de polyclonaux anti-D ont cependant été décrites (Armstrong-Fisher, 1995). Une amélioration possible du test d'ADCC pourrait être obtenue. En effet, une diminution de ce temps d'incubation permettrait une meilleure observation des variations possibles entre les activités ADCC des polyclonaux anti-D et éviterait d'avoir, de ce fait, une saturation de la lyse extra-cellulaire.

Une hétérogénéité de la réponse ADCC a, par contre, été observée entre les sérums lorsque ceux-ci sont testés séparément. Cette hétérogénéité pourrait correspondre à des réponses différentes des sujets aux immunisations. Certaines personnes répondent beaucoup mieux que d'autres, ils sont appelés bons répondeurs, d'autres sujets sont plus réfractaires voire même non répondeurs (Mollison, 1970). De plus, des différences de la réponse ADCC pour des sérums d'un même donneur mais dont les prélèvements ont été faits à des temps différents ont été observées.

Par ailleurs, une activité ADCC supérieure ou égale à la valeur obtenue pour le polyclonal anti-D P1 a été observée à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml avec les sérums riches en anti-D. Ce résultat n'indique pas une activité plus importante en ce qui concerne les sérums mais plutôt une moins forte activité ADCC pour le polyclonal anti-D P1 à cette concentration de sensibilisation par rapport aux valeurs obtenues à la concentration de 500 ng/ml. Ce dernier résultat sera discuté ultérieurement avec l'étude sur les Ac monoclonaux.

3.2.1.2. Etude en test de phagocytose

Une étude en test phagocytose a également été réalisée afin d'évaluer la capacité des anti-D polyclonaux à induire une internalisation d'hématies Rh(D) positif sensibilisées avec des Ac anti-D.

Une activité phagocytaire a été obtenue avec le polyclonal anti-D P1 dès la concentration de sensibilisation de 50 ng/ml. Une augmentation de cette activité a été observée en relation

avec l'augmentation de la concentration de sensibilisation et une saturation de la réponse phagocytaire a été observée à partir de la concentration de 500 ng/ml.

La comparaison des différents polyclonaux anti-D en terme d'activité phagocytaire a également été réalisée. L'aptitude des cellules effectrices à induire une phagocytose d'hématies sensibilisées est très rapide puisque l'activité mesurée après 30 minutes d'incubation est déjà le double de celle obtenue avec les tests contrôles. De plus, après 90 minutes d'incubation, les 6 anti-D polyclonaux réagissent de façon comparable aux 2 concentrations utilisées de 100 et 500 ng/ml. Cette similitude de la réponse phagocytaire induite par les Ac polyclonaux s'explique également par l'origine des produits qui résultent d'un mélange de centaines de plasmas provenant de donneurs différents.

Des tests de phagocytose réalisés avec des hématies sensibilisées par des sérums riches en anti-D ont par ailleurs mis en évidence des variations de la phagocytose en fonction de la provenance du sérum. Les résultats de phagocytose obtenus avec les sérums riches en anti-D, par comparaison à ceux obtenus avec le polyclonal P1, ont montré qu'il y avait une meilleure activité phagocytaire du polyclonal P1 à la concentration de 500 ng/ml qu'à 100 ng/ml.

3.2.1.3. Rôle du complément

Certaines observations cliniques, déjà anciennes, avaient montré que chez des sujets présentant une déficience de certaines protéines du complément, il n'était pas possible de prévenir une allo-immunisation à l'antigène D. Ces auteurs laissaient donc supposer qu'un des mécanismes d'action de l'élimination d'hématies Rh(D) positif par des anti-D pouvait faire intervenir le système du complément, en particulier le dépôt de la fraction C3_b à la surface des hématies recouvertes d'Ac.

Afin de contrôler l'hypothèse évoquée ci-dessus, plusieurs tests ont été réalisés avec les 6 préparations de polyclonaux anti-D. Selon les deux techniques utilisées (agglutination et cytométrie de flux), aucune activation du complément n'a pu être mise en évidence. Même si ces techniques présentent certaines limites, en particulier dans leur sensibilité, il est très peu vraisemblable que les anti-D polyclonaux soient capables d'activer la fraction C1q du

complément. Cette absence d'activité pourrait être expliquée plus par la répartition et la conformation des antigènes Rh(D) que par la nature des Ac.

Cette première étude des Ig polyclonales spécifiques anti-D a permis de définir leur propriétés d'ADCC et de phagocytose. Le travail a été alors poursuivi afin de caractériser les propriétés fonctionnelles des Ac monoclonaux. Lors des manipulations, le polyclonal P1 sera utilisé à titre de référence. En effet, l'objectif est d'essayer de sélectionner un ou plusieurs Ac monoclonaux présentant une activité fonctionnelle au moins comparable à celle des polyclonaux voire si possible supérieure.

3.2.2. Etude avec les Ac monoclonaux anti-D

3.2.2.1. Formation de rosettes

Dans un premier temps, une comparaison de la propriété à induire la formation de rosettes avec des suspensions de monocytes activés a été réalisée avec les anti-D monoclonaux. Cette étude a mis en évidence des différences importantes entre les anti-D. En effet, la capacité de l'Ac HM16 à induire la formation de rosette est assez faible alors que les 4 autres IgG1 ont présenté une activité comparable à celle obtenue avec le polyclonal P1. Par contre, l'Ac AD3, de sous-classe IgG3, a la capacité d'induire des rosettes à très faible concentration (à partir de 5 ng/ml) alors que les IgG1 n'ont aucun effet à cette concentration. De plus, les rosettes observées avec l'anticorps AD3 ont une taille beaucoup plus importante.

De tels résultats, concernant la supériorité de la sous-classe IgG3 à induire la formation de rosettes, ont déjà été décrits (Abramson, 1972 ; Zupanska, 1986 ; Wiener, 1987 ; Kumpel, 1988 ; Walker, 1988 ; Hadley, 1989b ; 1989c ; Kumpel, 1990a). Une explication serait que la fixation des IgG3 est plus efficace que celle des IgG1 en raison d'une zone charnière plus longue pour les IgG3. Cette différence de taille permettrait donc un éloignement plus important des charges négatives des deux cellules (hématies et cellules effectrices) stabilisant ainsi la fixation (Walker, 1988 ; Hadley, 1992a) (figure D.2). Une autre hypothèse serait que l'IgG3

présente une meilleure accessibilité des sites de fixation au FcR toujours en relation avec cette différence de longueur de la région charnière (Wiener, 1987) (figure D.3).

La première hypothèse avait été vérifiée par Kumpel et Hadley (Kumpel, 1990a) en traitant les cellules effectrices avec de la neuraminidase. Ce traitement permet de réduire les charges cellulaires ce qui réduit la répulsion entre les cellules entraînant ainsi une augmentation de l'efficacité des IgG1 à former des rosettes par rapport aux IgG3. La différence de longueur de l'IgG3 ne lui conférerait plus, par conséquent dans ce test, d'avantage par rapport aux IgG1.

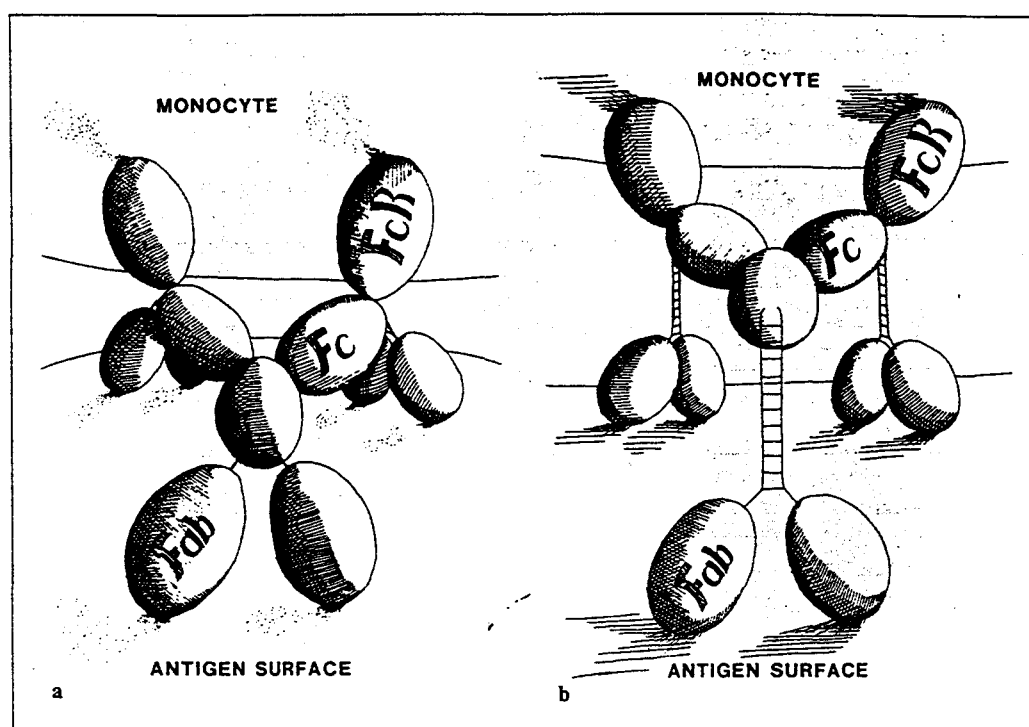


Figure D.2 : représentation schématique d'une IgG1 (a) et d'une IgG3 (b) fixées à la fois au niveau de l'antigène et au niveau du récepteur FcγRI (Walker, 1988).

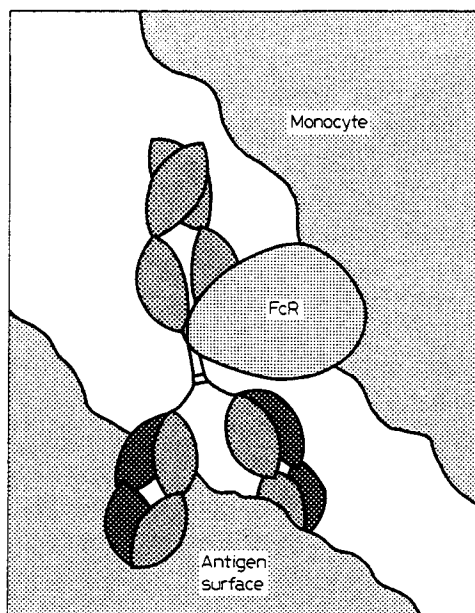


Figure D.3 : représentation schématique d'une IgG1 fixée à un récepteur Fc. L'IgG1 humaine est elle-même fixée à un antigène de surface (Woof, 1986).

Le test de formation des rosettes n'a pas été très développé dans ce travail en raison du caractère très subjectif des lectures réalisées au microscope. De plus, il ne permet pas de rendre compte d'un paramètre important qui est la taille des rosettes. En effet, des différences importantes du nombre d'hématies fixées peuvent être relevées entre les Ac mais ces différences sont difficiles à apprécier et à transcrire.

3.2.2.2. Etude en test d'ADCC

Dans un deuxième temps, la capacité des anti-D monoclonaux à induire une activité ADCC a été évaluée.

Une étude cinétique, comparable à celle qui a été décrite avec les polyclonaux anti-D, a montré un début de lyse extra-cellulaire dès 60 minutes d'incubation, à la concentration de sensibilisation de 500 ng/ml, pour les Ac AD1 et P3X83 et légèrement plus tard pour les autres Ac monoclonaux. L'étude cinétique réalisée avec les anti-D, cette fois à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml, a montré des réponses plus faibles en valeur de DO par rapport à celles obtenues à 500 ng/ml et un début de lyse à partir de 2 heures d'incubation.

L'activité ADCC des différents Ac monoclonaux anti-D a ensuite été comparée. En premier lieu, un test d'ADCC a montré qu'après une nuit d'incubation, seul l'Ac HM16 était

capable d'induire une lyse à partir de la concentration de sensibilisation de 10 ng/ml. Tous les Ac testés à la concentration de 100 ng/ml ont été capable d'induire une activité ADCC nettement décelable. Les concentrations de sensibilisation choisies dans l'étude de la réactivité des Ac (100 et 500 ng/ml) permettaient donc une étude en ADCC.

Une synthèse de plusieurs tests d'ADCC aux deux concentrations de sensibilisation a donc été réalisée. En raison des variations importantes observées entre plusieurs séries de tests réalisés avec des cellules effectrices et des hématies sensibilisées de provenance différentes, les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport au polyclonal de référence : le polyclonal anti-D P1. Au regard des résultats, plusieurs commentaires peuvent être faits :

- à la concentration de 100 ng/ml, de grandes différences d'activité ADCC ont été observées entre les Ac monoclonaux. L'activité de lyse de l'Ac HM16 est par ailleurs très nettement supérieure aussi bien par rapport aux autres Ac monoclonaux que par rapport au polyclonal anti-D P1. De plus, l'ensemble des Ac monoclonaux présente une activité sinon supérieure du moins comparable au polyclonal anti-D P1.

- à la concentration de 500 ng/ml, les différentes propriétés de lyse observées pour les Ac monoclonaux sont comparables à celle obtenue avec le polyclonal anti-D P1. De plus, les écarts de réponse entre les Acm se sont réduits par rapport aux grandes variations observées à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml. Les résultats d'ADCC obtenus avec les Ac monoclonaux anti-D à la concentration de sensibilisation extrême de 10 µg/ml confirme cette dernière analyse.

Les activités ADCC moins fortes induites par les Ac monoclonaux par rapport au polyclonal anti-D P1 lorsque la concentration de sensibilisation passe de 100 à 500 ng/ml s'explique par une réponse plus efficace du polyclonal P1 à 500 ng/ml qu'à 100 ng/ml par rapport aux Acm. Ce phénomène a été observé aussi bien dans les tests comparant les Ac produits au laboratoire que dans les tests d'ADCC concernant les Ac du 3^{ème} atelier international sur les Ac monoclonaux. Cependant, il semblerait que les quantités d'anti-D fixés sur les hématies observées en test Sol-ELISA n'augmentent pas lorsque la concentration de sensibilisation avec le polyclonal anti-D P1 passe de 100 à 500 ng/ml.

Les 6 anti-D monoclonaux sélectionnés sont donc plus efficaces que le polyclonal anti-D P1 à induire une lyse extra-cellulaire d'hématies à faible concentration de sensibilisation (100 ng/ml) alors que leur activité ADCC est comparable à des concentrations plus fortes (500 ng/ml).

Il est difficile de comparer ces résultats avec des travaux déjà publiés dans la mesure où les conditions expérimentales sont souvent assez différentes en particulier au niveau des techniques de sensibilisation des hématies et de la nature des cellules effectrices utilisées. A titre indicatif, le tableau D1 montre qu'en règle générale une activité ADCC plus importante est induite avec des IgG3 qu'avec des IgG1 et ce aussi bien avec des monocytes ou des cellules mononucléées comme cellules effectrices. En utilisant des lymphocytes comme cellules effectrices, une activité ADCC supérieure pour les IgG1 a été décrite par rapport aux IgG3.

Les suspensions cellulaires utilisées comme cellules effectrices dans les tests fonctionnels présentaient des proportions différentes de lymphocytes et de monocytes. Une étude de l'activité des anti-D monoclonaux a donc pu être réalisée en fonction du pourcentage de lymphocytes présents. Ainsi deux groupes d'Ac ont pu être définis. Le premier est constitué des deux IgG1 HM16 et P3X83 induisant une activité ADCC d'autant plus forte que la proportion de lymphocytes est plus élevée. Le deuxième groupe d'anti-D est constitué des IgG1 AD1, P3X212, P3X35 et de l'IgG3 AD3 dont l'activité serait plus monocytes dépendante en raison de l'absence de corrélation obtenue en fonction du pourcentage de lymphocytes présents.

Des observations concernant cette différence d'activité ADCC en relation avec la présence de lymphocytes comme cellules effectrices ont été publiées par l'équipe de Kumpel *et al.* (Kumpel, 1995a). En effet, des résultats différents ont été observés entre deux anti-D de sous-classe différente en fonction de la nature des cellules effectrices. L'IgG1 BRAD-5 présente une activité ADCC supérieure à celle induite par l'IgG3 BRAD-3 quand les cellules effectrices sont composées essentiellement de lymphocytes (cellules NK). Par contre, une meilleure activité lytique a été obtenue avec l'IgG3 BRAD-3 quand les cellules effectrices sont majoritairement des monocytes-macrophages.

Références	Cellules effectrices	Hématies	Sensibilisation	ratio	A c	Temps d'incubation	Résultats
Kumpel, 1988	lymphocytes	NC	NC	1 hématie / 15 lymphocytes	NC	18 à 37°C	IgG1 < IgG3
Wiener, 1988	monocytes	O R2r	de 0,1 à 10 µg/ml pour 10 ⁸ h ^t	1 hématie/1 monocyte	Acm IgG1 et IgG3 (Surnageant)	20 heures à 37°C	IgG3 > IgG1
Hadley, 1989b	PBMC	O R2R2	de 0,5 à 45.10 ³ IgG/hématie	1 hématie/10 PBMC	Sérum IgG1 Sérum IgG3 Acm IgG1 et IgG3	4 heures à 37°C	IgG3 > IgG1
Hadley, 1989c	monocytes	OR1R2	8 à 9.10 ³ IgG/hématies	1 hématie/2 monocytes	Acm IgG1 et IgG3	NC	IgG3 > IgG1
Hadley, 1989c	lymphocytes	OR1R2	20 000 IgG/hématies	1 hématie/15 lymphocytes	Acm IgG1 et IgG3	NC	IgG1 > IgG3
Kumpel, 1990a	PBMC	O R1R2	40.10 ³ IgG/hématie	31 hématies/3 monocytes	Acm IgG1 et IgG3	4 heures à 37°C	IgG3 > IgG1

Tableau D.1 : récapitulatif de plusieurs tests d'ADCC réalisés par d'autres laboratoires. NC : Non Communiqué.

Des tests d'ADCC ont également été réalisés en utilisant en parallèle la lignée cellulaire U937 activée par de l'interféron- γ et des cellules mononucléées comme cellules effectrices. Les résultats obtenus ont mis en évidence une activité ADCC induite par le polyclonal anti-D P1 plus faible par rapport aux Ac monoclonaux anti-D lorsque les cellules U937 activées sont utilisées comme cellules effectrices. Ces résultats seraient, par conséquent, discordants avec ceux obtenus avec les tests d'ADCC utilisant des cellules mononucléées comme cellules effectrices dans lesquels le polyclonal anti-D P1 est observé, à la concentration de 500 ng/ml, avec une activité supérieure ou égale à celle des Ac monoclonaux anti-D.

Une explication proviendrait d'une différence d'expression des Fc γ R sur la cellule effectrice dans la mesure où les trois types de récepteurs sont retrouvés avec les cellules mononucléées alors que la U937, du fait de son activation à l'interféron- γ , n'exprimerait principalement que le Fc γ RI (Boltz-Nitulescu, 1995 ; Paquette, 1995).

Tous ces résultats d'ADCC montrent l'importance, tout du moins *in vitro*, du type de Fc γ R impliqué dans la reconnaissance et dans l'activité fonctionnelle de l'Ac. En effet, trois classes de récepteur pour la région Fc des IgG (Fc γ receptor : Fc γ R) ont été identifiées chez l'homme (Anderson, 1986) : Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII. La distribution cellulaire des Fc γ R, résumée dans le tableau D.2, est variable.

Classe	Masse Moléculaire	Affinité	Distribution
Fc γ RI (CD64)	70000 - 72000	grande affinité pour les IgG monomériques (10^{-8} - 10^{-9} M)	monocytes macrophages neutrophiles (activés) éosinophiles
Fc γ RII (CD32)	40000	faible affinité pour les IgG monomériques ($< 10^{-7}$ M)	monocytes macrophages neutrophiles plaquettes éosinophiles basophiles lymphocytes B
Fc γ RIII (CD16) Fc γ RIIIa	50000- 70000	moyenne affinité pour les IgG monomériques ($3 \cdot 10^{-7}$ M)	macrophages monocytes (sous-population) monocytes (activés) cellules K cellules NK lymphocyte T (sous-population)
Fc γ RIIIb		faible affinité pour les IgG monomériques ($< 10^{-7}$ M)	neutrophiles éosinophiles (activés)

Tableau D.2 : Distribution cellulaire des Fc γ R humains (Gergely, 1992 ; van de Winkel, 1993).

Le Fc γ RI (CD64) est un récepteur de forte affinité pour les IgG monomériques de sous-classes IgG1 et IgG3. L'affinité de la fixation est moindre, par contre, pour les IgG4 et le Fc γ RI ne fixe pas les IgG2. Le Fc γ RI semble être le principal récepteur impliqué dans la fixation des hématies sensibilisées (Wiener, 1988 ; Engelfriet, 1992) ainsi que dans les activités de lyse extracellulaire (Unkeless, 1988 ; Wiener, 1988 ; Klaassen, 1990 ; Kumpel, 1990a ; Engelfriet, 1992) et de phagocytose (Wiener, 1988).

Le Fc γ RII (CD32) est un récepteur de faible affinité pour les IgG monomériques (Parren, 1992) et semblerait ne pas être impliqué dans la fixation des hématies sensibilisées avec les anti-D (Kumpel, 1990a) même si son rôle précis reste encore à définir.

Le Fc γ RIII (CD16) est un récepteur de moyenne affinité pour les IgG monomériques de sous-classes IgG1 et IgG3 mais ne fixe que très faiblement les IgG2 et les IgG4 (Parren, 1992). Ce récepteur est exprimé notamment sur les macrophages et les cellules NK (Fanger, 1989) et une augmentation du taux de récepteurs Fc γ RIII a été observée au cours de l'activation des monocytes en macrophages (Unkeless, 1988 ; Klaassen, 1990). Il est de plus fortement exprimé sur les macrophages tissulaires présents dans le foie, la rate et le poumon (Unkeless, 1988 ; Klaassen, 1990).

Le Fc γ RI étant un récepteur de forte affinité pour les IgG monomérique, un phénomène de compétition de fixation au niveau de ce récepteur semble être l'explication du blocage obtenu par des IgG polyvalentes au cours des tests d'ADCC. En effet, un premier essai entrepris avec une IgG1 d'origine monoclonale a montré qu'il était possible d'inhiber l'activité ADCC des anti-D de sous-classe IgG à condition d'ajouter des concentrations d'IgG1 assez élevées (à partir de 1 μ g/ml). Une deuxième manipulation réalisée avec des quantités plus importantes d'IgG a permis d'obtenir une inhibition totale de l'ADCC pour l'ensemble des Acm excepté l'Ac AD3, de sous-classe IgG3, avec lequel l'inhibition de l'ADCC était beaucoup plus difficile à obtenir. Un paramètre important à préciser est que les concentrations d'IgG polyvalentes capables d'inhiber *in vitro* l'ADCC sont très nettement inférieures à celles des IgG circulantes dans le plasma.

Une étape indispensable au mécanisme de lyse extracellulaire des hématies sensibilisées étant la fixation de l'Ac sur les Fc γ R, une relation peut être établie entre la force de liaison des globules rouges sensibilisés avec une IgG3 aux cellules cibles et la difficulté à inhiber l'activité ADCC médiée par cet Ac. En effet, il a été précédemment discuté que les IgG3 devaient se fixer plus efficacement que les IgG1 en raison d'une zone charnière plus longue. D'autant qu'il semblerait que la formation de rosettes soit essentiellement réalisée par l'intermédiaire du Fc γ RI (Walker, 1988 ; Kumpel, 1990a) et que les deux sous-classes d'Ac (IgG1 et IgG3) sont en compétition pour les mêmes récepteurs (Abramson, 1972) avec une affinité comparable (Burton, 1985).

3.2.2.3. Etude en test de phagocytose

Pour étudier la propriété des Ac monoclonaux anti-D à induire une internalisation d'hématies Rh(D) positif sensibilisées, des tests de phagocytose ont également été réalisés.

En premier lieu, un test de phagocytose a montré qu'après 90 minutes d'incubation, tous les Ac monoclonaux induisaient une activité phagocytaire aux deux concentrations de sensibilisation choisies (100 et 500 ng/ml). Aucun effet n'a été observé à la concentration de 10 ng/ml.

Une synthèse des résultats de plusieurs tests phagocytose aux deux concentrations de 100 et 500 ng/ml a donc été réalisée afin de comparer la capacité des Ac monoclonaux à induire une phagocytose. Les réponses obtenues avec les Ac monoclonaux ont été exprimées en pourcentage d'activité par rapport à l'activité phagocytaire du polyclonal anti-D P1.

Testés à la concentration de sensibilisation de 100 ng/ml, les anti-D monoclonaux présentent une activité de phagocytose comparable à celle du polyclonal P1. Les différences d'activité entre les Ac sont de moindre importance à l'exception de l'Ac P3X35 dont l'activité a été observée comme la plus faible.

A une plus forte concentration de sensibilisation (500 ng/ml), l'activité de phagocytose des anti-D monoclonaux est nettement inférieure à celle obtenue avec le polyclonal P1. Ce

résultat est dû, comme pour l'ADCC, à une meilleure activité fonctionnelle du polyclonal P1 par rapport aux Ac monoclonaux à la concentration de sensibilisation de 500 ng/ml plutôt qu'à 100 ng/ml. Parmi les IgG1, l'Ac P3X83 induit une activité de phagocytose plus élevée que les autres anti-D. L'activité de phagocytose de l'Ac AD3, de sous-classe IgG3, a, par contre, été observée plus faible par rapport aux IgG1 à la concentration de 500 ng/ml.

A une concentration de sensibilisation plus élevée (10 µg/ml), les pourcentages d'activité des IgG1 sont encore plus faibles qu'à la concentration de 500 ng/ml, confirmant ainsi l'augmentation de l'activité phagocytaire du polyclonal P1. Par ailleurs, à cette concentration de sensibilisation de 10 µg/ml, l'Ac P3X83 induit toujours une activité phagocytose supérieure aux autres IgG1. Par contre, une comparaison de l'ensemble des Ac monoclonaux montre que l'Ac AD3 (IgG3) induit, cette fois, une activité de phagocytose supérieure et comparable à celle du polyclonal anti-D P1. A la concentration de sensibilisation de 10 µg/ml, l'Ac AD3 induit une phagocytose supérieure par rapport aux IgG1 alors qu'à 100 ng/ml l'inverse a été observé.

A titre indicatif, le tableau D.3 résume plusieurs résultats déjà publiés. En règle générale l'index d'association et d'attachement est supérieur pour les IgG3 par rapport aux IgG1 alors que pour l'index de phagocytose la relation avec la sous-classe est plus difficile à établir. En ce qui concerne les tests en chemiluminescence, les résultats observés montrent une prédominance de l'activité de phagocytose pour les IgG3 par rapport aux IgG1. La comparaison de ces données bibliographiques avec les résultats obtenus au cours de ce travail est une nouvelle fois délicate. En effet, des variations de la phagocytose entre des IgG1 et des IgG3 ont été montrées en fonction du ratio monocytes/hématies, en accord avec les résultats observés par Hadley et Kumpel (Hadley, 1989a).

Une inhibition de la phagocytose induite par les Acm anti-D a également été montrée par addition d'IgG polyvalentes au cours du test. L'inhibition a toutefois été plus difficile à obtenir avec l'Ac AD3, de sous-classe IgG3, qu'avec un anti-D de sous-classe IgG1 confirmant ainsi la difficulté à inhiber les propriétés fonctionnelles des IgG3.

Références	Cellules effectrices	Hématies	Sensibilisation	ratio	A c	Temps d'incubation	Résultats
Zupanska, 1987	Monocytes	O R2R2	100 à 10 ⁵ IgG/Hématies	NC	Sérums IgG1, IgG3 et IgG1 + IgG3	2 h à 37°C	IP : IgG3 > IgG1
Wiener, 1988	Monocytes	O R2r	de 0,1 à 10 µg/ml (pour 10 ⁸ hématies)	4, 20 et 100 hématies / 1 monocyte	Acm IgG1 et IgG3 (Surnageant)	1 h puis 20 h à 37°C	- IAA : IgG3 > IgG1 - IP : IgG1 > IgG3
Hadley, 1989c	Monocytes	OR1R2	8 à 9.10 ³ IgG/hématie	30 hématies / 1 monocyte	Acm IgG1 et IgG3	4 heures à 37°C	- IAA : IgG3 > IgG1 - IP : IgG1 > IgG3
Hadley, 1989c	Monocytes	OR1R2	8 à 9.10 ³ IgG/hématie	10 hématies / 1 monocyte	Acm IgG1 et IgG3	1 heures à 37°C	CL : IgG3 > IgG1
Kumpel, 1990a	Monocytes	O R1R2	de 20.10 ³ à 40.10 ³ IgG/Hématie	NC	Acm IgG1 et IgG3	1 h à 37°C	CL : IgG3 > IgG1

Tableau D.3 : récapitulatif de plusieurs tests de phagocytose réalisés par d'autres laboratoires. Les abréviations de la case résultats correspondent à : CL : résultats en test de chemiluminescence (Hadley, 1989b) ; IAA : index d'association et d'attachement ; IP : index de phagocytose. NC : Non Communiqué.

3.2.2.4. Rôle du complément

Comme cela a été fait avec les anti-D polyclonaux, des essais d'activation du complément par les monoclonaux ont été réalisés. Les résultats obtenus n'ont jamais pu mettre en évidence la capacité pour les Acm anti-D à induire le dépôt de fractions C3_b à la surface des hématies.

Au regard de ces résultats, les Ac monoclonaux utilisés à faible concentration de sensibilisation induisent généralement une meilleure activité biologique que les Ac polyclonaux anti-D. Par ailleurs, ces mêmes Ac monoclonaux ont été classés parmi les meilleurs lors des études fonctionnelles du troisième atelier international sur les Ac monoclonaux. Ce classement pourrait être expliqué par le fait que les 6 Ac monoclonaux utilisés avaient déjà été présélectionnés au laboratoire parmi 12 Ac monoclonaux anti-D de sous-classe IgG.

3.3. Analyse de la relation entre la réactivité, l'activité fonctionnelle et la structure des anti-D

3.3.1. Etude avec les Ac polyclonaux anti-D

Les deux chapitres précédents, concernant la réactivité des Ac sur les globules rouges et leurs activités fonctionnelles, ont été traités séparément. Il semblait toutefois important d'essayer de voir s'il était possible de mettre en évidence une corrélation entre la réactivité des Ac anti-D et leur activité fonctionnelle.

Avec les Ac polyclonaux anti-D, une relation a pu être établie entre les propriétés fonctionnelles de certains Ac et le taux d'anti-D fixés sur les globules rouges. En effet, à des taux d'anti-D fixés sur les globules rouges similaires entre les polyclonaux anti-D, des réponses comparables ont été observés au sein des tests d'ADCC et de phagocytose.

Cette relation possible, notamment entre la réponse ADCC induite par les polyclonaux anti-D et les quantités d'anti-D fixés, n'a pas été confirmée par Armstrong-Fisher *et al.* (Armstrong-Fisher, 1995). En effet, cette équipe avait obtenu des variations d'activité ADCC entre les différents lots de polyclonaux anti-D testés alors que les quantités d'anti-D fixés sur les globules rouges étaient comparables entre les lots. Une explication viendrait en fait d'une

composition différente en IgG1 et en IgG3 entre les lots de polyclonaux anti-D (Armstrong-Fisher, 1995).

Cette différence de la réponse ADCC en fonction de la composition en IgG1 et IgG3 avait déjà été observée par Urbaniak et Greiss (Urbaniak, 1980) entre les sérums provenant de femmes immunisées pendant la grossesse et les sérums provenant de volontaires hommes immunisés. Une forte activité ADCC avait été observée avec les sérums de femmes immunisées pendant la grossesse en relation avec un titre en IgG3 sérique supérieur à celui des IgG1. Par contre, une faible activité ADCC avait été observée avec les sérums d'hommes immunisés présentant un titre en IgG3 sérique inférieur à celui des IgG1.

3.3.2. Etude avec les Ac monoclonaux anti-D

Il a été possible d'établir une corrélation entre les réponses ADCC obtenues avec les différents Ac monoclonaux aux concentrations de sensibilisation de 50 et 100 ng/ml et la quantité d'anti-D fixés qu'elle soit mesurée en Sol-ELISA ou en cytométrie de flux.

Bien que les Ac soient testés à la même concentration, les quantités d'anti-D fixés sur les globules rouges sont variables. Ces variations influencent par conséquent l'activité ADCC induite par les Ac avec, en règle générale, une augmentation de l'activité ADCC en corrélation avec une augmentation de la quantité d'anti-D fixés. Cette observation a, par ailleurs, été confirmée avec l'étude de nombreux Ac anti-D lors du troisième atelier international sur les Ac monoclonaux dans la mesure où les fortes activités ADCC sont observées avec les Ac qui se fixent le mieux sur les hématies tandis que les Ac présentant une faible activité biologique correspondent à des produits qui réagissent faiblement avec les hématies (résultats non présentés).

A une concentration de sensibilisation plus élevée (500 ng/ml), la corrélation entre la quantité d'anti-D fixés sur les globules rouges et l'activité ADCC ne peut plus être établie. Une explication serait qu'à cette concentration, les Fc γ R doivent être tous occupés par des IgG entraînant une saturation de la réponse ADCC. Par contre, d'autres molécules d'anti-D peuvent encore se fixer sur les hématies expliquant ainsi cette différence.

Il a été de plus observé qu'à des taux comparables d'anti-D fixés sur les hématies, deux Ac n'avaient pas obligatoirement la même activité ADCC et réciproquement. Ce résultat montrerait par conséquent l'importance, en premier lieu, de la sous-classe IgG1 ou IgG3 des Ac et montrerait également, que parmi les IgG1 des différences de réponses existent.

Ce dernier point est par ailleurs en désaccord avec les résultats présentés par l'équipe de Hadley *et al.* (Hadley, 1989b) qui avait montré que les Ac monoclonaux de même sous-classe, au sein d'un même test et à des taux de fixation équivalents, induisaient une réponse fonctionnelle comparable.

Une relation analogue à celle qui a pu être établie entre l'activité ADCC et la quantité d'anti-D fixés, a été réalisée à propos des résultats de phagocytose.

De plus, excepté avec l'Ac HM16, il a été possible d'observer une homologie de la réponse fonctionnelle en relation avec des quantités d'anti-D fixés sur les hématies comparables.

Les résultats précédents ont montré l'importance, d'une part, de la quantité des anti-D fixés sur les globules rouges dans l'induction des réponses fonctionnelles et, d'autre part, de la fixation des Ac sur un Fc γ R.

En ce qui concerne la fixation des Ac sur l'antigène, plusieurs points peuvent être précisés. Tout d'abord, il a été montré que pour un Ac monoclonal anti-D, des quantités variables d'anti-D pouvaient se fixer sur des globules rouges de donneurs différents. Ceci s'explique, comme précédemment, par les variations dans les quantités d'antigènes D exprimés à la surface des globules rouges.

De plus, il a été montré que les quantités d'anti-D fixés avec les différents Ac monoclonaux anti-D étaient variables malgré des sensibilisations à des concentrations identiques et malgré l'utilisation d'hématies provenant du même donneur. Ces résultats suggèrent deux remarques. La première est que chaque Ac possède une constante d'affinité différente (Hadley, 1989b). La deuxième est qu'il existe des variations dans l'expression des

épitopes à la surface des hématies parmi les 9 déterminants antigéniques qui composent l'antigène D (Lomas, 1993). Par ailleurs, il a été également montré par Lomas *et al.* (Lomas, 1989) que la plupart des Ac monoclonaux anti-D utilisés réagissaient avec les épitopes D6/7 ce qui suggérerait soit une prédominance des Ac sériques reconnaissant ces épitopes, soit une sélection préférentielle de ces Ac durant la transformation EBV et les étapes de clonage (Lomas, 1989).

La structure des régions variables impliquées dans la spécificité des différents anti-D a également fait l'objet d'une étude avec le séquençage des régions VH et VL des différents Ac. A l'instar de Hughes-Jones *et al.* (Hughes-Jones, 1990), un des objectifs de la détermination des séquences nucléotiques, et par la même de la séquence en acides aminés, était de confirmer la diversité ou la restriction des gènes germinaux utilisés lors d'une réponse à une immunisation à l'antigène D. Peu de séquences sont actuellement disponibles dans la mesure où ce travail est encore au stade préliminaire. Toutefois, une première analyse des parties VH et VL des Ac monoclonaux anti-D a permis de préciser la famille de gènes VHI pour l'Ac P3X83 avec la séquence hv1263, la famille VHIII pour l'Ac AD3 avec la séquence hv3019b9 et la famille VHIV pour l'Ac HM16 avec la séquence VH4-21.

Pour ce qui est des chaînes légères, la chaîne lambda de l'Ac HM16 dériverait de la famille V λ III avec la séquence germinale IGLV3S1 et les chaînes kappa des Ac AD3 et P3X83 de la famille V κ III avec la séquence humkv325.

Plusieurs équipes ont montré qu'en dépit du grand nombre des séquences germinales pour la région variable (V), les séquences utilisées dans une réponse à l'antigène D étaient relativement restreintes (Natvig, 1976 ; Bye, 1992), notamment aux séquences germinales VH4-21 et hv3019b9 pour les gènes VH et IGLV3S1 pour les gènes VL (Bye, 1992). De plus, Bye *et al.* (Bye, 1992) ont montré que l'affinité des Ac augmentait en général avec l'augmentation des hypermutations somatiques observées entre la séquence V des chaînes et celles des gènes germinaux.

Les intérêts du séquençage des parties variables des Ac sont multiples. En effet, il semblait important d'établir une fiche d'identité des Ac. De plus, il serait possible de réaliser, par exemple, une comparaison précise de la spécificité si deux Ac reconnaissent un même

épitope. Enfin, une étude de la stabilité des Ac au cours de différentes productions pourrait être effectuée par vérification d'une absence de mutations qui pourrait entraîner une modification d'affinité pour l'Ag D.

La région constante des Ac est impliquée dans la liaison aux récepteurs Fc des Ig présents à la surface des cellules effectrices. La détermination de la séquence nucléotidique de ces régions peut expliquer certains résultats et devrait permettre de préciser les allotypes des Ac étudiés.

Le séquençage des parties constantes des chaînes lourdes n'a permis de mettre en évidence qu'une seule différence d'acide aminé à la position 215 entre les Ac HM16 et P3X83. D'autre part, il semblerait que les principales séquences impliquées dans la fixation des Ac sur les FcγR soient identiques pour les trois chaînes H des Ac AD3, P3X83 et HM16. D'après certains travaux, deux zones situées dans le CH2 seraient plus particulièrement impliquées dans la fixation aux récepteurs FcγRI : Leu234-Ser239 (L234-S239) (Woof, 1986 ; Duncan, 1988 ; Burton, 1990 ; Chappel, 1991 ; Sarmay, 1992b) et Gly316-Lys338 (G316-K338) (Woof, 1984 ; 1986).

Pour ce qui est de la fixation avec le FcγRIII, la littérature semblerait distinguer deux séquences impliquées, pour l'une, dans la fixation au récepteur et, pour l'autre, dans l'induction de l'ADCC (Gergely, 1992 ; Sarmay, 1992b). Une de ces séquences, située dans le CH2, serait Lys274-Arg301 (K274-R301) et induirait le signal lytique, l'autre séquence serait située dans le CH3, Ser408-Arg416 (S408-R416), et serait impliquée dans la fixation au FcγRIII. Ces deux zones ont été retrouvées avec des séquences identiques pour les trois chaînes d'Ac séquencées.

Le séquençage de la région constante des chaînes H des Ac anti-D a également permis de déterminer l'allotype G1m(1,17) pour les Ac HM16 et P3X83 et l'allotype G3m(5,10,11,13,14) pour l'Ac AD3.

Il serait toutefois hasardeux d'établir une relation entre l'allotype des Ac et leur activité fonctionnelle. Kumpel *et al.* avaient pourtant montré une corrélation entre l'allotype G1m(3)

des Ac et leur forte activité ADCC lymphocyte-dépendante par rapport aux autres IgG1 d'allotype différent (Kumpel, 1988). Ces observations impliqueraient que les épitopes associés à l'allotype G1m(3) soient requis pour une meilleure fixation sur le récepteur FcγRIII. Toutefois, des observations contradictoires ont été faites. D'une part, Kumpel *et al.* avait signalé le cas de certains Ac anti-D d'allotype G1m(3) qui n'induisaient qu'une très faible activité ADCC lymphocyte dépendante (Kumpel, 1988). D'autre part, les Ac HM16 et P3X83, d'allotypes G1m(1,17), ont une activité ADCC lymphocyte dépendante nettement supérieure à celle obtenue avec l'Ac AD1 d'allotype G1m(3) (allotype de cet Ac déterminé sérologiquement).

Toutefois, le fait de préciser la structure primaire d'un Ac ne saurait suffire dans une étude concernant la fixation aux FcγR et l'induction des fonctions effectrices. Un bon exemple étant les résultats obtenus en test d'adhérence indiquant une capacité à former des rosettes supérieure pour l'Ac P3X83 par rapport à l'Ac HM16 même à des concentrations de sensibilisation saturantes.

Les Ac anti-D préparés par les techniques du génie cellulaire ne présentent pas forcément, au sein d'une même molécule, une partie variable avec une bonne spécificité ou une partie constante responsable d'une forte activité biologique. C'est pourquoi une nouvelle approche technologique basée sur les techniques de biologie moléculaire a été développée pour générer de nouveaux anti-D possédant à la fois une partie variable (VH et VL-CL) et une partie constante (CH1-région charnière-CH2-CH3) sélectionnées. Cette étude, en cours de développement au laboratoire, a montré que le fait de changer la partie variable de l'Ac AD3 par celle de l'Ac HM16 entraînait une activité ADCC supérieure de l'Ac recombinant ainsi obtenu par rapport à celle de l'Ac AD3 d'origine. Par contre, une greffe de la partie variable de l'Ac AD3 à la partie constante de l'Ac HM16 induit une diminution des activités d'ADCC et de phagocytose. Ces manipulations préliminaires appliquées à d'autres anti-D devraient permettre de préparer de nouveaux anti-D présentant des propriétés fonctionnelles mieux adaptées aux objectifs fixés.

3.4. Etude de différentes combinaisons de deux Acm

Tous les résultats discutés jusqu'à présent ont été obtenus avec les anti-D monoclonaux testés séparément. Mais compte tenu des deux observations suivantes, il semblait intéressant de tester l'effet de mélanges de plusieurs anti-D. En effet, la sévérité d'une maladie hémolytique pourrait, dans certains cas, être liée à la présence simultanée d'IgG1 et d'IgG3 dans le plasma maternel (Zupanska, 1989 ; Pollock, 1990 ; Garner, 1992 ; Iyer, 1992). D'autre part, les Ig polyclonales spécifiques anti-D utilisées pour la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle sont constituées d'un mélange d'IgG anti-D et notamment d'IgG1 et d'IgG3.

Les objectifs de cette étude sont multiples. Tout d'abord, comme les Ac monoclonaux sont spécifiques d'un épitope, une mauvaise, voire une absence de reconnaissance de certaines catégories d'hématies par les anti-D est possible. Par conséquent, un mélange de deux Ac permettrait une meilleure gamme de reconnaissance vis à vis de l'antigène D. L'Ac P3X83 avait été précédemment cité comme intéressant en raison de sa réactivité sur la catégorie d'hématies DVI, catégorie qui n'est pratiquement jamais mise en évidence avec les Ac monoclonaux anti-D (Lomas, 1989). Ensuite, un mélange d'Ac permettrait de combiner des activités différentes spécifiques à chaque Ac comme par exemple l'induction de la lyse extra-cellulaire et de la phagocytose, voire même d'envisager une synergie d'action.

Les combinaisons possibles de mélanges avec les six Ac monoclonaux anti-D du laboratoire étant multiples, les associations ont été limitées à des mélanges de deux Ac monoclonaux car il semble difficile de dépasser ce nombre d'Ac pour des problèmes de validation du mélange en vue d'un usage thérapeutique.

Une étude en ADCC a été réalisée avec différents mélanges de deux Acm. La concentration finale était de 100 ng/ml avec une proportion de 50/50 pour les deux Ac. Les résultats obtenus en test d'ADCC avec des cellules mononucléées comme cellules effectrices n'a pas mis en évidence d'effet synergique quelle que soit la composition du mélange. En effet, aucune réponse ADCC, induite par les mélanges, n'a été supérieure aux Acm testés isolément à 100 ng/ml. Tout au plus une augmentation de l'activité ADCC a été observée avec les mélanges en comparaison avec les Acm testés isolément à 50 ng/ml, liée à une augmentation de la quantité d'Ac fixés sur les hématies. Pour s'assurer d'être dans les bonnes proportions en IgG1 et en

IgG3 pour le test ADCC, des mélanges ont été constitués avec des concentrations variables d'IgG1 et d'IgG3. Une inhibition de l'activité ADCC a été observée proportionnellement à l'augmentation de la concentration de l'IgG3. Un test ADCC a également été réalisé avec des monocytes activés comme cellules effectrices et les résultats obtenus n'ont pas mis en évidence de synergie d'action pour les différents mélanges.

En test phagocytose, par contre, un effet synergique a été mis en évidence lorsque les mélanges sont composés de l'Ac AD3 et d'une IgG1. Par contre, aucun effet de ce type n'a été observé avec les mélanges de 2 IgG1. Cette synergie de la réponse phagocytose n'est pas liée à une augmentation de la fixation des anti-D sur les hématies. L'IgG1 HM16 en mélange avec l'IgG3 AD3 a toujours donné une synergie en phagocytose pour des proportions en IgG3 voisines de 60%.

La synergie observée en phagocytose lorsque les mélanges sont composés d'une IgG3 et d'une IgG1 résulterait de différences dans les propriétés fonctionnelles de ces sous-classes. En effet, il a été précédemment discuté que les IgG3 induisaient une fixation plus efficace des hématies sensibilisées avec les récepteurs des cellules effectrices. Une conséquence de cette fixation est qu'il y aurait une induction de la phagocytose par les IgG1 plus efficace que lorsque ces dernières sont fixées seules sur les hématies.

En ce qui concerne la possibilité d'obtention d'un effet synergique en utilisant des mélanges d'Ac, Hadley et Kumpel (Hadley, 1989c) ont mis en évidence un effet synergique en test de chemiluminescence lorsque les hématies sont sensibilisées par une IgG1 et une IgG3 à des proportions de 50/50. De même, cette équipe n'avait pu corréliser l'effet synergique en test de chemiluminescence avec une augmentation de la quantité d'anti-D fixés confirmant les résultats obtenus au laboratoire. Par ailleurs, cette équipe n'avait pas mis en évidence de synergie en test de phagocytose, résultat en discordance avec l'effet obtenu en test de chemiluminescence dans la mesure où la réponse dans ce dernier test n'est qu'en fait une lecture de la réponse métabolique associée à l'érythrophagocytose (Hadley, 1989c). Aucune synergie n'a jusqu'à présent été décrite dans les tests d'adhérence, d'ADCC et de phagocytose (Armstrong, 1987 ; Hadley, 1989c).

Ces résultats *in vitro* semblent être en accord avec l'étude d'élimination *in vivo* des hématies après injection des Ac AD1 et AD3 chez le chimpanzé (Blancher, 1993) dans la mesure où aucun effet synergique n'avait été observé et que l'efficacité de l'Ac AD1 à éliminer les hématies était supérieure à celle de l'Ac AD3.

4. Analyse des résultats dans le contexte de la prévention de l'allo-immunisation foeto-maternelle

Toutes les analyses précédentes ont été réalisées dans le contexte d'une utilisation des Ac monoclonaux anti-D pour la prévention de la MHNN. Pour cela, des critères de sélection des Acm doivent maintenant être définis.

Tout d'abord, la fixation des anti-D sur la membrane des globules rouges semble être le premier phénomène à intervenir après l'injection des anti-D. La quantification des anti-D fixés sur les hématies est donc un critère important qui nécessairement interviendra dans la sélection des Ac monoclonaux anti-D. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que plus un Ac est fixé, plus il induit une activité d'élimination des globules rouges par les cellules effectrices. Cette observation a également été faite lors d'études réalisées *in vivo* par les équipes suivantes : Mollison et Hughes-Jones, 1967 ; Thomson et *al*, 1990 ; Kumpel et Judson, 1995b.

La spécificité antigénique anti-D doit être absolue. En effet, l'efficacité du traitement préventif par injection d'anti-D dépend de la disponibilité de l'anticorps à se fixer sur les sites antigéniques des hématies foetales présentes dans la circulation maternelle. La réactivité croisée de certains Ac monoclonaux anti-D mise en évidence par plusieurs auteurs (Thorpe, 1989 ; Blancher, 1991) pourrait entraîner une diminution de cette disponibilité et donc de l'efficacité.

Ensuite, des observations cliniques ont montré que les concentrations en anti-D retrouvées dans le sérum maternel après injection des Ig polyclonales anti-D et d'Ac monoclonaux anti-D étaient très faibles, de l'ordre de quelques dizaines de nanogrammes par millilitre. Par conséquent, l'utilisation de faibles concentrations de sensibilisation est préférable aux fortes concentrations pour la réalisation des différents tests. La concentration de

sensibilisation de 100 ng/ml est donc conseillée pour la sensibilisation des hématies et la sélection des meilleurs Ac.

Par ailleurs, une relation entre la sévérité de la MHNN et la présence d'un allotype particulier avait été décrite par Alie-Daran *et al.* (Alie-Daran, 1992). Cette équipe avait montré que l'allotype G1m(3) était le plus souvent associé à une MHNN sévère. Une observation analogue a été faite par l'équipe de Kumpel *et al.* (Kumpel, 1988) en ce qui concerne la différence de lyse extra-cellulaire lymphocyte-dépendante en fonction de l'allotype des Ac. Toutefois, une étude récente, sur 160 individus (hommes ou femmes) immunisés contre l'antigène Rh(D), n'a pas permis d'identifier d'allotype particulier par rapport à la fréquence normale d'une population témoin (Young, 1995). De plus, les résultats obtenus avec les Ac P3X83, HM16 et AD1 dans les tests d'ADCC n'ont pas permis de confirmer les observations de Kumpel *et al.* (Kumpel, 1988). Il semblerait donc que le choix d'un allotype particulier ne soit pas essentiel à la sélection des Ac en vue d'une utilisation dans la prévention de la MHNN, du moins avec les tests *in vitro* choisis.

Il semblerait que les hématies sensibilisées avec des antiD soient éliminées au cours de la prévention de la MHNN par les macrophages de la rate (voir introduction 4.1.). Ces cellules expriment les trois types de Fc γ R : Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII (van de Winkel, 1993). Le principal récepteur impliqué dans l'élimination de ces hématies serait le Fc γ RI. Seulement, les récepteurs Fc γ RI sont de forte affinité et sont, *in vivo*, saturés par des IgG circulantes (Klaassen, 1990 ; Kumpel, 1990a ; Engelfriet, 1992).

La question se pose donc de savoir comment des récepteurs saturés dans leur capacité à fixer des Ac peuvent intervenir dans l'élimination des hématies sensibilisées. Existerait-il des conditions particulières dans la rate pouvant prévenir cette inhibition de l'adhérence (Meulen, 1978) ? En effet, en entrant dans la pulpe rouge de la rate, les hématies sont séparées du plasma, augmentant ainsi l'hématocrite à 70-80%. L'inhibition de l'adhérence par les IgG libres pourrait, par conséquent, être modulée soit par une augmentation de la concentration des hématies sensibilisées soit par une diminution de la concentration des IgG libres.

D'autre part, les macrophages spléniques seraient-ils plus actifs dans leur capacité à fixer et à détruire les hématies sensibilisées par rapport aux monocytes périphériques (Meulen, 1978) ? Sur ce point, les résultats obtenus par Zupanska *et al.* (Zupanska, 1995) ont montré qu'en test de MMA (Monocyte Monolayer Assay), les hématies sensibilisées interagissaient de la même façon avec une population enrichie en macrophages spléniques qu'avec des monocytes périphériques. Il convient, toutefois, d'interpréter ces résultats avec prudence dans la mesure où quatre sous-populations de macrophages spléniques peuvent être distinguées (Buiting, 1996).

D'autres cellules effectrices seraient susceptibles, potentiellement, d'intervenir dans l'élimination des hématies sensibilisées comme par exemple les neutrophiles qui expriment le CD16 et le CD64 ? Ce dernier récepteur serait par ailleurs extrêmement efficace pour les réactions d'ADCC lorsque les neutrophiles sont activés (Michon, 1995).

Plusieurs observations ont mis en évidence une implication possible du récepteur Fc γ RIII (CD16), dans le mécanisme d'action des anti-D (Blancher, 1993 ; Armstrong-Fisher, 1995 ; Kumpel, 1995a). En effet, des études d'élimination d'hématies sensibilisées chez le chimpanzé ont montré l'implication du Fc γ RIII dans la mesure où une administration d'un anti-Fc γ RIII réduisait considérablement l'élimination de ces hématies (Clarkson, 1986a). Il a d'ailleurs été récemment suggéré que ces Fc γ RIII, présents sur les macrophages, seraient les premiers récepteurs sur lesquels se fixeraient les hématies sensibilisées par les anti-D puisque les Fc γ RI sont saturés par des IgG. Cette fixation permettrait d'établir une compétition vis à vis de la fixation sur le Fc γ RI provoquant ainsi une activation des mécanismes effecteurs en liaison avec ce récepteur (Engelfriet, 1992 ; Kumpel, 1995a). Le Fc γ RIII étant également présent sur les cellules NK et K, (voir tableau D.2 Discussion 3.2.2.) une analyse des résultats obtenus en ADCC a été réalisée en fonction des pourcentages des lymphocytes dans les préparations de cellules effectrices mais les résultats sont préliminaires. Il conviendrait donc de compléter ces données par de nouveaux tests ADCC-lymphocyte dépendant mais aussi par des études d'interactions entre les hématies sensibilisées avec les anti-D et des cellules transfectées par les gènes codant pour le Fc γ RIII. Une telle lignée cellulaire est actuellement en cours d'étude (ce travail fait partie d'une collaboration récente avec le Dr. J.-L. Teillaud). D'autre part, il a été

observé qu'*in vivo* les hématies sensibilisées sont principalement retenues au niveau de la rate alors que le Fc γ RIII est autant exprimé sur les cellules de Kupfer du foie que sur les macrophages spléniques (Clarkson, 1986b). Les hématies sensibilisées devraient donc être également séquestrées dans le foie.

La grande difficulté à remplacer les Ac polyclonaux anti-D par un Ac monoclonal anti-D est que ce dernier doit posséder les caractéristiques d'une préparation d'Ig polyclonales anti-D spécifiques. En effet, comme les Ac polyclonaux anti-D sont composés d'un mélange d'Ac, toutes les caractéristiques peuvent être rassemblées en ce qui concerne notamment les reconnaissances épitopiques, les différentes sous-classes d'Ac, les différences de fonctionnalité, la glycosylation des Ac, etc.

Il a donc été envisagé de mélanger des Ac monoclonaux afin d'essayer d'obtenir une synergie d'action par rapport aux Ac utilisés isolément. Notamment, une synergie d'action a été observée pour le phénomène de la phagocytose lorsque l'Ac AD3, de sous-classe IgG3, est mélangé avec une IgG1 comme par exemple l'Ac HM16.

A l'issue de ce travail, il apparaît que les deux IgG1 HM16 et P3X83 présentent des caractéristiques telles qu'ils pourraient constituer deux produits intéressants pour la prévention de la MHNN. De plus, l'activité de phagocytose de l'Ac HM16 a pu être renforcée par l'addition d'une IgG3. D'autres travaux sont actuellement en cours pour d'une part confirmer ces résultats et d'autre part définir un mélange de 2 anti-D qui puisse être évalué au cours d'études cliniques.

La suppression de l'allo-immunisation à l'antigène D par des IgG anti-D implique certainement des mécanismes plus complexes que ceux présentés dans cette étude. Par exemple, il semblerait que l'élimination des hématies foetales qui se trouvent dans la circulation maternelle se fasse dans les premières heures après l'injection des anti-D (Thomson, 1990 ; Blancher, 1993). Un temps d'incubation court des hématies sensibilisées et des cellules effectrices sera certainement un autre critère de sélection des Ac monoclonaux anti-D pour une

utilisation dans la prévention de la MHNN. L'incubation du test de phagocytose est relativement courte (90 minutes), par contre, l'incubation du test d'ADCC, actuellement utilisé, est de 20 heures environ. Il serait donc intéressant d'essayer de réduire ce temps d'incubation afin de pouvoir détecter les Ac qui induisent une activité de lyse extra-cellulaire rapide et aussi pour ne pas saturer la réponse permettant la mesure de cette lyse.

En conclusion de ce travail, il est possible de dire qu'il reste difficile de définir des critères fiables de sélection d'anticorps monoclonaux sur la base des tests réalisés *in vitro*. En effet, seuls les essais cliniques de pharmacodynamie chez l'homme permettront de confirmer si les anticorps sélectionnés à l'aide des techniques décrites dans ce travail sont efficaces à induire la clairance d'hématies Rh(D) positif.

Compte tenu des difficultés actuellement rencontrées pour la réalisation d'études cliniques chez l'homme, il serait intéressant de développer des modèles animaux qui pourraient apporter des renseignements complémentaires quant à l'activité biologique des anti-D sélectionnés. Ces modèles animaux seraient considérés comme une étape intermédiaire entre l'évaluation *in vitro* des Acm et les essais cliniques.

Une étude comparative des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* permettrait de confirmer si les tests fonctionnels réalisés *in vitro* sont efficaces pour sélectionner des produits utilisables en thérapeutique. Si des discordances persistent entre l'évaluation biologique des Ac et les résultats cliniques, une révision des tests fonctionnels sera alors nécessaire. De plus, un tel travail devrait permettre de mieux connaître le mécanisme d'action des anti-D et de comprendre pourquoi deux IgG1 peuvent présenter des activités fonctionnelles si différentes. Afin de compléter ces études *in vitro*, une analyse structurale de la partie glycanique des Ig devra être également développée. En effet, des travaux récents ont confirmé les rôles des glycanes dans l'activité biologique des glycoprotéines (Montreuil, 1993a ; 1993b ; Verbert, 1993). La structure des carbohydrates greffés sur le squelette protéique peut être modifiée par le protocole de production : type de fermenteur, composition du milieu de culture par exemple. Il faudra donc tenir compte de ces remarques pour la fabrication de lots industriels d'Ac monoclonaux anti-D en vue d'applications thérapeutiques.

PUBLICATION
et
POSTERS

Le travail présenté ici a donné lieu à la publication et aux posters suivants :

Publication

Ducrot, T., Beliard, R., Glacet, A., Klein, P., Harbonnier, S., Benmostefa, N., Bourel, D. :
Use of the DAF Assay to Assess the Functional Properties of Polyclonal and Monoclonal Anti-Rh D Antibodies. (1996) *Vox Sang.*, **71**, 30-36

Posters

Ducrot, T., Klein, P., Beliard, R., Huart, J.J., Bourel, D. : **Activité biologique *in vitro* d'IgG anti-D. Evaluation de l'ADCC et de la phagocytose avec un test colorimétrique au 2,7-diaminofluorène.** Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine à Angers 8-10 juin 1994

Ducrot, T., Klein, P., Glacet, A., Beliard, R., Bourel, D. : **Use of the DAF Assay to Assess the Functional Properties of Polyclonal and Monoclonal Anti-Rh D Antibodies.** Third International Workshop and symposium on monoclonal antibodies against human red blood cell and related antigens - Nantes 25-27 septembre 1996

Béliard, R., Ducrot, T., Glacet, A., Klein, P., Bourel, D. : **Quantitative determination of anti-D antibodies and binding studies by Sol-ELISA.** Third International Workshop and symposium on monoclonal antibodies against human red blood cell and related antigens - Nantes 25-27 septembre 1996

Klein, P., Ducrot, T., Moitel, S., Huart, J.J., Bourel, D. : **Préparation d'Ac monoclonaux humains recombinants à usage thérapeutique.**

--> Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine - Angers 8-10 juin 1994

--> Congrès de la Société Française d'Immunologie - Montpellier 15-16 décembre 1994

Klein, P., Ducrot, T., Beliard, R., Glacet, A., Moitel, S., Huart, J.J., Bourel, D. : **Human recombinant anti-Rhesus D antibodies : characterization and effector functions analysis.** Fourth International Conference on human antibodies and hybridomas - Amsterdam 26-28 avril 1995

Klein, P., Beliard, R., Glacet, A., Ducrot, T. Bourel, D. : **Human recombinant anti-Rhesus D antibodies : modification of biological properties by *in vitro* class-switch.** Third International Workshop and symposium on monoclonal antibodies against human red blood cell and related antigens - Nantes 25-27 septembre 1996

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramson, N., Schur, P.H. : The IgG subclasses of red cell antibodies and relationship to monocyte binding. (1972) *Blood* 40, 500-508
- Agre, P., Cartron, J.-P. : Molecular biology of the Rh antigens. (1991) *Blood* 78, 551-563
- Alexandre, D., Chuchana, P., Brockly, F., Blancher, A., Lefranc, G., Lefranc, M.P. : First genomic sequence of a human Ig variable lambda gene belonging to subgroup I. Functional genes, pseudogenes and vestigial sequences are interspersed in the IGLV locus. (1989) *Nucleic Acids Research* 17, 3975
- Alie-Daran, S.J., Dugoujon, J.M., Fournie, A. : Gm typing, IgG subclasses of anti-Rh(D) and severity of hemolytic disease of the newborn. (1992) *Vox Sang.* 62, 127-128
- Anderson, M.L., Szajnert, M.F., Kaplan, J.C., McColl, L., Young, B.D. : The isolation of a human Ig V lambda gene from a recombinant library of chromosome 22 and estimation of its copy number. (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 6647-6661
- Anderson, C.L., Looney, R.J. : Human leukocyte IgG Fc receptors. (1986) *Immunol. Today* 7, 264
- Armstrong, S.S., Wiener, E., Garner, S.F., Urbaniak, S.J., Contreras, M. : Heterogeneity of IgG1 monoclonal anti-Rh(D): an investigation using ADCC and macrophage binding assays. (1987) *Br. J. Haemat.* 66, 257-262
- Armstrong-Fisher, S.S., Sweeney, G.M., Greiss, M.A., Urbaniak, S.J. : Functional assessment of therapeutic anti-D immunoglobulin using Fc-mediated assays. (1995) *Transfusion Medicine* 5, 21-29
- Austin, E.B., McIntosh, Y., Hodson, C., Lee, D. : Anti-D quantification by flow cytometry: an alternative to the autoanalyser? (1995) *Transfusion Medicine* 5, 203-208
- Bach, J.F. : Immunologie. (1990) Ed. Flammarion Médecine-Sciences 3ème édition-2ème tirage
- Bentley, D.L., Rabbitts, T.H. : Human immunoglobulin variable region genes-DNA sequences of two Vk genes and a pseudogene. (1980) *Nature* 288, 730-733
- Bentley, D.L., Rabbitts, T.H. : Evolution of Ig V genes: evidence indicating that recently duplicated human Vk sequences have diverged by gene conversion. (1983) *Cell* 32, 181-189
- Berman, J.E., Mellis, S.J., Pollock, R., Smith, C.L., Suh, H., Heinke, B., Kowal, C., Surti, U., Chess, L., Cantor, C.R., Alt, F.W. : Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus. (1988) *EMBO J.* 7, 727-738
- Bernard, F.P., Chuchana, P., Fripiat, J.P., Buluwela, L., Lefranc, M.P. : Genomic sequence of IGLV1S2, a human Ig variable lambda gene belonging to subgroup I. (1990) *Nucleic Acids Research* 18, 7139
- Blancher, A., Roubinet, F., Oksman, T., Broly, H., Chevaleyre, J., Vezon, G., Ducos, J. : Polyreactivity of human monoclonal antibodies: human anti-Rh monoclonal antibodies of IgM isotype are frequently polyreactive. (1991) *Vox Sang.* 61, 196-204

- Blancher, A., Socha, W.W., Ruffié, J. : Diversity of human anti-D monoclonal antibodies revealed by reactions with chimpanzee red blood cells. (1992) *63*, 112-118
- Blancher, A., Socha, W.W., Roubinet, F., Rowe, A.W., Broly, H., Byrne, P., Holuigue, M., Bouzidi, A., Huart, J.J., Ruffié, J. : Human monoclonal anti-D-induced clearance of human D-positive red cells in a chimpanzee model. (1993) *Vox Sang* *65*, 47-54
- Bloy, C., Blanchard, D., Dahr, W., Beyreuther, K., Salmon, C., Cartron, J.-P. : Determination of the N-terminal sequence of human red cell Rh(D) polypeptide and demonstration that the Rh(D), (c), and (E) antigens are carried by distinct polypeptide chains. (1988a) *Blood* *72*, 661-666
- Bloy, C., Blanchard, D., Lambin, P., Goosens, D., Rouger, P., Salmon, C., Masouredis, S.P., Cartron, J.-P. : Characterization of the D, c, E and G antigens of the Rh blood group system with human monoclonal antibodies. (1988b) *Mol. Immunol.* *25*, 925-930
- Boltz-Nitulescu, G., Willheim, M., Spittler, A., Leutmezer, F., Tempfer, C., Winkler, S. : Modulation of IgA, IgE and IgG Fc receptors expression on human mononuclear phagocytes by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and cytokines. (1995) *J. Leukocyte Biology* *58*, 256-262
- vonDem Borne, A.E.G.Kr., Beckers, D., Engelfriet, C.P. : Mechanisms of red cell destruction mediated by non-complement binding IgG antibodies: the essential role *in vivo* of the Fc part of IgG (1977) *Br. J. Haemat.* *36*, 485-493
- Boughton, B.J., Chakraverty, R., Baglin, T.P., Simpson, A., Galvin, G., Rose, P., Rohlova, B. : The treatment of chronic idiopathic thrombocytopenia with anti-D (Rho) immunoglobulin: its effectiveness, safety and mechanism of action. (1988) *Clin. Lab. Haemat.* *10*, 275-284
- Bowman, J.M. : Suppression of Rh iso immunization. (1978) *Obstet. Gynecol.* *52*, 385-389.
- Bowman, J.M. : The prevention of Rh immunization. (1988) *Transfus. Med. Rev.* *2*, 129-150
- Branch, D.R., Gallagher, M.T., Mison, A.P., SySiok, A.L., Petz, L.D. : *In vitro* determination of red cell alloantibody significance using an assay of monocyte-macrophage interaction with sensitized erythrocytes. (1984) *Br. J. Haemat.* *56*, 19-29
- Brevet : Brevet 92 07 893 du 26 juin 1992 : Ac monoclonaux humains anti- RhD et lignées cellulaires les produisant, déposé par l'association pour l'essor de la transfusion sanguine dans la région du Nord
- Brockly, F., Alexandre, D., Chuchana, P., Huck, S., Lefranc, G., Lefranc, M.P. : First nucleotide sequence of a human Ig variable lambda gene belonging to subgroup II. (1989) *Nucleic Acids Reserch* *17*, 3976
- Bron, D., Feinberg, M.B., Teng, N.N.H., Kaplan, H.S. : Production of human monoclonal IgG antibodies against rhesus(D) antigen. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *81*, 3214-3217

- Brossard, Y., Chavinié, J. : Baisse du taux de fécondité et doutes sur l'innocuité des Ig Rh doivent-ils faire réviser notre stratégie de prévention Rh ? (1995) *Gynécologie Internationale* 4, 127-131
- Buiting, A.M.J., de Rover, Z., Kraal, G., van Rooijen, N. : Humoral immune responses against particulate bacterial antigens are dependent on marginal metallophilic macrophages in the spleen. (1996) *Scand. J. Immunol.* 43, 398-405
- Burton, D.R. : IgG: functional sites. (1985) *Molec. Immunol.* 22, 161-206
- Burton, D.R., Gregory, L., Jefferis, R. : Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. (1986) *Monogr. Allergy*, vol. 19, pp. 7-35 - Karger, Basel
- Burton, D.R. : Antibody: the flexible adaptor molecule. (1990) *TIBS* 15, 64-69
- Bussel, J.B., Graziano, J.N., Kimberly, R.P., Pahwa, S., Aledort, L.M. : Intravenous anti-D treatment of immune thrombocytopenic purpura: analysis of efficacy, toxicity and mechanism of effect. (1991) *Blood* 77, 1884-1893
- Bye, J.M., Carter, C., Cui, Y., Gorick, B.D., Songsivilai, S., Winter, G., Hughes-Jones, N., Marks, J.D. : Germline variable region gene segment derivation of human monoclonal anti-Rh(D) antibodies. (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 2481-2490
- Callaghan, T.A., Fleetwood, P., Contreras, M., Mollison, P.L., Scherrmann, J.M. : Human monoclonal anti-D with a normal half-life. (1993) *Transfusion* 33, 784-785
- Cannon, G.J., Swanson, J.A. : the macrophage capacity for phagocytosis. (1992) *J. Cell Science* 101, 907-913
- Cartron, J.P., Agre, P. : Rh blood group antigens : protein and gene structure. (1993) *Seminars in hematology* 30, 193-208
- Chappel, M.S., Isenman, D.E., Everett, M., Xu, Y.Y., Dorrington, K.J., Klein, M.H. : Identification of the FcγR class I binding site in human IgG through the use of recombinant IgG1/IgG2 hybrid and point-mutated antibodies. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9036-9040
- Chen, P.P., Albrandt, K., Orida, N.K., Radoux, V., Chen, E.Y., Schrantz, R., Liu, F.-T., Carson, D.A. : Genetic basis for the cross-reactive idiotypes on the light chains of human IgM anti-IgG autoantibodies. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8318-8322
- Chen, P.P., Albrandt, K., Kipps, T.J., Radoux, V., Liu, F.T., Carson, D.A. : Isolation and characterization of human VκIII germ-line genes. (1987a) *J. Immunol.* 139, 1727-1733
- Chen, P.P., Robbins, D.L., Jirik, F.R., Kipps, T.J., Carson, D.A. : Isolation and characterization of a light chain variable region gene for human rheumatoid factors. (1987b) *J. Exp. Med.* 166, 1900-1905
- Clarkson, S.B., Kimberly, R.P., Valinsky, J.E., Witmer, M.D., Bussel, J.B., Nachman, R.L., Unkeless, J.C. : Blockade of clearance of immune complexes by an anti-Fcγ receptors monoclonal antibody. (1986a) *J. Exp. Med.* 164, 474-489

- Clarkson, S.B., Bussel, J.B., Kimberly, R.P., Valinsky, J.E., Nachman, R.L., Unkeless, J.C. : Treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura with an anti-Fc γ -receptor antibody. (1986b) *N. Engl. J. Med.* 314, 1236-1239
- Combourieu, P. : La prévention de l'iso-immunisation anti-Rh un geste de routine potentiellement dangereux. (1995) *Gynécologie Internationale* 4, 123-124
- Combriato, G., Klobeck, H.G. : V lambda and J lambda-C lambda gene segments of the human Ig lambda light chain locus are separated by 14 kb and rearrange by a deletion mechanism. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 1513-1522
- Contreras, M., de Silva, M. : The prevention and management of haemolytic disease of the newborn. (1994) *Journal of the Royal Society of Medicine* 87, 256-258
- Contreras, M., Garner, S.F. : Laboratory procedures for the prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. (1995) *Vox Sang.* 69, 63
- Crome, P., Mollison, P.L. : Splenic destruction of Rh sensitized, and of heated red cells. (1964) *Br. J. Haemat.* 10, 137-154
- Daëron, M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Pina, P., Pasmans, S., Fridman, W.H. : The same tyrosine-based inhibition motif, in the intra-cytoplasmic domain of Fc γ RIIB, regulated negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. (1995) *Immunity* 3, 635-646
- Davis, L.G., Dibner, M.D., Battey, J.F. : Basic methods in molecular biology. (1986) Elsevier Science Publishing Co., Inc. New-York
- Dooren, M.C., Kuijpers, R.W.A., Joekes, E.C., Huiskes, E., Goldschmeding, R., Overbeeke, M.A.M., von dem Borne, A.E.Kr., Engelfriet, C.P., Ouweland, W.H. : protection against immune haemolytic disease of newborn infants by maternal monocyte-reactive IgG alloantibodies (anti-HLA-DR). (1992) *Lancet* 339, 1067-1070
- Dooren, M.C., van Kamp, I.L., Kanhai, H.H.H., Gravenhorst, J.B., von dem Borne, A.E.Kr., Engelfriet, C.P. : Evidence for the protective effect of maternal FcR-Blocking IgG alloantibodies HLA-DR in Rh D-haemolytic disease of the newborn. (1993a) *Vox Sang.* 65, 55-58
- Dooren, M.C., Engelfriet, C.P. : Protection against Rh D-haemolytic disease of the newborn by a diminished transport of maternal IgG to the fetus. (1993b) 65, 59-61
- Dower, W.J., Miller, J., Ragsdale, C.W. : High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. (1988) *Nucleic Acids Research* 16, 6127-6145
- Ducrot, T., Beliard, R., Glacet, A., Klein, P., Harbonnier, S., Benmostefa, N., Bourel, D. : Use of the DAF assay to assess the functional properties of polyclonal and monoclonal anti-Rh D antibodies. in press
- Duncan, A.R., Woof, J.M., Partridge, L.J., Burton, D.R., Winter, G. : Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptors on IgG. (1988) *Nature* 332, 563-564

- Economides, D.L., Bowel, P.J., Selinger, M., Pratt, G.A., Ferguson, J., MacKenzie, I.Z. : Anti-D concentrations in fetal and maternal serum and amniotic fluid in rhesus allo-immunised pregnancies. (1993) *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 100, 923-926
- Ehlenberger, A.G., Nussenzweig, V. : The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. (1977) *J. Exp. Med.* 145, 357-371
- Ekdahl, K.N., Löf, L., Nilsson, U.R., Nilsson, B. : Development of an immunoassay for the detection of minute amounts of IgG-coated erythrocytes in whole blood and its application for the assessment of Fc-mediated clearance of anti-D-coated erythrocytes *in vivo*. (1989) *Vox Sang.* 57, 188-192
- Engelfriet, C.P. : The immune destruction of red cells. (1992) *Transfusion Medicine* 2, 1-6
- Engelfriet, C.P. Reesink, H.W. : Laboratory procedures for the prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. (1995) *Vox Sang.* 69, 61-69
- Esposito, V.M., Paul, E.B., Seligmann, E.B. : *In vitro* potency results from a collaborative study of Rh(D) immune globulin reference preparation. (1971) *Vox Sang* 21, 193-199
- Fanger, M.W., Shen, L., Graziano, R.F., Guyre, P.M. : Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. (1989) *Immunol. Today* 10, 92-99
- Fleer, A., Meulen, F.W. van der, Linthout, E., Borne, A.E.G.Kr. von dem, Engelfriet, C.P. : Destruction of IgG-sensitized erythrocytes by human blood monocytes: modulation of inhibition by IgG. (1978) *Br. J. Haemat.* 39, 425-436
- Foster, P.R., McIntosh, R.V., Welch, A.G. : Hepatitis C infection from anti-D immunoglobulin. (1995) *The Lancet* 346, 372
- Fridman, W.H., Bonnerot, C., Daeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J.-L., Sautes, C. : Structural bases of Fc γ receptor functions. (1992) *Immunological Reviews* 125, 49-76
- Frippiat, J.-P., Chuchana, P., Bernard, F., Buluwela, L., Lefranc, G., Lefranc, M.-P. : First genomic sequence of a human Ig variable lambda gene belonging to subgroup III. (1990) *Nucleic Acids Research* 18, 7134
- Gahmberg, C.G. : Molecular identification of the human Rho(D) antigen. (1982) *FEBS Letters* 140, 93-97
- Gahmberg, C.G. : Molecular characterization of the human red cell Rho(D) antigen. (1983) *EMBO J.* 2, 223-227
- Gahmberg, C.G., Karhi, K.K. : Association of Rho(D) polypeptides with the membrane skeleton in Rho(D)-positive human red cells. (1984) *J. Immunol.* 133, 334-337
- Garner, S.F., Wiener, E., Contreras, M., Nicolini, U., Kochenour, N., Letsky, E., Rodeck, C.H. : Mononuclear phagocyte assays, autoanalyser quantitation and IgG subclasses of maternal anti-rhD in the prediction of the severity of haemolytic disease in the fetus before 32 weeks gestation. (1992) *British J. Haematology* 80, 97-101

- Garner, S.F., Gorick, B.D., Lai, W.Y.Y., Brown, D., Taverner, D., Hughes-Jones, N.C., Contreras, M., Lubenko, A. : Prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. (1995) *Vox Sang.* 68, 169-176
- Gebran, S.J., Romano, E.L., Pons, H.A., Soyano, A.N. : a modified colorimetric method for the measurement of phagocytosis and antibody-dependent cell cytotoxicity using 2,7-diaminofluorene. (1992) *J. Immunol. Meth.* 151, 255-260
- Gergely, J., Sarmay, G., Rajnavölgyi, E. : regulation of antibody production mediated by Fcγ receptors, IgG binding factors, and IgG Fc-binding autoantibodies. (1992) *Criticals Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 27, 191-225
- Gibson, T. : The production of high titre Rh(D) antibody in male volunteers. (1973) *Vox Sang.* 24, 425-431.
- Goochee, C.F. : Bioprocess factors affecting glycoprotein oligosaccharide structure. (1992) *Develop. Biol. Standard* 76, 95-104
- Goodrick, J., Kumpel, B., Pamphilon, D., Fraser, I., Chapman, G., Dawes, B. : Plasma half-lives and bioavailability of human monoclonal Rh D antibodies BRAD-3 and BRAD-5 following intramuscular injection into Rh D-negative volunteers. (1994) *Clin. Exp. Immunol.* 98, 17-20
- Goossens, D., Champonier, F., Rouger, P., Salmon, C. : Human monoclonal antibodies against blood group antigens. Preparation of a series of stable EBV immortalized B clones producing high levels of antibody of different isotypes and specificities. (1987) *J. Immunol. Methods* 1, 193-200
- Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C. : relative functional binding activity of IgG1 and IgG3 anti-D in IgG preparations. (1991) *Vox Sang* 61, 251-254
- Goudemand, M., Salmon, C. : Immuno-hématologie et immunogénétique. (1980) Ed. Flammarion
- Greenspan, N.S., Cooper, J.N. : Intermolecular cooperativity: a clue to why mice have IgG3? (1992) *Immunol. Today* 13, 164-168
- Grozdea, J., Alie-Daram, S., Vergnes, H., Brisson-Lougarre, A., Calot, M., Martin, J., Fournie, A. : About diminished transport of maternal IgG (RhD alloimmunization) to the fetus. (1995) *Vox Sang.* 68, 134-135
- Gunson, H.H., Phillips, P.K., Stratton, F. : Manipulative and inherent errors in anti-D quantitation using the autoanalyzer. (1972) *J. Clinical Pathology* 25, 198-205
- Gunson, H.H., Stratton, F., Phillips, P.K. : The anti-Rh(D) responses of immunized following spaced antigenic stimuli. (1974) *Br. J. Haematol.* 27, 171-182.
- Hadley, A.G., Kumpel, B.M., Merry, A.H. : The chemiluminescent response of human monocytes to red cells sensitized with monoclonal anti-Rh(D) antibodies. (1988) *Clin. Labo. Haemat.* 10, 377-384
- Hadley, A.G., Kumpel, B.M. : Phagocytosis by human monocytes of red cells sensitized with monoclonal IgG1 and IgG3 anti-D. (1989a) *Vox Sang* 57, 150-151

- Hadley, A.G., Kumpel, B.M., Leader, K., Merry, A.H., Brojer, E., Zupanska, B. : An in-vitro assessment of the functional activity of monoclonal anti-D. (1989b) *Clin. lab. Haemat.* 11, 47-54
- Hadley, A.G., Kumpel, B.M. : Synergistic effect of blending IgG1 and IgG3 monoclonal anti-D in promoting the metabolic response of monocytes to sensitized red cells. (1989c) *Immunology* 67, 550-552
- Hadley, A.G., Zupanska, B., Kumpel, B.M., Leader, K.A. : The functional activity of Fc γ RII and Fc γ RIII on subsets of human lymphocytes. (1992a) *Immunology* 76, 446-451
- Hadley, A.G., Poole, G.D., Fraser, I.D. : Predicting the severity of haemolytic disease of the newborn: prospective evaluation of the chemiluminescence test. (1992b) *Vox Sang.* 63, 291-292
- Hadley, A.G., Garner, S.F., Taverner, J.M. : Autoanalyzer quantification, monocyte-mediated cytotoxicity and chemiluminescence assays for predicting the severity of haemolytic disease of the newborn. (1993) *Transfusion Medicine* 3, 195-200
- Hadley, A.G., Zupanska, B., Kumpel, B.M., Pilkington, C., Griffiths, H., Leader, K.A., Jones, J., Booker, D.J., Stamps, R., Sokol, R.J. : The glycosylation of red cell autoantibodies affects their functional activity *in vitro*. (1995) *Brit. J. Haematol.* 91, 587-594
- Halma, C., Daha, M.R., Van Es L.A. : *In vivo* clearance by the mononuclear phagocyte system in humans: an overview of methods and their interpretation. (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 89, 1-7
- Heyman, B. : The immune complex : possible ways of regulating the antibody response. (1990) *Immunol. Today* 11, 310-313
- Hirvonen, M., Tervonen, S., Pirkola, A., Sievers, G. : An enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative determination of anti-D in plasma samples and immunoglobulin preparations. (1995) *Vox Sang.* 69, 341-346
- Hughes-Jones, N.C., Mollison, P.L., Veall, N. : Removal of incompatible red cells by the spleen. (1957) *Brit. J. Haematol.* 3, 125
- Hughes-Jones, N.C. : The estimation of the concentration and equilibrium constant of anti-D. (1967) *Immunology* 12, 565-571
- Hughes-Jones, N.C., Dawes, B., Gorick, B.D., Melamed, M.D., Pepper, R., Thompson, K.M. : Radio-immunoassay of the functional activity of anti-D (Rh) preparations using a human monoclonal ¹²⁵I-labelled anti-D. (1987) *Vox Sang.* 53, 175-180
- Hughes-Jones, N.C., Bye, J., Beale, D., Coadwell, J. : Nucleotide sequences and three-dimensional modeling of the VH and VL domains of two human monoclonal antibodies specific for the D antigen of the human Rh-blood-group system. (1990) *Biochem. J.* 268, 135-140

- Hunt, J.S., Beck, M.L., Hardman, J.T., Tegtmeier, G.E., Bayer, W.L. : Characterization of human erythrocyte alloantibodies by IgG subclass and monocyte interaction. (1980) *Am. J. Clin. Path.* 74, 259-264
- Hunt, J.S., Beck, M.L., Wood, G.W. : Monocyte-mediated erythrocyte destruction: a comparative study of current methods. (1981) *Transfusion* 21, 735-738
- Issitt, P.D. : genetics of the Rh blood group system : some current concepts. (1988) *Medical Laboratory Sciences* 45, 395-404
- Iyer, Y.S., Kulkarni, S.V., Gupte, S.C. : Distribution of IgG subtypes in maternal anti-D sera and their prognostic value in Rh haemolytic disease of the newborn. (1992) *Acta Haematol.* 88, 78-81
- Jaenichen, H.-R., Pech, M., Lindenmaier, W., Wildgruber, N., Zachau, H.G. : Composite human Vk genes and a model of their evolution. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 5249-5263
- Jandl, J.H., Richardson, A.R., Castle, W.B. : The destruction of red cells by antibodies in man. I. Observations on the sequestration and lysis of red cells altered by immune mechanisms. (1957) *J. Clinical Investigation* 36, 1428-1459
- Jefferis, R., Pound, J., Lund, J. Goodall, M. : Effector mechanisms activated by human IgG subclass antibodies: clinical and molecular aspects. (1994) *Annales de Biologie Clinique* 52, 57_65.
- Jouvenceau, A. : Prévention de l'immunisation anti-Rh. (1971) *Rev. Franç. Transfus.* 15, 39-52.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H., Gottesman, K.S. : Sequences of proteins of immunological interest. (1987) U.S. Dept. Health Human Services, Washington. 4th Ed.
- Kaiho, S.-I., Mizuno, K. : Sensitive assay systems for detection of hemoglobin with 2,7-diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythrodifferentiation. (1985) *Analytical Biochemistry* 149, 117-120
- Karlsson, R., Fågerstam, L., Nilshans, H., Persson, B. : Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters. (1993) *J. Immunol. Meth.* 166, 75-84
- Klaassen, R.J.L., Ouwehand, W.H., Huizinga, T.W.J., Engelfriet, C.P., von dem Borne, A.E.G.Kr. : The Fc-receptor III of culture human monocytes (1990) *J. Immunol.* 144, 599-606
- Klobeck, H.G., Bornkamm, G.W., Combriato, G., Mocikat, R., Pohlenz, H.D., Zachau, H.G. : Subgroup IV of human immunoglobulin K light chains is encoded by a single germline gene. (1985a) *Nucleic Acids Research* 13, 6515-6529
- Klobeck, H.G., Meindl, A., Combriato, G., Solomon, A., Zachau, H.G. : Human immunoglobulin kappa light chain of subgroups II and III. (1985b) *Nucleic Acids Research* 13, 6499-6513

- Köhler, G., Milstein, C. : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. (1975) *Nature* 256, 495-497
- Koskimies, S. : Human lymphoblastoid cell line producing specific antibody against Rh-antigen D. (1980) *Scand. J. Immunol.* 11, 73-77
- Kozbor, D., Roder, J. : The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes. (1983) *Immunol. Today* 4, 72-79
- Kumpel, B.M., Leader, K.A., Bradley, B.A. : The relationship between IgG subclass and Gm allotype of monoclonal anti-Rh(D) antibodies and their functional activity. (1988) *Biochem. Soc. Trans.* 16, 733-734
- Kumpel, B.M., Poole, G.D., Bradley, B.A. : Human monoclonal anti-D antibodies I. their production, serology, quantitation and potential use as blood grouping reagents. (1989) *Br. J. Haematol.* 71, 125-129
- Kumpel, B.M., Hadley, A.G. : Functional interactions of red cells sensitized by IgG1 and IgG3 human monoclonal anti-D with enzyme-modified human monocytes and FcR-bearing cell lines. (1990a) *Molec. Immunol.* 27, 247-256
- Kumpel, B.M. : Workshop 3B : functional activity of human Rh monoclonal antibodies (MABS). (1990b) *J. Immunogenetics* 17, 321-330
- Kumpel, B.M. : A simple non-isotopic method for the quantitation of red cell-bound immunoglobulin. (1990c) *Vox Sang* 59, 34-39
- Kumpel, B.M., Rademacher, T.W., Rook, G.A.W., Williams, P.J., Wilson, I.B.H. : Galactosylation of human IgG monoclonal anti-D produced by EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines is dependent on culture method and affects Fc receptor-mediated functional activity. (1994) *Hum. Antibod. Hybridomas* 5, 143-151
- Kumpel, B.M., Goodrick, M.J., Pamphilon, D.H., Fraser, I.D., Poole, G.D., Morse, C., Standen, G.R., Chapman, G.E., Thomas, D.P., Anstee, D.J. : Human Rh D monoclonal antibodies (BRAD-3 and BRAD-5) cause accelerated clearance of RhD+ red blood cells and suppression of RhD immunization in RhD- volunteers. (1995a) *Blood* 86, 1701-1709
- Kumpel, B.M., Judson, P.A. : Quantification of IgG anti-D bound to D-positive red cells infused into D-negative subjects after intramuscular injection of monoclonal anti-D. (1995b) *Transfusion Medicine* 5, 105-112
- Larrick, J.W., Danielsson, L., Brenner, C.A., Abrahamson, M., Fry, K.E. and Borrebaeck, C.A.K. : Rapid cloning of rearranged Ig genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction. (1989b) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 160, 1250-1256
- Lecointre-Coatmelec, M., Bourel, D., Ferrette, J., Genetet, B. : A human anti-J^{kb} monoclonal antibody. (1991) *Vox Sang.* 61, 255-257
- Lee, D. : Recommended dose of anti-D Ig. (1993) *BMJ* 307, 1145-1146

- Lifely, M.R., Hale, C., Boyce, S., Keen, M.J., Phillips, J. : Glycosylation and biological activity of CAMPATH-1H expressed in different cell lines and grown under different culture conditions. (1995) *Glycobiology* 8, 813-822
- Loghem, E.E. : Allotypic markers. (1986) *Monogr. Allergy*, vol. 19, pp. 40-51 - Karger, Basel
- Lomas, C., Tippett, P., Thompson, K.M., Melamed, M.D., Hughes-Jones, N.C. : Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. (1989) *Vox Sang.* 57, 261-264
- Lomas, C., McColl, K., Tippett, P. : Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti-D. (1993) *Transfusion Medecine* 3, 67-69
- McCann, M.C., James, K., Kumpel, B.M. : Production and use of human monoclonal anti-D antibodies. (1988) *J. Immunol. Meth.* 115, 3-15
- McCann-Carter, M.C., Bruce, M., Shaw, E.M., Thorpe, S.J., Sweeney, G.M., Armstrong, S.S., James, K. : The production and evaluation of two human monoclonal anti-D antibodies. (1993) *Transfusion Medecine* 3, 187-194
- McDonald, G., Primrose, S., Biggins, K., Bowman, J.M., Berczi, I., Friesen, A.D., Schon, A.H. : Production and characterization of human-human and human-mouse hybridomas secreting Rh(D)-specific monoclonal antibodies. (1987) *Scand. J. Immunol.* 25, 477-483
- Melamed, M.D., Gordon, J., Ley, S.J., Edgar, D., Hughes-Jones, N.C. : Senescence of a human lymphoblastoid clone producing anti-Rh(D). (1985) *Eur. J. Immunol.* 15, 742-746
- Melamed, M.D., Thompson, K.M., Gibson, T., Hughes-Jones, N.C. : Requirements for the establishment of heterohybridomas secreting monoclonal human antibody to rhesus (D) blood group antigen. (1987) *J. Immunol. Methods* 104, 245-251
- Meulen, F.W. van der, Hart, M.van Der, Fleer, A., Borne, A.E.G.Kr. von dem, Engelfriet, C.P., Loghem, J.J.van : The role of adherence to human mononuclear phagocytes in the destruction of red cells sensitized with non-complement binding IgG antibodies (1978) *Br. J. Haematol.* 38, 541-549
- Michon, J., Moutel, S., Barbet, J., Romet-Lemonne, J.L., Deo, Y.M., Fridman, W.H., Teillaud, J.L. : *In vitro* killing of neuroblastoma cells by neutrophils derived from granulocyte colony-stimulating factor-treated cancer patients using an anti-disialoganglioside/anti-Fc γ RI bispecific antibody. (1995) *Blood* 86, 1124-1130
- Mollison, P.L., Hughes-Jones, N.C. : Clearance of Rh positive cells by low concentrations of Rh antibody. (1967) *Immunology* 12, 63-73
- Mollison, P.L. : Suppression of Rh-immunization by passively administered anti-Rh. (1968) *Brit. J. Haemat.* 14, 1-4
- Mollison, P.L., Frame, M., Ross, M.E. : Differences between Rh(D) negative subjects in response to Rh(D) antigen. (1970) *Br. J. Haematol.* 19, 257
- Montreuil, J. : La structure des glycoconjugués. (1993a) *Biofutur* Juillet-Août, 12-17

- Montreuil, J. : Recombinant glycoproteins : pitfalls and strategy. (1993b) *Biotechnology of blood proteins* 227, 283-292
- Moore, S., Green, C. : The identification of specific Rhesus-polypeptide-blood-group-ABH-active-glycoprotein complexes in the human red-cell membrane. (1987) *Biochem. J.* 244, 735-741
- Morell, A., Skvaril, F., van Loghem, E., Kleemola, M. : Human IgG subclasses in maternal and fetal serum. (1971) *Vox Sang.* 21, 481-492
- Morphis, L.G., Gitlin, D. : Maturation of the maternofetal transport system for human γ -globulin in the mouse. (1970) *Nature* 228, 573
- Munn, L.R., Chaplin, H. : Rosette formation by sensitized human red cells - effects of source of peripheral leukocyte monolayers. (1977) 33, 129-142
- Nance, S.J., Nelson, J.M., Horenstein, J. : Monocyte monolayer assay: an efficient non-invasive technique for predicting the severity of haemolytic disease of the newborn. (1989) *Am. J. Clin. Pathol.* 92, 89-92
- Natvig, J.B., Forre, O., Michaelsen, T.E. : Restriction of human immune antibodies to heavy-chain variable subgroups. (1976) *Scand. J. Immunol.* 5, 667-675
- Nicolaides, K.H., Rodeck, C.H. : Maternal serum anti-D antibody concentration and assessment of rhesus isoimmunisation. (1992) *B.M.J.* 304, 1155-1156
- Noble, A.L., Poole, G.D., Anderson, N., Lucas, G.F., Hadley, A.G. : Predicting the severity of haemolytic disease of the newborn: an assessment of the clinical usefulness of the chemiluminescence test. (1995) *Br. J. Haematology* 90, 718-720
- Paire, J., Monestier, M., Rigal, D., Martel, F., Desgranges, C. : Establishment of human cell lines producing anti-D monoclonal antibodies: identification of rhesus D antigen. (1986) *Immunol.* 13, 137-141
- Paquette, R.,L., Minosa, M.R., Verma, M.C., Nimer,S.D., Koeffler, P. : An interferon- γ activation sequence mediates the transcriptional of the IgG Fc receptor type IC gene by interferon- γ . (1995) *Molecular Immunology* 32, 841-851
- Pargent, W., Meindl, A., Thiebe, R., Mitzel, S., Zachau, H.G. : The human immunoglobulin κ locus. Characterization of the duplicated O regions. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21, 1821-1827
- Parinaud, J., Blanc, M., Grandjean, H., Fournie, A., Bierme, S., Pontonnier, G. : IgG subclasses and Gm allotypes of anti-D antibodies during pregnancy : correlation with the gravity of the fetal disease. (1985) *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151, 1111-1115
- Parren, P.W.H.I. : Preparation of genetically engineered monoclonal antibodies for human immunotherapy. (1992) *Hum. Antib. Hybridomas* 3, 137-145
- Pech, M., Jaenichen, H.R., Pohlenz, H.-D., Neumaier, P.S., Klobeck, H.G., Zachau, H.G. : Organization and evolution of a gene cluster for human immunoglobulin variable regions of the kappa type. (1984a) *J. Mol. Biol.* 176, 189-204

- Pech, M., Zachau, H.G. : Immunoglobulin genes of different subgroups are interdigitated within the V_k locus. (1984b) *Nucleic Acids Research* 12, 9229-9236
- Pech, M., Smola, H., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Gerl, R., Zachau, H.G. : A large section of the gene locus encoding human Ig variable regions of the kappa type is duplicated. (1985) *J. Mol. Biol.* 183, 291-299
- Perticarari, S., Presani, G., Banfi, E. : A new flow cytometric assay for the evaluation of phagocytosis and the oxidative burst in whole blood. (1994) *J. Immunological Methods* 170, 117-124
- Pollock, J.M., Bowman, J.M. : Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn. (1990) *Vox Sang* 59, 176-179
- Pollock, J.M., Bowman, J.M. : Anti-Rh(D) IgG subclasses and severity of Rh hemolytic disease of the newborn. (1990) *Vox Sang* 59, 176-179
- Prince, S. (1994) *La gazette de la transfusion* 94, 49
- Ridgwell, K., Tanner, M.J.A., Anstee, D.J. : The rhesus(D) polypeptide is linked to the human erythrocyte cytoskeleton. (1984) *FEBS* 174, 7-10
- Rock, G., Lafreniere, I., Chan, L., McCombie, N. : Plasma exchange in the treatment of hemolytic disease of the newborn. (1981) *Transfusion* 21, 546-551
- Saboori, A., Smith, B.L., Agre, P. : Polymorphism in the Mr 32000 Rh protein purified from Rh(D)-positive and -negative erythrocytes. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 4042-4045
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich H.A., Arnheim, N. : Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. (1985) *Science* 230, 1350-1354
- Salama, A., Kiefel, V., Mueller-Eckhardt, C. : Effect of IgG anti-Rho(D) in adult patients with chronic autoimmune thrombocytopenia. (1986) *American J. Hematology* 22, 241-250
- Salmon, C., Cartron, J.P., Rouger, P. : Les groupes sanguins chez l'homme. (1991) - 2^{ème} édition - Ed. Masson, Paris
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. : Molecular cloning. A laboratory manual. (1989) - Second edition - Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sarmay, G. : Functional studies on Fc receptors. (1992a) *Immunol. Today* 13, A6-A9
- Sarmay, G., Lund, J., Rozsnyay, Z., Gergely, J., Jefferis, R. : Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc γ receptor. (1992b) *Molecular Immunology* 29, 633-639
- Schanfield, M.S., Stevens, J.O., Bauman, D. : The detection of clinically significant erythrocyte alloantibodies using a human mononuclear phagocyte assay. (1981) *Transfusion* 21, 571-576
- Scott, M.G., Crimmins, D.L., McCourt, D.W., Chung, G., Schäble, K.F., Thiede, R., Quenzel, E.-M., Zachau, H.G., Nahm, M. : Clonal characterization of the human IgG antibody repertoire to *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide. (1991) *J. Immunol.* 147, 4007-4013

- Siminovitch, K.A., Misener, V., Kwong, P.C., Song, O.L., Chen, P.P. : A natural autoantibody is encoded by germline heavy and light chain variable region genes without somatic mutation. (1989) *J. Clin. Invest.* 84, 1675-1678
- Sinclair, N.R. StC : Regulation of the immune response. (1969) *J. Exp. Med.* 129, 1183-1201
- Stavnezer, J., Kekish, O., Batter, D., Grenier, J., Balazs, I., Henderson, E., Zegers, B.J.M. : Aberrant recombinant events in B cell lines derived from a k-deficient human. (1985) *Nucleic Acids Research* 13, 3495-3514
- Steinitz, M., Klein, G., Koskimies, S., Makel, O. : EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. (1977) *Nature* 269, 420-422
- Straubinger, B., Huber, E., Lorenz, W., Osterholzer, E., Pargent, W., Pech, M., Pohlenz, H.-D., Zimmer, F.-J., Zachau, H.G. : The human Vk locus. Characterization of a duplicated region encoding 28 different immunoglobulin genes. (1988) *J. Mol. Biol.* 199, 23-34
- Thomson, A., Contreras, M., Gorick, B., Kumpel, B., Chapman, G.E., Lane, R.S., Teesdale, P., Hughes-Jones, N.C., Mollison, P.L. : Clearance of Rh D positive red cells with monoclonal anti-D. (1990) *Lancet* 336, 1147-1150
- Thorpe, S.J. : Detection of Rh D-associated epitopes in human and animal tissues using human monoclonal anti-D antibodies. (1989) *Brit. J. Haemat.* 73, 527-536
- Tippett, P., Sanger R. : Observation on subdivisions of the Rh antigen D. (1962) *Vox Sang.* 7, 9-13
- Tippett, P. : Sub-divisions of the Rh(D) antigen. (1988) *Medical Laboratory Science* 45, 88-93
- Tippett, P., Moore, S. : Workshop 3A: Monoclonal antibodies against Rh and Rh related antigens. (1990) *J. Immunogenetics* 17, 309-319
- Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B., Winter, G. : The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 776-798.
- Uff, C.R., Pockley, A.G., Phillips, R.K.S. : A rapid microplate-based fluorometric assay for phagocytosis. (1993) *Immunological Investigations* 22, 407-413
- Unkeless, J.C., Scigliano, E., Freedman, V.H. : Structure and function of human and murine receptors for IgG. (1988) *Ann. Rev. Immunol.* 6, 251-281
- Urbaniak, S.J. : ADCC (K-cell) lysis of human erythrocytes sensitized with rhesus alloantibodies. I. Investigation of *in vitro* culture variables. (1979a) 42, 303-314
- Urbaniak, S.J. : ADCC (K-cell) lysis of human erythrocytes sensitized with rhesus alloantibodies. II. Investigation into the mechanism of lysis. (1979b) *British J. Haematology* 42, 315-328
- Urbaniak, S.J., Greiss, M.A. : ADCC (K-cell) lysis of human erythrocytes sensitized with rhesus alloantibodies. III. Comparison of IgG anti-D agglutinating and lytic (ADCC) activity and the role of IgG subclasses. (1980) *British J. Haematology* 46, 447-453

- Urbaniak, S.J., Robertson, A.E. : A successful program of immunizing Rh-negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. (1981) *Transfusion* 21, 64-69
- Urbaniak, S.J., Griess, M.A., Crawford, R.J. : Prediction of the outcome of rhesus haemolytic disease of the newborn: additional information using an ADCC assay. (1984) *Vox Sang.* 46, 323-329
- Urbaniak, S.J. : Rh(D) haemolytic disease of the newborn: the changing scene. (1985) *British Medical Journal* 291, 4-6
- Urbaniak, S.J. : Results of tests with different cellular bioassays in relation to severity of RhD haemolytic disease. (1991) *Vox Sang.* 60, 225-229
- Verbert, A. : La glycosylation des protéines recombinantes. (1993) *Biofutur* Juillet-août, 40-44
- Walker, M.R., Kumpel, B.M., Thompson, K., Woof, J.M., Burton, D.R., Jefferis, R. : Immunogenic and antigenic epitopes of immunoglobulins binding of human monoclonal anti-D antibodies to FcRI on the monocyte-like U937 cell line. (1988) *Vox Sang* 55, 222-228
- Walter, M.A., Surti, U., Hofker, M.H., Cox, D.W. : The physical organization of the human Ig heavy chain gene complex. (1990) *EMBO J.* 9, 3303-3313
- Wiener, E., Atwal, A., Thompson, K.M., Melamed, M.D., Gorick, B., Hughes-Jones, N.C. : Differences between the activities of human monoclonal IgG1 and IgG3 subclasses of anti-D(Rh) antibody in their ability to mediate red cell-binding to macrophages. (1987) *Immunology* 62, 401-404
- Wiener, E., Jolliffe, V.M., Scott, H.C.F., Kumpel, B.M., Thompson, K.M., Melamed, M.D., Hughes-Jones, N.C. : difference between the activities of human monoclonal IgG1 and IgG3 anti-D antibodies of the Rh blood group system in their abilities to mediate effector functions of monocytes. (1988) *Immunology* 65, 159-163.
- van de Winkel, J.G.J., Capel, J.A. : Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. (1993) *Immunology Today* 14, 215-221
- Winter, G., Milstein, C. : man-made antibodies. (1991) *Nature* 349, 293-299
- Woodrow, J.C., Clarke, C.A., Donohue, W.T.A., Finn, R., McConnell, R.B., Sheppard, P.M., Lehane, D., Roberts, F.M., Gimlette, T.M.D. : mechanism of Rh prophylaxis: an experimental study on specificity of immunosuppression. (1975) *Br. Med. J.* 2, 57-59
- Woof, J.M., Jaafar, M.I.N., Jefferis, R., Burton, D.R. : The monocyte binding domain(s) on human immunoglobulin G. (1984) *Molecular Immunology* 21, 523-527
- Woof, J.M., Partridge, L.J., Jefferis, R., Burton, D.R. : Localisation of the monocyte-binding region on human Ig G. (1986) *Molecular Immunology* 23, 319-330
- Worthington, R.E., Bossie-Codreanu, J., Zant G.V. : Quantitation of erythroid differentiation in vitro using a sensitive colorimetric assay for hemoglobin. (1987) *Exp. Hematol.* 15, 85-92

- Young, N.T., Street, J., Darke, C. : Immunoglobulin allotype frequencies in responders and nonresponders to the Rh(D) antigen. (1995) *Exp. Clin. Immunogenet.* 12, 88-91
- Zupanska, B., Thomson, E.E., Merry, A.H.: Fc receptors for IgG1 and IgG3 on human monoclear cells - an evaluation with known levels of erythrocyte-bound IgG. (1986) *Vox Sang.* 50, 97-103. Thèse - anti-D -
- Zupanska, B., Thompson, E., Brojer, E., Merry, A.H. : Phagocytosis of erythrocytes sensitized with known amounts of IgG1 and IgG3 anti-Rh antibodies. (1987) *Vox Sang* 53, 96-101
- Zupanska, B., Brojer, E., Richards, Y., Lenkiewicz, B., Seyfried, H., Howell, P.: Serological and immunological characteristics of maternal anti-Rh(D) antibodies in predicting the severity of HDN. (1989) *Vox Sang.* 56, 247-250
- Zupanska, B., Gronkowska, A., Ziemski, M. : Comparison of activity of peripheral monocytes and splenic macrophages in the monocyte monolayer assay. (1995) *Vox Sang* 68, 241-242



AIDE MEMOIRE

Ac monoclonaux anti-D

Nom de l'hybridome	Nom de l'Ac	Sous-classe	Donneur	Épitope reconnu
190/31	AD1	$\gamma 1/\kappa$	D	2
190/31	C77	$\gamma 1/\kappa$	D	2
P3X229-14	AD3	$\gamma 3/\kappa$	A	6,7
P3X229-14	C79	$\gamma 3/\kappa$	A	6,7
P3X229-24	-	$\gamma 3/\kappa$	A	-
P3X83	P3X83	$\gamma 1/\kappa$	B	3 ou 4
P3X212	P3X212	$\gamma 1/\kappa$	C	5
P3X35	P3X35	$\gamma 1/\lambda$	C	5
HM16	HM16	$\gamma 1/\lambda$	E	6,7

Sérums anti-D

Nom	Donneur
S1	X ; prélèvement à t ₀
S2	X ; prélèvement à t ₀ +15 jours
S3	X ; prélèvement à t ₀ +2mois
S4	Y
S5	Z

Acides-aminés : conversion du sigle à trois lettres en une lettre

Ala	A	His	H	Thr	T
Arg	R	Ile	I	Trp	W
Asn	N	Leu	L	Val	V
Asp	D	Lys	K	Tyr	Y
Cys	C	Met	M		
Gln	Q	Phe	F		
Glu	E	Pro	P		
Gly	G	Ser	S		