



**UNIVERSITÉ  
DE REIMS  
CHAMPAGNE-ARDENNE**

**UFR DE MEDECINE**

ANNEE 2008

THÈSE N°

## **THÈSE**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

**Discipline : Immunologie**

Soutenue publiquement le 11 Avril 2008

Par

Aymric KISSERLI  
(Né le 10/06/1974 à Troyes)

***DISTRIBUTION, RÔLE ET REGULATION DU CRI  
(CD35, RECEPTEUR POUR LE C3b/C4b) ERYTHROCYTAIRE.  
ANALYSE DE DEPÔTS ERYTHROCYTAIRES DE FRACTIONS  
DU COMPLEMENT***

Laboratoire d'Immunologie. Physiopathologie Dysimmunitaire et Infectieuse Humaine.  
EA 3798 – Pôle Biomolécules. IFR 53 Biomolécules. Faculté de Médecine de Reims.

Membres du Jury

Président :	Pr. Michel PLUOT
Rapporteur :	Pr. Geneviève CORDIER
Rapporteur :	Pr. Christian DROUET
Examineur :	Dr. Jérôme DEVY
Examineur :	Dr. Xavier DERVILLEZ
Directeur de Thèse :	Pr. Jacques COHEN

# REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le Professeur Jacques COHEN de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche, de m'avoir permis d'acquérir une formation poussée en Immunologie grâce à une thématique passionnante et de m'avoir toujours guidé au mieux.

Je remercie Monsieur le Professeur Michel PLUOT qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Je remercie Madame le Professeur Geneviève CORDIER d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Christian DROUET d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie Monsieur le Maître de conférence Jérôme DEVY d'avoir accepté d'être examinateur.

Je remercie Monsieur le Docteur Xavier DERVILLEZ d'avoir accepté d'être examinateur.

Je remercie Monsieur Jean-Marc EGLY de l'IGBMC (Strasbourg) et Madame Odile PUIJALON de l'Institut Pasteur (Paris).

Je remercie infiniment mes encadrants Béatrice DONVITO-GAY et Thierry TABARY, pour leurs précieux conseils, leur disponibilité et tout l'effort et le temps qu'ils ont consacré pour corriger ma thèse.

Je remercie Marcelle TONYE LIBYE pour ses précieux conseils en biologie moléculaire notamment pour l'étude des promoteurs de *M. mulatta*.

Je remercie le sympathique Dr Fadi HAIDAR qui a réalisé « l'étude clinique EC4d ».

Je remercie Frédérique P. qui m'a montré la technique du Western Blot au tout début.

Je remercie mes collègues, Nathalie G., Annelise G-M, Valerie D., Brigitte R. et Xavier D.

Je remercie Mélanie V. pour les lectures de « cytométrie C4d ».

Je remercie mon collègue Wael pour ses conseils, sa gentillesse et sa grande tolérance.

Je remercie tous les membres du 5ème :

- Les secrétaires toujours sympas
- La « laverie » qui m'a toujours dépanné quand j'en avais besoin : Merci Jean Paul, Chantal and co...
- Les membres du 524 pour leur gentillesse et leur disponibilité permanente, en particulier Ldou (Miss 980 CR1/E) qui m'a donné régulièrement ces globules rouges (un nouveau merci au Chef (180 E/CR1)), Pascale, Laurence C and co...
- Le HLA (saisons 1, 2 et 3) avec une pensée pour toutes les Maries..., Merci à Alex et Priscilla qui n'hésitent jamais à me prélever quand j'en ai besoin...
- Les surveillantes Francine et Isabelle pour leur gentillesse et grâce à qui j'ai pu commander tout un tas de réactifs...
- Sandrine et Patrick qui ont réceptionné les tubes C4d en me donnant un suivi permanent et utile de la situation...
- Lorianne , Pascal, Annie, Petra, Jeannick, les Véroniques...

Je remercie aussi le labo des dentaires qui m'a toujours dépanné en réactifs et autres petits matériels ...

Je remercie mes camarades : Minipoune et Sophie dits les « japonais du Mexique » pour les dégustations d'Irancy et autre Epineuil , Reynal, Audeline de Lille et Seb, Manuela et sa pite famille, L'Empereur et sa bande dont le célèbre Dookie et les tarentules du miami..., Julie.

Je remercie ma Famille pour son soutien

Ma Maman, mon Père , Laure et Romain, Arnaud et Céline et la nouvelle génération : le minidoudou bébé Chris !!!

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>I. LE COMPLEMENT .....</b>	<b>15</b>
<b>I.1. Nomenclature.....</b>	<b>17</b>
<b>I.2. Le C3.....</b>	<b>19</b>
<b>I.3. Le C4.....</b>	<b>21</b>
<b>I.3.1. Génétique du C4 .....</b>	<b>21</b>
<b>I.3.2. Structure du C4.....</b>	<b>21</b>
<b>I.3.3. La fraction C4d.....</b>	<b>22</b>
<b>I.3.4. Le C4d érythrocytaire (EC4d).....</b>	<b>23</b>
<b>I.3.5. Le C4d histologique (HC4d) dans le rein.....</b>	<b>24</b>
<b>I.4. La voie classique d'activation du complément. ....</b>	<b>25</b>
<b>I.5. La voie alterne .....</b>	<b>26</b>
<b>I.6. Voie des lectines.....</b>	<b>27</b>
<b>I.7. Complexe d'attaque membranaire .....</b>	<b>28</b>
<b>I.8. Opsonisation et phagocytose .....</b>	<b>28</b>
<b>I.9. Complément et inflammation .....</b>	<b>29</b>
<b>I.10. Complément et ischémie-reperfusion du greffon.....</b>	<b>29</b>
<b>I.10.1. Voies d'activation du complément .....</b>	<b>29</b>
<b>I.10.2. Voie terminale effectrice et ischémie-reperfusion.....</b>	<b>30</b>
<b>I.10.3. Complément, anticorps et rejet aigu en transplantation rénale.....</b>	<b>30</b>
<b>II. LE CR1 .....</b>	<b>31</b>
<b>II.1. Historique.....</b>	<b>31</b>
<b>II.2. Répartition Cellulaire .....</b>	<b>32</b>
<b>II.3. Structure protéique.....</b>	<b>32</b>
<b>II.4. Le gène.....</b>	<b>36</b>
<b>II.5. Evolution des gènes CR1.....</b>	<b>38</b>
<b>II.6. Evolution des gènes CR1 et CR1like .....</b>	<b>39</b>
<b>II.7. Localisation chromosomique du gène de CR1 : le RCA (<i>Regulator of Complement Activation</i>).....</b>	<b>39</b>
<b>II.8. Sites de fixations aux C3b et C4b .....</b>	<b>40</b>
<b>II.9. CR1 récepteur du C1q et de MBL (<i>mannan-binding lectin</i>) .....</b>	<b>41</b>
<b>II.10. Inactivation des voies classique et alterne du complément par le CR1</b>	<b>42</b>
<b>III. LE CR1 ERYTHROCYTAIRE .....</b>	<b>43</b>
<b>III.1. Densité de CR1 érythrocytaire.....</b>	<b>43</b>
<b>III.2. Distribution de CR1 à la surface des érythrocytes.....</b>	<b>43</b>
<b>III.3. Contrôle génétique de la densité de CR1 érythrocytaire.....</b>	<b>44</b>
<b>III.4. Régulation physiologique de la densité de CR1 érythrocytaire.....</b>	<b>46</b>
<b>III.5. Fixation des complexes immuns par les érythrocytes .....</b>	<b>47</b>
<b>III.6. Transport et clairance des complexes immuns .....</b>	<b>48</b>
<b>IV. ROLE DU CR1 SUR LES AUTRES TYPES CELLULAIRES .....</b>	<b>53</b>
<b>IV.1. CR1 et polynucléaires.....</b>	<b>53</b>
<b>IV.2. CR1 et Phagocytose .....</b>	<b>54</b>
<b>IV.3. Rôle du CR1 dans la réponse anticorps.....</b>	<b>54</b>
<b>IV.3.1. CR1 et tolérance des lymphocytes B aux antigènes du soi .....</b>	<b>55</b>
<b>IV.3.2. CR1 et activation de la réponse anticorps.....</b>	<b>55</b>

IV.4. Le CR1 à la surface des podocytes glomérulaires .....	56
V. LE CR1 SOLUBLE .....	57
V.1. Détection .....	57
V.2. Origine .....	58
V.3. Fonctions.....	59
VI. COMPARAISON AUX AUTRES MOLECULES DU RCA.....	59
VII. CR1 ET GROUPES SANGUINS .....	60
VIII. LE CR1 CHEZ LES PRIMATES NON-HUMAINS .....	63
VIII.1. Classification des primates.....	63
VIII.2. Le CR1 érythrocytaire.....	64
VIII.3. Ligands de CR1like .....	65
VIII.4. Structure de CR1like .....	65
VIII.5. Le CR1 à la surface des leucocytes .....	67
VIII.6. Bases génétiques.....	68
IX. LE CR1 CHEZ LES RONGEURS .....	70
IX.1. Protéines récepteurs des fragments du C3 .....	70
IX.1.1. Chez la souris .....	70
IX.1.2. Chez le rat .....	72
IX.1.3. Chez le lapin et le cobaye .....	72
IX.2. Bases génétiques.....	73
IX.3. Applications à l'Homme .....	75
X. CR1 ET PATHOLOGIES .....	76
X.1. CR1 et Paludisme .....	76
X.2. Paludisme et variation de la structure de CR1 à travers les espèces de primates.....	79
X.3. CR1 et infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ....	81
X.3.1. Diminution de la densité de CR1/E chez les sidéens .....	81
X.4. CR1 et maladies à complexes immuns .....	81
X.4.1. Définitions des maladies à complexes immuns .....	81
X.4.2. Diminution de la densité de CR1/E dans les maladies à complexes immuns	83
X.4.3. Conséquence sur la clairance des complexes immuns.....	83
X.5. CR1 et Syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS).....	84
X.6. CR1 et prééclampsie .....	84
XI. MECANISMES EXPLIQUANT LA DIMINUTION DE LA DENSITE DE CR1/E .....	84
XI.1. La vésiculation .....	84
XI.2. La protéolyse.....	85
XI.3. Le contrôle génétique de l'expression de CR1 .....	86
XI.4. La présence d'auto-anticorps anti-CR1.....	86
XII. UTILISATION DU CR1 EN THERAPEUTIQUE .....	87
XII.1. Augmentation de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes .....	87
XII.2. Protection des cellules contre le complément par expression de CR1 à leur surface.....	88
XII.3. Le CR1 soluble recombinant (rCR1s) .....	89
XII.4. Protection des allogreffes par le rCR1s.....	89
XII.5. Protection des xénogreffes par le rCR1s.....	90
XII.6. Effet protecteur de rCR1s lors de l'infarctus du myocarde .....	91

<b>XII.7. Effet protecteur de rCR1s dans l'hémolyse dépendante du complément</b>	<b>91</b>
<b>XII.8. Clairance des antigènes par des anticorps divalents</b>	<b>92</b>
<b>XIII. 1.3 REGULATION GENIQUE CHEZ LES EUARYOTES : RAPPELS</b>	<b>94</b>
<b>XIII.1. Structure des gènes eucaryotes</b>	<b>94</b>
<b>XIII.2. Contrôle transcriptionnel</b>	<b>95</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>100</b>
<b>I. ANALYSE DE LA STRUCTURE ET DE LA DISTRIBUTION DES ESPECES MOLECULAIRES CR1 ET CR1LIKE (CR1L) ERYTHROCYTAIRES CHEZ LE MACAQUE RHESUS (<i>Macaca mulatta</i>)</b>	<b>101</b>
<b>I.1. Echantillons sanguins</b>	<b>101</b>
<b>I.2. Déplétion des leucocytes</b>	<b>101</b>
<b>I.3. Traitement des érythrocytes par la phospholipase C</b>	<b>101</b>
<b>I.4. Anticorps utilisés</b>	<b>101</b>
<b>I.5. Détermination de la densité des sites CR1 à la surface des érythrocytes</b>	<b>102</b>
<b>I.6. Analyse du poids moléculaire de CR1 par Western-Blot</b>	<b>102</b>
<b>I.7. Observation de la répartition géographique des CR1 et CR1like érythrocytaires par microscopies optique et confocale</b>	<b>103</b>
<b>I.7.1. Monomarquage</b>	<b>103</b>
<b>I.7.2. Double marquage</b>	<b>103</b>
<b>II. RECHERCHE ET ANALYSE DES PROMOTEURS DE CR1 ET CR1L DU MACAQUE RHESUS (<i>Macaca mulatta</i>)</b>	<b>106</b>
<b>II.1. Southern Blot</b>	<b>106</b>
<b>II.1.1. Préparation de la sonde CR1B marquée à la digoxigénine (Dig)</b>	<b>106</b>
<b>II.1.2. Digestion de l'ADN</b>	<b>106</b>
<b>II.1.3. Migration de l'ADN digéré</b>	<b>106</b>
<b>II.1.4. Transfert de l'ADN du gel sur la membrane</b>	<b>106</b>
<b>II.1.5. Hybridation de la sonde non radioactive</b>	<b>107</b>
<b>II.1.6. Révélation par chimioluminescence</b>	<b>108</b>
<b>III. CONSTRUCTION DES VECTEURS CONTENANT LES REGIONS PROMOTRICES DES GENES CR1 ET CR1LIKE (CR1L) HUMAINS ET MACAQUES (<i>Macaca mulatta</i>)</b>	<b>108</b>
<b>III.1. Biologie moléculaire</b>	<b>108</b>
<b>III.1.1. Isolement et clonage des régions promotrices CR1 et CR1like humaines</b>	<b>108</b>
<b>III.1.2. Amorces d'amplification</b>	<b>108</b>
<b>III.1.3. Isolement et clonage des régions promotrices CR1 et CR1like macaques (<i>Macaca mulatta</i>)</b>	<b>109</b>
<b>III.1.4. Technique d'amplification de l'ADN par PCR</b>	<b>111</b>
<b>III.1.5. Construction des vecteurs contenant les différentes régions promotrices des gènes CR1 et CR1L humains et macaques (<i>Macaca mulatta</i>)</b>	<b>112</b>
<b>IV. TRANSFECTIONS DES CELLULES EUARYOTES PAR LES PLASMIDES</b>	<b>113</b>
<b>IV.1. Transfections simples des cellules eucaryotes par les plasmides</b>	<b>113</b>
<b>IV.1.1. Cellules CHO</b>	<b>113</b>
<b>IV.1.2. Cellules 293T</b>	<b>114</b>
<b>IV.1.3. Cellules CRL1805</b>	<b>114</b>
<b>IV.1.4. Cellules HeLa229</b>	<b>114</b>

IV.1.5. Cellules K562 .....	115
IV.1.6. Cellules U937 .....	116
IV.1.7. Cellules HEL92.1.7 .....	116
IV.1.8. Cellules UT7.....	117
IV.1.9. Cellules HepG2 .....	117
IV.1.10. Efficacité de transfection.....	118
V. RECHERCHE DES SITES DE LIAISON DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION .....	118
VI. CR1 ET PALUDISME .....	118
VI.1. Echantillons d'ADN génomique.....	118
VI.2. Etude de la région SI <sup>a</sup> chez certains singes de l'ancien monde et certains singes du nouveau monde .....	119
VI.3. Etude de la région SI <sup>a</sup> chez des sujets humains de phénotype « Hegelson » .....	119
VI.4. Etude de la formation des rosettes entre érythrocytes de Macaque rhésus et érythrocytes humains infectés par <i>Plasmodium falciparum</i> .....	120
VI.4.1. Culture <i>in vitro</i> de la souche 89F5 var O de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	120
VI.4.2. Enrichissement en rosettes de la souche 89F5 Var O de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	120
VI.4.3. Marquage des globules rouges de Macaque rhésus avec du C-FDA (Carboxy-Fluoresceine Diacetate, Sigma) .....	120
VI.4.4. Rupture des rosettes constituées d'érythrocytes humains en présence d'érythrocytes de Macaque rhésus marqués avec du C-FDA.....	121
VII. ETUDE DU DEPOT DE C4d ERYTHROCYTAIRE (EC4d) CHEZ LES PATIENTS TRANSPLANTES RENAU.....	121
VII.1. Patients inclus dans l'étude.....	121
VII.2. Anatomopathologie : analyse en microscopie optique et microscopie à fluorescence .....	122
VII.3. Evaluation du dépôt de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires rénaux.....	122
VII.4. Evaluation du dépôt de C4d à la surface des érythrocytes (EC4d)....	123
VII.5. Evaluation du dépôt de C3b et d'immunoglobulines (Ig) à la surface des érythrocytes .....	123
VII.6. Détermination du seuil de positivité du marquage C4d érythrocytaire : définition du Ratio EC4d MFC % .....	124
VII.7. Dépôt artificiel de C4d érythrocytaire <i>in vitro</i> (TEDA).....	124
VII.8. Trypsination des érythrocytes .....	125
VII.9. Papaination des érythrocytes.....	125
<b>RESULTATS.....</b>	<b>127</b>
I. ETUDE DE LA STRUCTURE ET DE LA DISTRIBUTION DES ESPECES MOLECULAIRES CR1 ET CR1LIKE (CR1L) ERYTHROCYTAIRES CHEZ LE MACAQUE RHESUS ( <i>Macaca mulatta</i> ) .....	128
I.1. Déplétion des leucocytes .....	128
I.2. Etude du polymorphisme de longueur des espèces moléculaires CR1 et CR1like (CR1L) chez le Macaque rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ).....	129
I.2.1. Comparaison des espèces moléculaires de CR1 entre l'Homme et le Macaque rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ).....	129

I.2.2. Polymorphisme allotypique de CR1 de « type humain » chez le Macaque rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ).....	130
I.2.3. L'anticorps 3D9 ne détecte que le CR1 de « type humain » de Macaque rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ).....	132
I.3. Quantification des espèces moléculaires CR1 et CR1like (CR1L) chez le Macaque rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ).....	133
I.4. Etude du décapage des espèces moléculaires CR1 et CR1like (CR1L) à la surface des érythrocytes du Macaque rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ).....	135
I.5. Analyse de la distribution des espèces moléculaires de CR1 érythrocytaire .....	136
I.5.1. microscopie à fluorescence .....	137
I.5.2. microscopie confocale.....	138
II. RECHERCHE DES PROMOTEURS DES GENES CR1 ET CR1LIKE DU MACAQUE RHESUS ( <i>Macaca mulatta</i> ) .....	139
II.1. Southern blot.....	139
II.2. Détermination des séquences des promoteurs des gènes CR1 et CR1like (CR1L) de Macaque rhésus ( <i>Macaca mulatta</i> ) .....	141
II.2.1. Recherche des amorces spécifiques des régions promotrices des gènes CR1 et CR1like macaques.....	141
II.2.2. Analyse des séquences signal .....	142
II.2.3. Analyse des séquences nucléotidiques.....	144
II.2.4. Analyse <i>in silico</i> des sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription.....	149
II.2.5. Polymorphisme allélique de la région promotrice de CR1L humain.....	151
II.3. Activité des régions promotrices .....	151
III. CR1 ET PALUDISME.....	154
III.1. Recherche des polymorphismes allotypiques dans la région SI <sup>a</sup> du CR1 des primates de l'ancien monde et du nouveau monde.....	154
III.2. Etude de la formation des rosettes entre des érythrocytes humains infectés par la souche <i>P. falciparum</i> 89F5 Var O et des érythrocytes de Macaque rhésus sains .....	157
III.3. Phénotype Hegelson et antigènes de groupes sanguins de CR1(Knops) .....	159
IV. EC4d, HC4d ET REJET AIGU HUMORAL EN TRANSPLANTATION RENALE ...	160
IV.1. Observation du dépôt de C4d histologique (HC4d) en microscopie à fluorescence .....	160
IV.2. Dépôt de C4d érythrocytaire (EC4d).....	160
IV.2.1. Observations des dépôts de C4d, C3b et d'immunoglobulines en microscopie à fluorescence .....	160
IV.3. Dépôt de EC4d obtenu <i>in vitro</i> : TEDA .....	162
IV.3.1. Dépôt de C4d <i>in vitro</i> en fonction du taux d'immunoglobulines G sériques .....	162
IV.4. Evaluation par cytométrie de flux des dépôts de C3b et C4d à la surface des TEDA, des érythrocytes de sujets sains, des patients lupiques ou atteints d'anémie hémolytique autoimmune.....	163
IV.5. Distribution de CR1/E et dépôt de EC4d.....	165

IV.6. Comparaison par cytométrie de flux des dépôts de C4d à la surface des érythrocytes de sujets sains, de patients lupiques et de patients transplantés rénaux.....	167
IV.7. Valeurs de C4d érythrocytaire pour les trois populations étudiées : générale, transplantée et lupique .....	168
IV.8. EC4d, HC4d et Rejet Aigu Humoral .....	169
IV.8.1. Comparaison EC4d et HC4d.....	169
IV.8.2. EC4d et capillarite.....	171
IV.8.3. HC4d et capillarite .....	173
IV.8.4. EC4d et glomérulite (g).....	174
IV.8.5. HC4d et glomérulite (g).....	175
IV.8.6. EC4d et critères histologiques stringents de rejet aigu humoral .....	175
IV.8.7. Comparaison du EC4d dans les sous-groupes capillarite/glomérulite indépendamment du HC4d.....	178
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>181</b>
I. ETUDE DE LA DISTRIBUTION ET DE LA DENSITE DES 2 ESPECES MOLECULAIRES DE CR1 ERYTHROCYTAIRE DU MACAQUE RHESUS ( <i>Macaca mulatta</i> ) : CR1 DE « TYPE HUMAIN » ET CR1 DE « TYPE SINGE » OU CR1LIKE (CR1L) .....	182
II. ETUDE DE LA REGION SL <sup>A</sup> CHEZ CERTAINS SINGES DE L' ANCIEN MONDE ET CERTAINS SINGES DU NOUVEAU MONDE .....	186
III. ETUDE DE LA FORMATION DES ROSETTES ENTRE ERYTHROCYTES DE MACAQUE RHESUS ET ERYTHROCYTES HUMAINS INFECTES PAR <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> .....	186
IV. ANALYSE DES PROMOTEURS DES GENES CR1 ET CR1LIKE CHEZ L' HOMME ET LE MACAQUE RHESUS ( <i>Macaca mulatta</i> ).....	188
V. ETUDE DU DEPOT DE C4d ERYTHROCYTAIRE (EC4d) DANS LE REJET AIGU HUMORAL EN TRANSPLANTATION RENALE .....	192
V.1. EC4d et caractéristiques de la population de transplantés rénaux étudiée .....	192
V.2. EC4d, HC4d et rejet aigu humoral en transplantation rénale.....	193
V.2.1. Comparaison EC4d et HC4d.....	193
V.2.2. Analyse des cas discordants EC4d/HC4d.....	194
V.2.3. EC4d, nature de l'infiltrat cellulaire et perte de greffon.....	197
V.2.4. Limites et biais de cette étude.....	198
V.3. Physiopathologie du EC4d et du HC4d.....	199
V.3.1. C4d plasmatique et C4d érythrocytaire .....	199
V.3.2. Hypothèses physiopathologiques de dépôt de EC4d dans le RAH .....	199
V.3.3. Hypothèses physiopathologiques de dépôt de EC4d <i>in vitro</i> .....	200
V.4. Intérêt clinique potentiel du EC4d en transplantation.....	201
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>202</b>
<b>PUBLICATION .....</b>	<b>205</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>207</b>

# ABREVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- BR : Biopsie rénale
- C4bp : Protéine fixant le C4, « *C4 binding protein* »
- CAM : Complexe d'attaque membranaire
- CHO : Lignée cellulaire dérivant de cellule cancéreuse de hamster, « *Chinese Hamster Ovary* »
- CR1 : Récepteur pour le C3b/C4b, CD35
- CR1/E : Densité de CR1 par érythrocyte
- CR2 : Récepteur pour le C3d
- DAF : « *Decay accelerating factor* », CD55
- dNTP : Désoxynucléotide triphosphate
- DSA : *Donor specific antibody*= anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes du donneur
- EC4d : Dépôt de C4d érythrocytaire
- HC4d : dépôt de C4d histologique au niveau des capillaires péri-tubulaires rénaux
- EDTA : "*Ethylenediamine tetraacetic acid*" = Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
- EPO: Erythropoïétine
- FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
- FCS : Sérum de veau fœtal
- LED : Lupus érythémateux disséminé
- MBL : Lectine spécifique des résidus mannanes, « *Mannan Binding Lectin* »

MCP : « *Membrane Cofactor Protein* », CD46

MEM : Milieu essentiel minimum

PBS : "*Phosphate Buffer-Saline*" = Tampon phosphate salin

PCR : "*Polymerase Chain Reaction*" = Réaction de polymérisation en chaîne

PLC : Phospholipase C

PMSC : Phenyl methane sulfonyl chloride

PRA : Panel reactiv antibody

RAH : Rejet aigu humoral

RCA : « *regulator of complement activation* », Locus regroupant les gènes codant des régulateurs de l'activation du complément

rCR1s : CR1 soluble recombinant

SAB: Sérum albumine bovine

293T : Lignée cellulaire humaine embryonnaire de rein

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

VPP: Valeur prédictive positive

VPN : Valeur prédictive négative

# **INTRODUCTION**

Depuis de nombreuses années, notre laboratoire (Laboratoire d'Immunologie, EA 3798, Pôle Biomolécules, IFR 53, Université de Reims Champagne Ardennes) travaille dans le domaine du complément et étudie plus particulièrement un des récepteurs membranaires de ce système : le CR1 (CD35, récepteur pour le C3b/C4b). Cette molécule a plusieurs rôles : le contrôle de l'activation du complément, le transport des complexes immuns et il participe également à la réponse immunitaire humorale. La densité de cette molécule décroît à la surface des érythrocytes des patients atteints de pathologies à complexes immuns, ce qui provoque une mauvaise clairance de ces complexes par l'organisme, et leur dépôt dans les tissus où ils provoquent des lésions inflammatoires.

Notre laboratoire a participé à l'étude de la répartition cellulaire de CR1 [1,2], à l'étude des rapports entre l'expression de CR1 à la surface des érythrocytes (CR1/E) et les maladies à complexes immuns [3,4-6] et à la recherche des mécanismes physiologiques et pathologiques responsables de la diminution de la densité de CR1/E [7].

Les travaux proposés s'inscrivent dans la continuité de ceux préalablement publiés. Tout d'abord, nous avons : (i) étudié la structure et la distribution des espèces moléculaires CR1 et CR1like (CR1L) érythrocytaires chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*), (ii) isolé et analysé les régions promotrices des gènes CR1 et CR1like (CR1L) chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*), (iii) étudié les polymorphismes allotypiques de la région SI<sup>a</sup> de CR1 chez certains primates de l'ancien monde et primates du nouveau monde, (iiii) étudié la formation des rosettes entre érythrocytes de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) et érythrocytes humains infectés par *Plasmodium falciparum*.

Puis nous avons orienté notre travail vers la mise au point d'un nouvel outil diagnostique du rejet humoral de greffe. Nous avons voulu répondre à la question suivante : existe-t-il une relation entre le niveau de dépôt de fragments C4d à la surface des globules rouges (EC4d) et la survenue d'un rejet aigu médié par des anticorps en transplantation rénale ?

Pour répondre à cette question nous avons confronté le taux EC4d à l'analyse de plusieurs critères cliniques et histologiques auprès de 132 patients transplantés rénaux.

Le critère principal d'analyse a été la comparaison de l'immunomarquage C4d des capillaires péri-tubulaires sur la biopsie du greffon rénal et de l'immunomarquage C4d érythrocytaire concomitant.

Les critères d'analyse secondaires ont été la comparaison de l'immunomarquage C4d érythrocytaire aux signes classiques en histologie standard du rejet aigu (tubulite, infiltrat inflammatoire interstitiel, capillarite glomérulaire et/ou péri-tubulaire et artérite).

## I. Le complément

C'est en 1895 que Bordet qui travaillait alors dans le laboratoire de Metchnikoff à l'Institut Pasteur découvrit le complément qui peut être considéré maintenant comme un système de protéines plasmatiques et cyto-membranaires ayant trois fonctions principales: le marquage de certains micro-organismes et antigènes favorisant leur fixation à la surface des cellules porteuses de récepteurs membranaires du complément, l'attraction des phagocytes là où il y a activation du complément et la lyse des membranes cellulaires.

Le complément, système largement conservé au cours de l'évolution des espèces, doit son nom à sa découverte : il agit en complément des anticorps pour la lyse des bactéries. Composant plasmatique thermolabile de la réponse immunitaire naturelle, il est immédiatement mobilisable, et non spécifique d'un antigène donné. Cependant, il intervient dans l'initiation et la progression de la réponse immunitaire adaptative [8, 9].

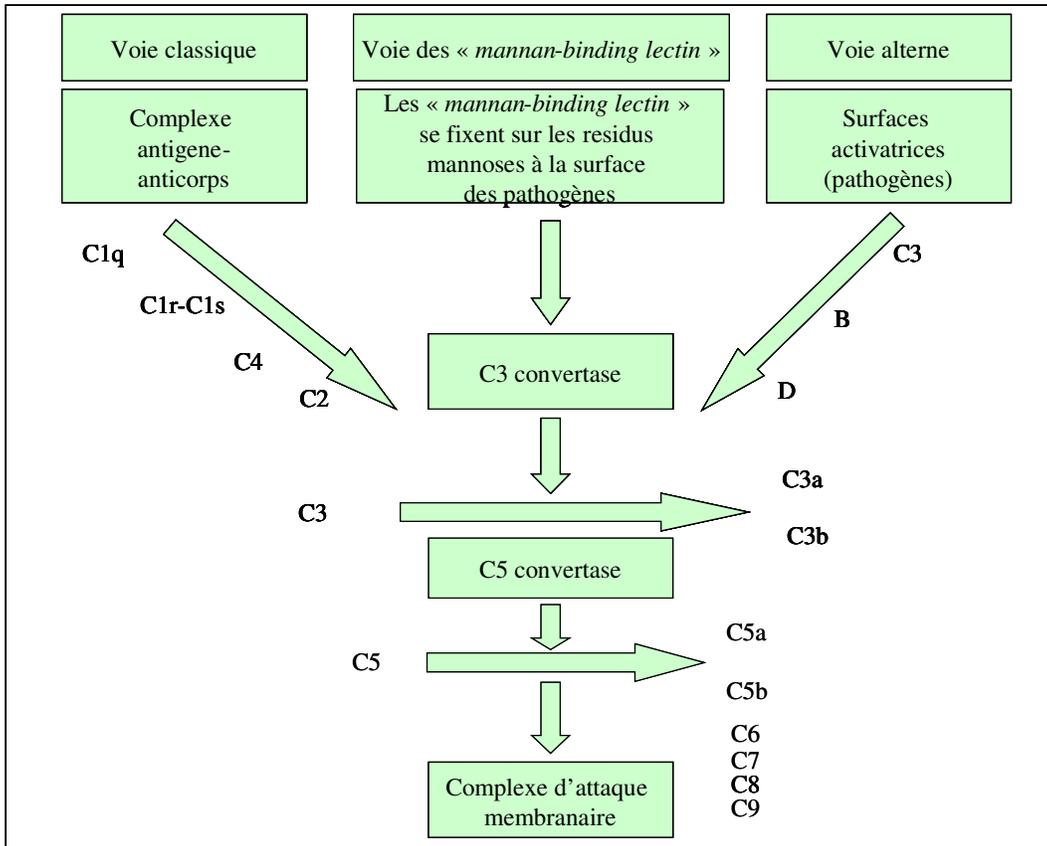
A ce jour on dénombre environ 35 protéines appartenant au système du complément. Ces protéines sont soit solubles, en majeure partie dans le plasma sanguin, soit associées aux membranes cellulaires. La vingtaine de protéines plasmatiques représente 4 à 5 % du total des protéines sériques. Elles sont retrouvées principalement dans la fraction globulinique qu'elles composent à hauteur de 15%, soit une concentration globale d'environ 3g/L de sérum.

L'activation des différents composants du complément se fait en cascade, de façon similaire à celle observée au cours de la coagulation ou de la fibrinolyse. Certains des composants doués d'activité enzymatique circulent sous une forme inactive n'acquérant leur activité protéolytique ou biologique qu'après protéolyse limitée, le substrat devenant l'activateur de la protéine suivante dans la cascade d'activation. Chaque enzyme peut activer de nombreuses molécules du précurseur suivant (de 6 à 1200), chaque étape est donc amplifiée. Outre cette amplification en cascade, la conséquence de l'activation est donc l'apparition de différents produits de clivage biologiquement actifs capables d'interagir avec de nombreux types cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Ainsi par exemple C5a, C3a et C4a ont une activité anaphylatoxinique *via* leur récepteur situé sur les monocytes-macrophages, les mastocytes et les polynucléaires

[10-12].

A coté des molécules directement impliquées dans les fonctions précédemment décrites, existent d'autres protéines qui régulent l'activité du complément et empêchent son activation contre le « soi ».

L'activation du complément peut se faire par trois voies différentes : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (voir Figure 1, page 13). La première nécessite une reconnaissance spécifique préalable d'un antigène par un anticorps, les deux autres sont activées directement par les membranes des pathogènes.



**Figure 1 : Les trois voies d'activation du complément. D'après Taylor R.P. et al. 1988 [136].**

## I.1. Nomenclature

Des raisons historiques ont rendu complexe la terminologie employée dans le domaine du complément. Les différentes protéines solubles du complément sont désignées par la lettre C suivie d'un chiffre. Ce chiffre n'indique pas forcément l'ordre d'intervention d'une molécule dans la voie d'activation, mais plutôt la date de sa découverte. Ainsi le C4 intervient avant le C2, qui intervient avant le C3.

Lorsqu'une protéine du complément est clivée, le plus petit fragment issu de cette coupure est désigné par un «a» et le plus gros par un «b». C'est ainsi que le clivage du C3 conduit à la production de C3a et de C3b. Mais historiquement les fragments issus du C2 sont dénommés C2b pour le plus petit et C2a pour le plus gros. C'est heureusement la seule exception à cette règle.

Un trait horizontal placé au-dessus du nom indique qu'une de ces protéines possède une activité enzymatique. Par exemple, la C3 convertase de la voie classique est la  $\overline{C4b2a}$ .

Les récepteurs des différentes molécules du complément sont désignés par les lettres CR (*complement receptor*) suivies d'un chiffre. On trouve d'autres nomenclatures, comme le système des classes de différenciations (ou CD) et la désignation suivant la nature du ligand.

Effet	Protéine du complément	Récepteur du complément
Opsonisation entraînant la phagocytose	C3b, iC3b	CR1, CR3
	C4b	CR1
	C1q, MBL	Récepteur de C1q, CR1
Peptides médiateurs de l'inflammation	C5a	Récepteur de C5a
	C3a	Récepteur de C3a
Complexe d'attaque membranaire	C5b, C6, C7, C8, C9	
Opsonisation et clairance des complexes immuns	C1q	Récepteur de C1q, CR1
	C3b, iC3b	CR1, CR3
	C3b, iC3b, C3dg	CR1
Fixation des complexes immuns par les cellules présentatrices des antigènes	C3b, iC3b, C3dg	CR1, CR2, CR3
Activation des lymphocytes B	C3dg	CR2

**Tableau 1 : Les molécules du complément. D'après Taylor R.P. *et al.* 1992 [213].**

Par exemple CR1 est CD35 et est aussi le récepteur de C3b/C4b. Dans tous les paragraphes de ce document, seuls les noms commençant par CR seront utilisés.

## I.2. Le C3

Le C3 est une molécule fortement présente dans le plasma (1g/L). La synthèse est principalement d'origine hépatique. C'est aussi le constituant le plus important du complément, son clivage en deux fragments est le mécanisme central des trois voies du complément. Le C3 contient une liaison thioester formée par un acide glutamique et une cystéine. Cette liaison covalente est sensible à une hydrolyse lente. Le groupement obtenu, nommé C3i, est ensuite capable de se lier aux fonctions hydroxyles et amines présentes à la surface des protéines et des sucres (voir Figure 2, page 16). Il y a donc toujours dans le plasma un taux basal de C3i. Dans des conditions physiologiques, cette activation n'a pas de conséquence car le C3i interagit avec l'eau ou est régulé par différents inhibiteurs de l'activation du complément.

Le clivage de C3, par une enzyme nommée C3 convertase, conduit à la production de C3b. La liaison thioester de cette molécule étant fortement instable, le C3b se lie rapidement aux molécules environnantes. Si cette activation n'est pas inhibée, la cascade du complément s'amplifie. Il existe trois voies différentes conduisant au clivage du C3, ces voies sont décrites dans les chapitres suivants.

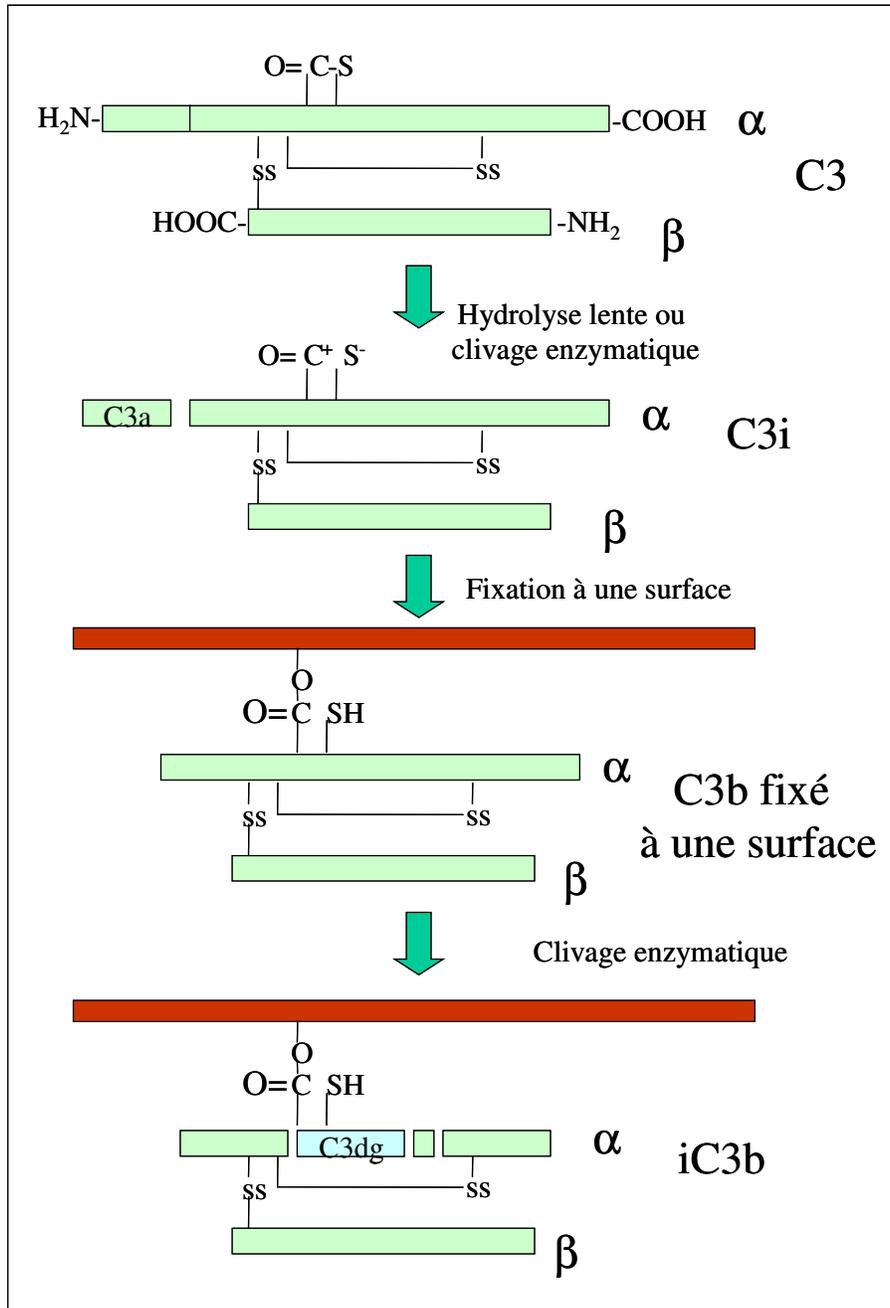


Figure 2 : Activation et clivage du C3

### **I.3. Le C4**

#### **I.3.1. Génétique du C4**

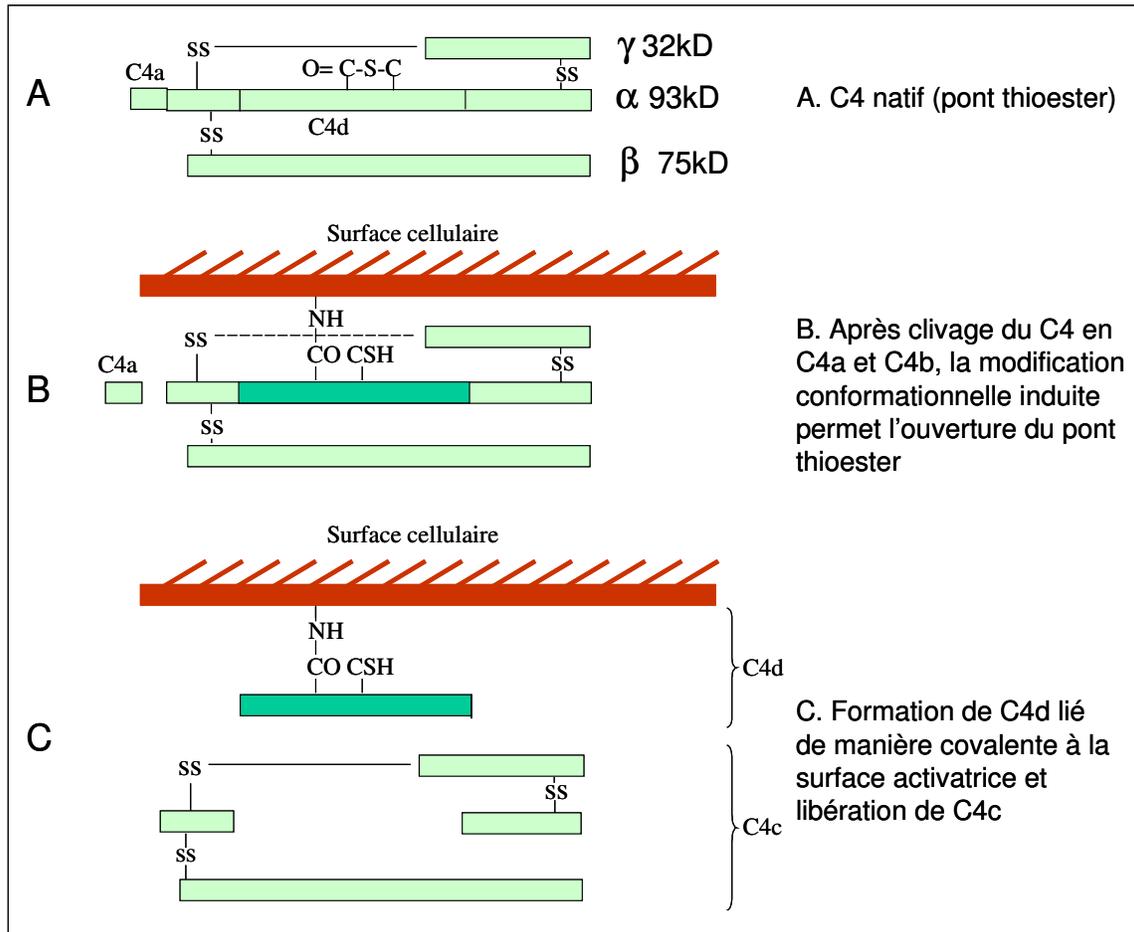
Le C4 est codé par deux loci étroitement liés C4A et C4B situés sur le chromosome 6 dans la région codant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe environ 35 allèles décrits pour les deux loci dont les produits n'ont pas la même réactivité. La migration électrophorétique des produits du locus C4A est plus rapide mais l'activité fonctionnelle, hémolytique, de ceux du locus C4B est environ quatre fois supérieure.

Bien que le déficit total en C4 soit extrêmement rare la fréquence des allèles nuls (notés QO) à chaque locus (C4A QO : 5 - 15 % ; C4B QO : 10 - 20 %) explique l'importance relative des déficits partiels. L'allèle C4A QO est plus fréquemment retrouvé chez les patients lupiques.

#### **I.3.2. Structure du C4**

Il s'agit d'une protéine de 200 kDa constituée de trois chaînes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ).

Chez l'Homme sa concentration sérique est de 200 à 600 mg/L. La synthèse est principalement d'origine hépatique (95%) et accessoirement macrophagique. Le C4 peut être activé par le complexe C1q,r,s (voie classique) et par le complexe MBL-MASPI et 2 (voie des lectines).



**Figure 3 : Activation et clivage du C4 d'après Atkinson JP, 1988 [13].**

### I.3.3. La fraction C4d

Le C4d est le produit du clivage de C4b (Figure 3, page 18). Le C4d est une protéine constituée de 380 AA d'un poids moléculaire de 42 kDa. Cette fraction C4d porte la plupart des polymorphismes de C4A et C4B [13]. Elle se fixe de manière covalente à son site de fixation par l'intermédiaire d'un pont thio-ester pour une période prolongée de plusieurs jours à plusieurs mois [14]. A ce jour il n'y pas de récepteur connu du C4d.

### I.3.4. Le C4d érythrocytaire (EC4d)

On peut détecter du C4d à la surface des globules rouges chez tous les mammifères, de manière totalement physiologique, à un niveau donné [15].

Historiquement, le C4d érythrocytaire correspondait en fait à des antigènes érythrocytaires responsables d'accidents transfusionnels. Ces antigènes découverts par Chido et Rodgers, ont d'abord été rapportés comme génétiquement liés au système du Complexe Majeur d'Histocompatibilité. Puis il a été montré que le polymorphisme Chido et Rodgers était lié au polymorphisme électrophorétique du C4. En 1978, ce polymorphisme est lié de manière formelle à la molécule de C4 et plus précisément sa fraction C4d [16].

Finalement, on détectait ces antigènes à la surface des érythrocytes sans vraiment savoir qu'il s'agissait de molécules de C4d. Ce C4d est polymorphe et peut être responsable d'immunisation et d'accidents transfusionnels chez des patients polytransfusés. Par la suite, la caractérisation exacte de cette relation phénotype – génotype a été établie. Il est prouvé que l'antigène Chido est associé au C4B et l'antigène Rodgers au C4A [17].

L'origine même de la présence de ce C4d à la surface érythrocytaire n'est pas connue, des hypothèses ont été évoquées sans preuve formelle. Une de ces hypothèses est qu'à l'instar du C3d, la molécule de C4 s'autoactiverait à minima comme une veilleuse prête à s'illuminer en cas de nécessité, il s'agit du phénomène d'un système tournant au ralenti décrit sous le terme « *tick over* » par les anglo-saxons [13].

La détection du C4d érythrocytaire a pu être réalisée par cytométrie de flux chez des sujets sains de manière reproductible à partir du début des années 90 [18]. Le niveau de EC4d est augmenté dans différentes pathologies faisant intervenir à un moment ou un autre des complexes immuns circulants : anémie hémolytique auto-immune, thrombopénie auto-immune [19] et réactions immuno-allergiques [20].

Récemment, l'équipe de JM Ahearn à Pittsburgh en recherchant le C4d à la surface des érythrocytes de patients atteints de LED, de sujets sains et des patients présentant un tableau clinique proche d'un LED, a pu démontrer que le EC4d est plus élevé dans la maladie lupique et qu'il peut constituer un marqueur sensible et spécifique de la maladie [21,22].

Cette même équipe a par ailleurs proposé la détection non plus du EC4d mais du C4d à la surface des réticulocytes, cellules plus jeunes qui seraient d'un plus grand intérêt pour le suivi de la cinétique des poussées de la maladie lupique [23].

### I.3.5. Le C4d histologique (HC4d) dans le rein

Dans le rein normal, le C4d peut être détecté dans le mésangium et au pôle vasculaire du glomérule, ainsi que dans les artérioles et les artères du parenchyme cortical. Ces dépôts «normaux » de C4d reflètent possiblement un processus physiologique, telle une dégradation de complexes immuns formés à bas bruit ou éventuellement un remaniement physiologique des parois vasculaires.

Dans le rejet humoral d'un greffon rénal, les dépôts de C4d se localisent en plus, et de façon spécifique, dans les capillaires péri-tubulaires interstitiels du cortex au niveau des cellules endothéliales et/ ou des membranes basales de ces capillaires [24-26,27]. Le marquage C4d des capillaires péri-tubulaires peut être diffus (chaque capillaire péri-tubulaire est marqué) ou focal (quelques capillaires péri-tubulaires seulement sont marqués), reflétant possiblement la dynamique du processus pathologique [28]. Ainsi, un marquage focal peut indiquer un état transitionnel, tels les stades précoces d'un rejet humoral, avec « diffusion » ultérieure, ou tardifs, avec disparition partielle du C4d, [27,29]. La signification clinique des dépôts focaux de C4d reste cependant actuellement controversée, certains auteurs considérant ce marquage comme significatif [25, 29-31], d'autres estimant que seul un marquage diffus des capillaires péri-tubulaires pose le diagnostic définitif d'un rejet humoral [32].

Haas *et al.* [33] ont démontré que les dépôts de C4d peuvent être détectés dans les capillaires péri-tubulaires dans l'heure qui suit la transplantation et, dans cette situation, sont associés à la présence d'anticorps anti-donneurs, même à des taux peu élevés avant la transplantation (*cross-match* discrètement positif). Nickleit *et al.* [29] ont montré, en analysant des biopsies successives prélevées dans un contexte de dysfonction précoce du greffon, que les biopsies C4d négatives pouvaient se positiver en 4 jours seulement, et, à l'inverse, que les biopsies C4d positives pouvaient se négativer en 8 jours déjà. Ces données indiquent d'une part qu'une activation *de novo* de la voie classique du complément peut survenir rapidement après la transplantation, et donnent d'autre part des informations sur la demi-vie des dépôts de C4d *in situ* au niveau des capillaires rénaux.

Une définition précise des critères de positivité du C4d a été proposée lors de la réunion à Banff en 2001 sur la pathologie du transplant rénal (« *2001 Banff Meeting on Renal Allograft Pathology* ») [34] : en particulier, seul le marquage C4d des capillaires péri-tubulaires est considéré comme significatif, et non le marquage des capillaires glomérulaires, des artérioles et des artères. De même, un marquage C4d positif est défini comme « un marquage linéaire et

contrasté des membranes basales des capillaires péri-tubulaires concernant plus de la moitié des capillaires échantillonnés » [34].

#### **I.4. La voie classique d'activation du complément.**

Cette voie est appelée classique car elle a été découverte la première. Le mécanisme déclencheur de cette cascade est la liaison de l'anticorps à l'antigène. Les anticorps de types IgG ou IgM peuvent fixer sur leur région Fc une molécule de C1. Ce complexe protéique C1 est composé d'une molécule de C1q, de deux molécules de C1r et de deux molécules de C1s. Une fois fixées aux anticorps, les molécules de C1r s'activent et clivent les deux molécules de C1s. C1s est une sérine estérase capable de cliver le C4 dont la fraction C4b va se fixer à la surface du complexe immun. C2 se fixe ensuite au C4b et est aussi clivé par C1s. Le complexe formé, nommé  $\overline{\text{C4b2a}}$  est la C3 convertase de la voie classique. Cette enzyme va cliver C3, dont la fraction C3b se fixe sur la surface activatrice. Cette voie est régulée par l'inhibiteur de la C1 estérase (C1inh) qui inactive C1r et C1s en s'y liant. Une régulation se fait également au niveau de la C3 convertase, qui peut être inactivée par des protéines plasmatiques telles que le facteur I et la C4bp (C4 binding protein), mais aussi par des protéines membranaires comme DAF (*Decay Accelerating Factor*, CD55), le CR1 ou MCP (*Membrane Cofactor Protein*, CD46). Ces inhibiteurs peuvent empêcher la fixation de C2 à C4b (CR1 et DAF), dissocier la C3 convertase (DAF et CR1) ou augmenter le clivage de C4b par le facteur I (MCP, CR1 et C4bp) (Figure 4, page 22).

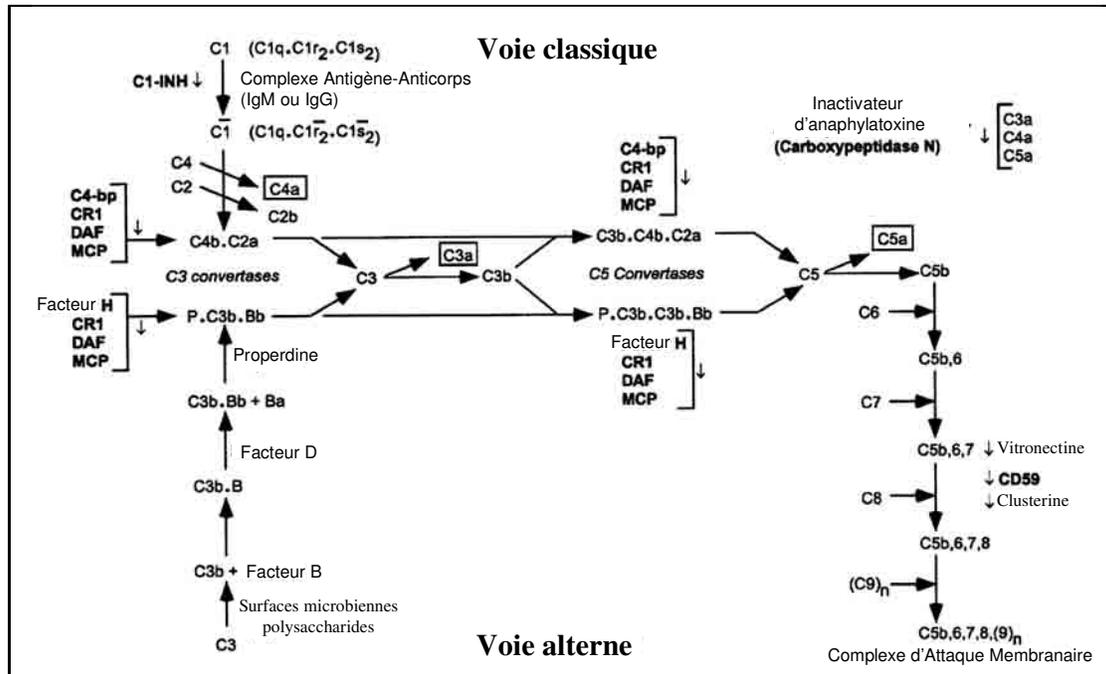


Figure 4 : Le système du complément et ses régulateurs. D'après Makrides C. 1998 [35].

### I.5. La voie alterne

Il existe toujours dans l'organisme un taux faible de C3i. Cette molécule est capable de se fixer sur toutes les surfaces cellulaires. Les cellules autologues expriment des inhibiteurs de l'activation du complément (CR1 et MCP) qui les protègent. A leur surface le C3b est dégradé par le facteur I et le facteur H.

Par contre à la surface des pathogènes, le C3b peut fixer le facteur B. Ce complexe est le substrat du facteur D qui clive le facteur B. Le C3bBb obtenu est la C3 convertase de la voie alterne, elle clive le C3 en C3b qui vient se fixer à la surface du pathogène (voir Figures 4, 5 pages 22 et 23).

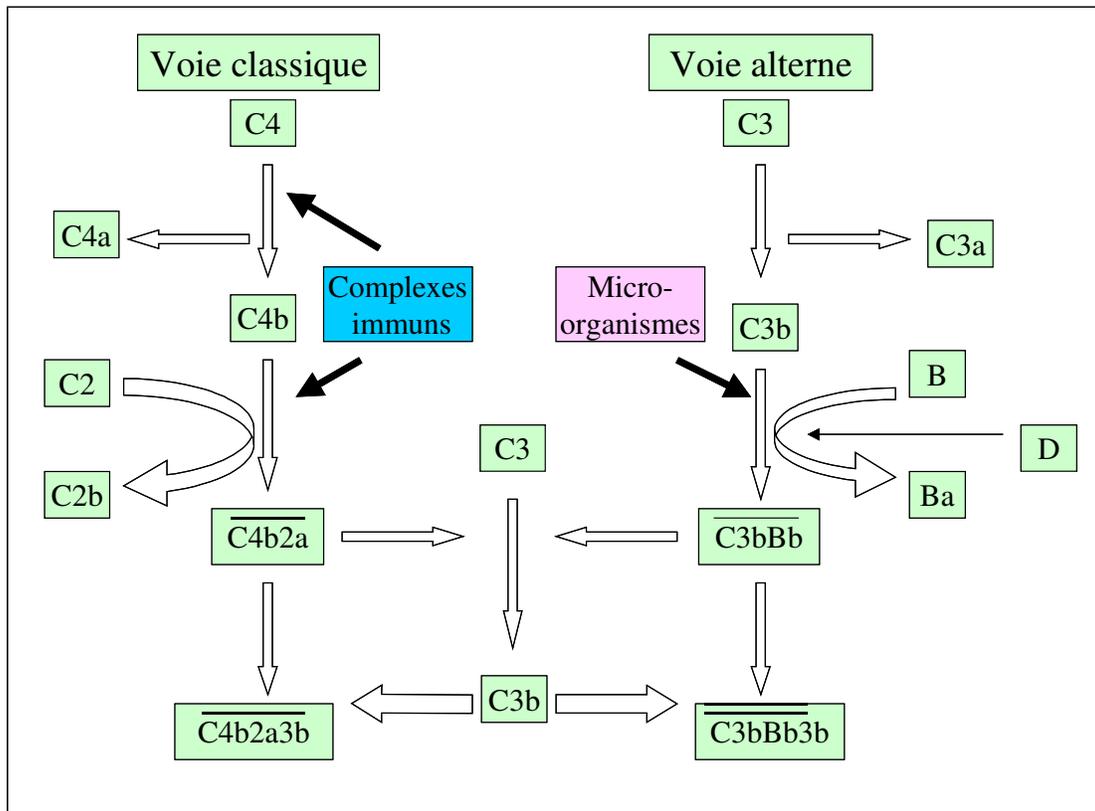


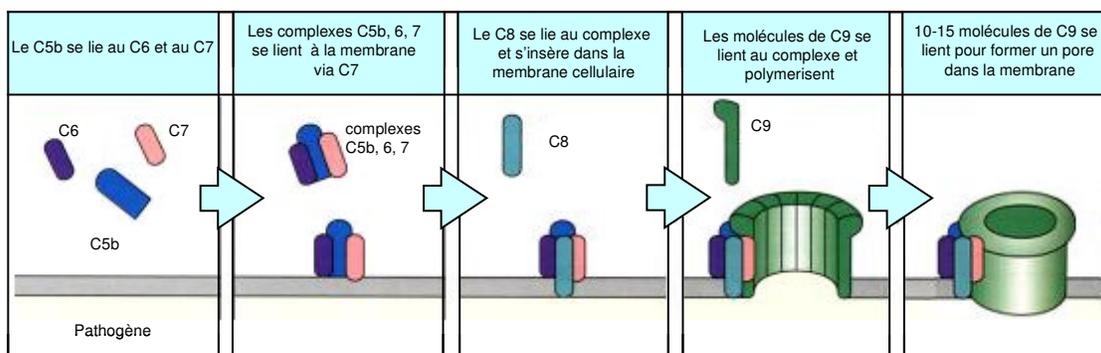
Figure 5 : Voie alterne et voie classique du complément. D'après Roitt I.M. *et al.* 1998.

## I.6. Voie des lectines

Cette voie fut la dernière découverte, la principale protéine impliquée est la MBL (*Mannan Binding Lectin*). MBL a une structure proche de C1q. Elle possède des fonctions lectines, c'est à dire qu'elle est capable de fixer au niveau de ses têtes globulaires les résidus carbohydrates présents notamment à la surface de certains micro-organismes. La fixation est forcément multivalente car l'affinité individuelle de chaque site est très faible. La fixation de MBL à une surface entraîne l'activation de deux sérines protéases MASP-1 et MASP-2 (*MBL-associated serine-protease*), de structures proches de celles de C1r et C1s. MASP-2 clive C4 en C4a et C4b, le reste de la cascade est identique à celle de la voie classique du complément.

## I.7. Complexe d'attaque membranaire

La formation du complexe d'attaque membranaire (CAM ou C5b-9) est la dernière étape de l'activation du complément. Les C3 convertases de la voie classique et de la voie alterne peuvent fixer le C3b et devenir ainsi des C5 convertases ( $\overline{C4b2a3b}$  pour la voie classique et  $\overline{C3bBb3b}$  pour la voie alterne). Ces complexes fixent et clivent C5. Le reste de la formation du CAM n'implique plus aucun clivage, mais la fixation successive de molécules : C6, C7, C8 et C9. Le complexe formé par C5b, C6 et C7 est hydrophobe et s'insère dans la bicouche lipidique de la membrane. C8 et C9 viennent alors s'insérer séquentiellement. Plusieurs molécules de C9 polymérisent et forment un pore dans la membrane. Ce pore provoque la lyse du pathogène (voir Figure 6, page 24)



**Figure 6 : Formation du complexe d'attaque membranaire. D'après Roitt I.M. et al. 1998.**

Ce processus, une fois engagé, n'est pas irréversible. La vitronectine (ou protéine S) peut lier C5b67 et empêcher l'insertion de ce complexe dans les membranes. L'apolipoprotéine J ou clusterine se lie au CAM et empêche son insertion membranaire. CD59 (ou MIRL, *Membran Inhibitor of Reactive Lysis*, HRF20) est une protéine membranaire qui empêche l'insertion du C9. Cette protéine est surtout présente à la surface des érythrocytes, des leucocytes et des cellules endothéliales et inhibent l'activité du plasma autologue. Les cellules nucléées peuvent éliminer CAM par endocytose et exocytose alors que les érythrocytes peuvent éliminer CAM uniquement par exocytose (voir XI.1).

## I.8. Opsonisation et phagocytose

Les micro-organismes ou les complexes immuns opsonisés sont fixés par les cellules de la lignée monocyttaire *via* les différents récepteurs du complément. Ce sont ces récepteurs qui

sont aussi responsables de l'adhésion des complexes immuns opsonisés à la surface des érythrocytes et à leur transport vers les phagocytes du foie. Ces différents points seront approfondis dans d'autres parties de l'introduction (voir IV.2).

## **I.9. Complément et inflammation**

L'activation des différentes voies du complément libère C3a et C5a dans le plasma. Ces deux molécules, appelées anaphylatoxines, activent et stimulent le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et induisent la dégranulation des basophiles et des mastocytes. Les anaphylatoxines augmentent également la contraction des muscles lisses et la perméabilité vasculaire ce qui permet une meilleure migration des neutrophiles sur les lieux de l'inflammation.

Le dysfonctionnement des voies du complément est aussi la cause de nombreuses pathologies, il serait impossible ici de les décrire toutes. Certaines de ces pathologies seront plus précisément évoquées dans les chapitres suivants.

## **I.10. Complément et ischémie-reperfusion du greffon**

### **I.10.1. Voies d'activation du complément**

L'intervention des trois voies d'activation du complément a été mise en évidence dans les lésions déclenchées par le phénomène d'ischémie-reperfusion post-greffe.

Il existe chez tout receveur des anticorps dits naturels, qui reconnaissent des antigènes exprimés à la surface des cellules du donneur suite à l'ischémie. Cette activation de la voie classique a été décrite dans des modèles expérimentaux d'allogreffes cardiaques, pulmonaires et intestinales [12]. Les débris des membranes mitochondriales libérées après la lyse cellulaire peuvent également activer la voie classique du complément.

En transplantation rénale, l'activation de la voie classique semble moins impliquée puisque les lésions liées à l'ischémie-reperfusion sont retrouvées en cas de déplétion en immunoglobulines ou même en C4 [36,37]. La voie d'activation majoritaire semble être la voie alterne [38]. En effet, la souris déficiente en facteur B du complément est résistante aux lésions induites après ischémie-reperfusion rénale. Les segments distaux des tubes proximaux les plus sensibles à l'ischémie sont riches en enzymes protéolytiques et peuvent sécréter des protéines du complément notamment le composant C3 [36] ; cela explique peut-être pourquoi la voie alterne est préférentiellement activée dans le rein.

Enfin le rôle de la voie des lectines a été mis en évidence dans les lésions après ischémie-reperfusion cardiaque : un prétraitement par anticorps monoclonal anti-MBL réduit de moitié la taille de l'infarctus myocardique dans un modèle chez le rat [39].

### **I.10.2. Voie terminale effectrice et ischémie-reperfusion**

Dans plusieurs modèles animaux, le rôle nocif des produits de la voie terminale commune du complément a été mis en évidence.

La production de C3a et de C5a entraîne la libération de médiateurs chimiotactiques et d'histamine. Ces anaphylatoxines agissent également en activant les leucocytes et en engageant la différenciation des précurseurs myéloïdes.

Le complexe d'attaque membranaire remplit sa fonction naturelle de cytotoxicité directe. Les souris déficientes en C6 (alors incapables de constituer le complexe CAM), ainsi que les souris déficientes en C3 (qui ont en plus des précédentes une incapacité à produire du C3a, du C3b ou du C5a), présentent de manière similaire peu de lésions rénales après ischémie-reperfusion [37]. Cette sensibilité plus particulièrement rénale à la voie terminale du complément, après ischémie-reperfusion, est probablement liée au fait que les cellules mésangiales et épithéliales tubulaires font partie des rares cellules viscérales exprimant de manière constitutive le récepteur du C5a.

### **I.10.3. Complément, anticorps et rejet aigu en transplantation rénale**

Dans l'histoire de l'allogreffe, le caractère péjoratif de la présence d'anticorps dirigés contre le donneur a été identifié il y a près de 40 ans [40,41]. Ce n'est que récemment que l'entité rejet aigu humoral est communément admise et incluse dans la classification de Banff.

Comme tout diagnostic il repose sur un faisceau d'arguments. Cliniquement peu de signes sont retrouvés, et cela de manière peu fréquente: fièvre, oligurie ou anurie avec pour corollaire une surcharge hydrosodée, exceptionnellement le greffon est augmenté de volume et douloureux [42,43]

Biologiquement l'insuffisance rénale est majeure, des signes d'hémolyse mécanique témoins d'une microangiopathie thrombotique intra-greffon peuvent être retrouvés associés dans les formes les plus sévères à une coagulopathie de consommation. En fait, ces tableaux

caricaturaux et extrêmes sont devenus rares grâce à une meilleure détection des anticorps anti-HLA (*Human leukocyte antigen*) et à la pratique du *cross-match*.

Les critères diagnostiques d'un rejet aigu humoral du greffon rénal incluent selon un consensus international [44] des signes :

Morphologiques en histologie standard : Lésions tubulaires aiguës, cellules inflammatoires dans les capillaires péri-tubulaires (capillarite) ou capillaires glomérulaires (glomérulite), thromboses des capillaires, artérite intinale, nécrose fibrinoïde ou inflammation transmurale des artères [45-47].

Immunopathologiques reposant sur la détection de C4d de manière diffuse au niveau des capillaires péri-tubulaires, parfois associé à des immunoglobulines ou d'autres fragments du complément [48,49]. Le marquage des capillaires glomérulaires, des artères ou des artérioles n'est lui pas significatif.

Sérologiques : présence d'anticorps circulants spécifiquement dirigés contre des antigènes portés par le donneur. Ces anticorps pouvant être dirigés contre les antigènes majeurs d'histocompatibilité (HLA de Classe I ou II) ou non [50,51].

Il est clairement montré que la survenue d'un rejet aigu humoral abouti à une diminution de la survie du greffon voire à une perte du greffon dans les cas extrêmes [49,51].

## **II. Le CR1**

### **II.1. Historique**

Les fonctions des récepteurs du complément ont été observées pour la première fois dans les années 30 grâce aux réactions d'adhésions : les globules rouges de primates fixaient les trypanosomes opsonisés par le complément [52]. Les études suivantes montrèrent que ces réactions étaient dépendantes du complément et pouvaient nécessiter la présence d'anticorps spécifiques. Mais il faudra attendre la fin des années 1970 pour que ces récepteurs soient isolés et pour que les premières études sur les implications biologiques de ces phénomènes soient effectuées.

CR1 a été isolé en 1979, de la membrane des érythrocytes, par l'équipe de Fearon [53]. Cette glycoprotéine d'un poids d'environ 200 kDa est le récepteur de C3b et secondairement de C4b.

## II.2. Répartition Cellulaire

CR1 est présent à la surface de nombreux types cellulaires : les érythrocytes [53], les lymphocytes B [54], les cellules de la lignée monocyttaire, certains lymphocytes T, les cellules dendritiques folliculaires [1], les astrocytes fœtaux [55] et les podocytes glomérulaires.

Une population restreinte (25%) de thymocytes expriment CR1 [56]. Ce pourcentage est supérieur à celui rencontré chez les lymphocytes T périphériques, qui n'est que de 8% [57] à 15% [58] selon les auteurs. L'expression de CR1 est associée à l'expression de CR2 (le récepteur de C3d et C3dg). Pour certains auteurs, l'expression de CR1 est restreinte à la population de lymphocytes T exprimant CD4 [2], pour d'autres l'expression de CR1 serait seulement plus importante dans la population CD4 positive que dans la population CD8 positive [57]. Les lymphocytes T exprimant CR1 sont un groupe morphologiquement homogène, ils ont un noyau large et plus de granules [57]. Il pourrait donc s'agir d'une population de lymphocytes récemment stimulés, ce qui expliquerait l'augmentation du nombre de lymphocytes T exprimant le CR1 après stimulation par les cytokines [2]. Les cellules endothéliales de la veine ombilicale cultivées *in vitro* expriment CR1 [59].

## II.3. Structure protéique

CR1 est une glycoprotéine membranaire de haut poids moléculaire. L'analyse d'extraits membranaires d'érythrocytes par PAGE-SDS, montre un polymorphisme allotypique de taille. Quatre formes différentes de CR1, de poids moléculaire 160, 190, 220 et 250 kDa ont été jusqu'à présent isolées [53,60]. Ce polymorphisme est héréditaire, autosomique et co-dominant. La nomenclature désignant ces différentes molécules a varié au fil des années. Les deux formes les plus communes ont d'abord été nommées F (*Fast*) et S (*Slow*) (190 kDa et 220 kDa respectivement) d'après la rapidité de leur migration électrophorétique [61]. L'allotype de 160 kDa découvert ensuite a pris le nom de F' [62]. Lors de l'isolement d'un quatrième allotype la nomenclature a changé, pour devenir A, B, C et D (190 kDa, 220 kDa, 160 kDa et 250 kDa respectivement). L'ordre de ces différentes lettres est en accord avec la fréquence de chacun des allotypes. Malheureusement, hors des équipes spécialisées dans le CR1 (et même parfois à l'intérieur de ces équipes), les erreurs sont courantes. Notamment de nombreuses personnes utilisent les lettres A, B, C et D pour désigner les molécules en fonction de leur taille (A étant la plus grande et D la plus petite). C'est pourquoi, lors de la dernière réunion des laboratoires travaillant sur le CR1, une nouvelle nomenclature a été

établie (voir Tableau 2, page 29), les allèles s'appelant officiellement CR1\*1, CR1\*2, CR1\*3 et CR1\*4.

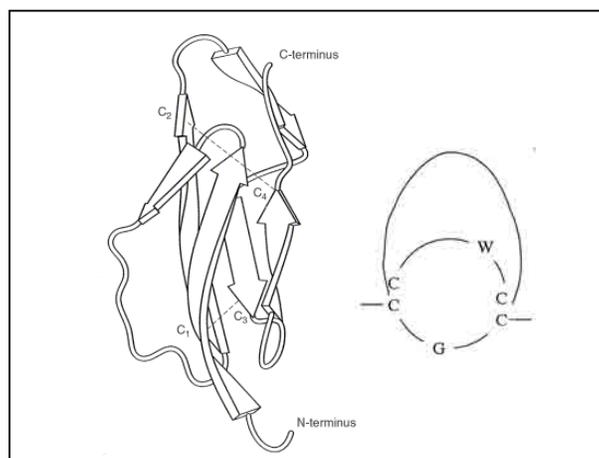
Des différences dans la glycosylation des allotypes ne sont pas responsables de la diversité observée. Tous les allotypes ont des formes non-glycosylées de poids moléculaires inférieures de 25 kDa à la forme physiologique normale. La N-glycosylation est nécessaire à l'insertion de CR1 dans la membrane et à son activité biologique. Par contre le CR1 n'est pas O-glycosylé. Il existe également un écart de 5 kDa, due à une N-glycosylation différente, entre le CR1 exprimé à la surface des érythrocytes et celui exprimé à la surface des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes T [63].

Allotypes	Nouvelle nomenclature	Poids moléculaire réduit / non réduit (kDa)	Fréquence Allélique
D	CR1*4	320/250	Proche de 0,01
B/S	CR1*2	290/220	0,16
A/F	CR1*1	250/190	0,83
C/F'	CR1*3	210/160	Proche de 0,01

**Tableau 2 : Nomenclatures utilisées pour les différents allotypes de CR1.**

La différence entre les allotypes de CR1 se situe donc au niveau du polypeptide. Les études menées à partir de la séquence de l'ADNc codant pour la forme la plus fréquente de CR1, montrent que la protéine est constituée de 30 structures répétitives appelées SCR (*Short Consensus Repeat*) ou CCP (*Complement Control Protein*) [64] (voir Figure 7, page 30). Cette structure est courante dans la famille des récepteurs du complément. On la retrouve dans CR2, CR3, C4bp et le facteur H.

Il existe 11 sous familles de SCR désignées *a, b, c, d, e, f, g, h, i, j* ou *k* définies par McLure *et al.* [65].

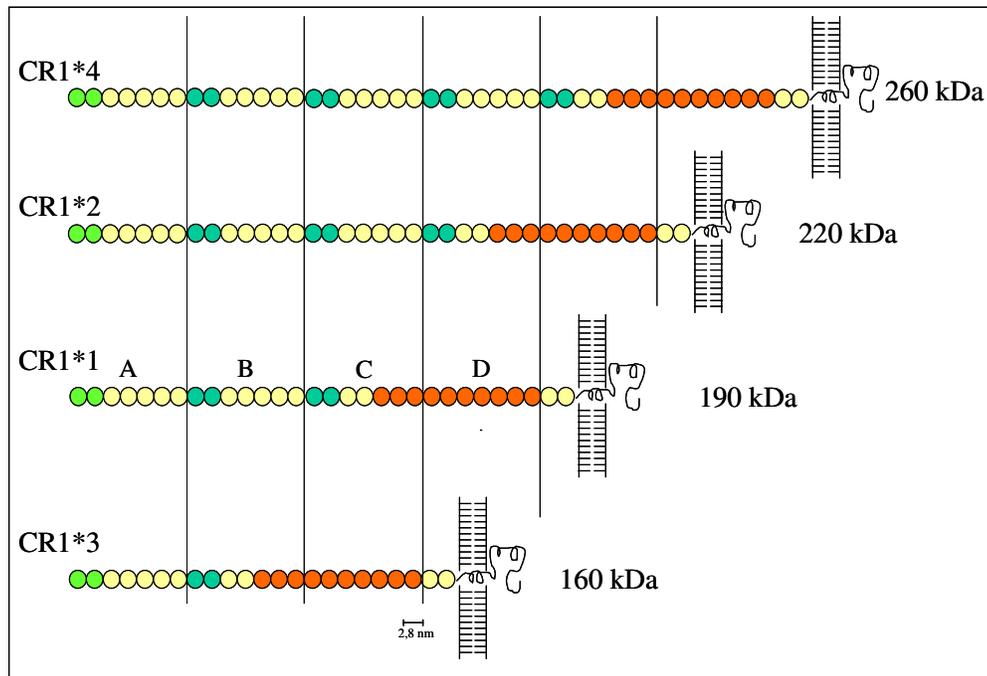


**Figure 7 : Représentation schématique de la structure d'un SCR. D'après Bartow N.P. *et al.* 1991 [66] et Krych-Goldberg *et al.* 2002 [267].**

Ces SCR sont regroupés en une structure répétitive d'ordre supérieure nommée LHR (*Long Homologous Repeat*). Chaque LHR contient 7 SCR, les LHR sont nommés A, B, C, D (de la région N-terminale vers la région C-terminale) du milieu extracellulaire vers la membrane cytoplasmique[64].

Les allotypes diffèrent par le nombre de LHR qui les composent, on en compte quatre pour la forme CR1\*1, six pour le CR1\*4, trois pour le CR1\*3 et cinq pour le CR1\*2 [67,68] (Figure 8, page 31).

Ainsi CR1\*2 peut être écrit  $(ajefbkd)_5ch$  correspondant aux 37 SCR repartis en 5 LHR de 7 SCR plus la partie *ch* servant d'attache à la membrane.



**Figure 8 : Représentations schématiques des allotypes de CR1. Les structures homologues sont coloriées de façon identique. D'après Wong W.W. 1989 [76].**

La fréquence des allèles diffère suivant l'origine des populations, mais l'allèle CR1\*1 reste largement majoritaire et l'allèle CR1\*4 marginal (voir Tableau 3, page 31).

Origine géographique	N=	CR1 *1	CR1 *2	CR1 *3	CR1 *4
Afro-américains	715	0,83	0,13	0,03	0,003
Maliens	87	0,79	0,14	0,05	0,020
Caucasiens (USA)	426	0,86	0,11	0,01	0,002
Chinois/Taiwanais	112	0,95	0,04	0,01	0
Français	106	0,87	0,13	0,01	0
Italiens	71	0,84	0,15	0	0,01
Mexicains	203	0,88	0,10	0,01	0,005
Péruviens	169	0,94	0,05	0,01	0,003
Espagnols	22	0,80	0,18	0,02	0

**Tableau 3 : Fréquence des allèles de CR1 dans différentes populations.**

Le CR1 contient également un ou plusieurs sites de phosphorylation, Cette phosphorylation de CR1 a été mise en évidence lors de l'activation des polynucléaires neutrophiles [69].

Plusieurs polymorphismes de structure ont été mis en évidence (Tableau 4, Page 32)

SCR	Acides aminés	Nucléotides	Références
7	A445T	1333G>A	[70]
8	R483C	1597C>T	[71]
10	I643T	1928T>C	[72]
10 et 11	I684T	2051T>C	[70]
16	Q981H	2943G>T	[72]
16	Q1022H	3066G>T	[70]
19	H1208R	3623A>G	[70]
21	T1408I	4223C>T	[73]
25	N1540S	4619A>G	[74]
25	R1601G	4801A>G	[73]
25	S1610T	4828T>A	[75]
25	I1615V	4843A>G	[73]
28	I1799M	5397A>G	[73]
28	P1827R	5480C>G	[73]
29	T1876I	5627C>T	[73]

**Tableau 4 : polymorphismes structuraux de CR1\*1**

#### II.4. Le gène

L'isolement des ADNc extraits d'individus exprimant les différents allotypes montre que le polymorphisme de longueur de CR1 est retrouvé au niveau de l'ARNm [68]. L'augmentation de poids moléculaire entre chaque allotype est associée à une augmentation de la taille de chaque ARNm de 1,4 kb.

Le polymorphisme ne s'explique pas par un épissage alternatif [67,76], mais par l'existence de quatre allèles différents. Le gène de CR1\*1 est composé de 39 exons, les LHR (-A, -B et -C) de 8 exons, le LHR-D de 10 exons, pour une taille totale de 133 kb [77] (Tableau 5, page 33).

LHR	SCR	Exon	Taille (pb)	Position sur ADNc	Taille des Introns (kb)
LHR-A	séquence signal	1	148	1-148	9,6
	1	2	180	149-328	4
	2a	3	100	329-428	2,3
	2b	4	86	429-514	12,3
	3,4	5	399	515-913	3
	5	6	177	914-1090	0,091
	6a	7	103	1091-1193	1,7
	6b	8	86	1194-1279	3,9
	7	9	219	1280-1498	1,2
LHR-B	8	10	180	1499-1678	1
	9a	11	100	1679-1778	6,1
	9b	12	86	1779-1864	2,3
	10,11	13	399	1865-2263	2,3
	12	14	177	2264-2440	2,5
	13a	15	103	2441-2543	0,091
	13b	16	86	2544-2629	0,65
	14	17	219	2630-2848	4,1
LHR-C	15	18	180	2849-3028	0,9
	16a	19	100	3029-3128	0,608
	16b	20	86	3129-3214	5,7
	17,18	21	399	3215-3613	2,6
	19	22	177	3614-3790	0,094
	20a	23	103	3791-3893	1
	20b	24	86	3894-3979	2,2
	21	25	228	3980-4207	2,5
LHR-D	22	26	180	4208-4387	1,4
	23a	27	100	4388-4487	1,4
	23b	28	86	4488-4573	19,5
	24,25	29	399	4574-4972	2,3
	26	30	177	4973-5149	0,082
	27a	31	103	5150-5252	2,4
	27b	32	86	5253-5338	3,4
	28	33	228	5339-5566	0,8
	29	34	177	5567-5743	2
	30	35	186	5744-5929	1,9
	TMa	36	24	5930-5953	1,1
	TMb	37	76	5954-6029	7,9
	cyto	38	105	6030-6134	8,7
3' non traduite	39	1245	6135-7379		

**Tableau 5 : Les exons du gène CR1 codant pour les SCR de la protéine CR1\*1. D'après Vik D. *et al* , 1993 [77]. TM : transmembranaire**

D'autres séquences d'ADN proches de celle de CR1 ont été isolées [78]. Une région de 40 kb, appelée *CR1like*, contient 10 exons ayant une homologie de 95% avec la région 5' de l'ADNc de CR1. Aucune protéine issue de ce gène n'a été jusqu'à présent mise en évidence. Par contre, il existerait des ARNm transcrits de cette région [79]. Une étude récente a permis de détecter des ARNm de *CR1like* dans le foie, la rate et le thymus de fœtus humain mais aussi dans la moelle osseuse d'adultes [80].

Pour McLure *et al.*, l'analyse des banques génomiques humaines de CR1 et *CR1like* montre que l'unité LHR est composée de 8 SCR plutôt que 7 et que le CR1 humain contient 42 SCR (« *(ajefbkdg<sup>-like</sup>)<sub>5</sub> ch* ») plutôt que 37 SCR. *CR1like* est composé de 13 SCR (« *a(jefbk)<sub>2</sub> dg<sup>-like</sup>* »), *g<sup>-like</sup>* étant un SCR dégénéré, c'est à dire qu'il est présent au niveau du gène mais n'est jamais traduit [81] (Figure 10, page 35).

## II.5. Evolution des gènes CR1

Les homologies entre les gènes codant pour les différents allotypes ont permis d'envisager une théorie permettant d'expliquer l'apparition des différents allotypes par *crossing-over* asymétrique (voir Figure 9, page 34).

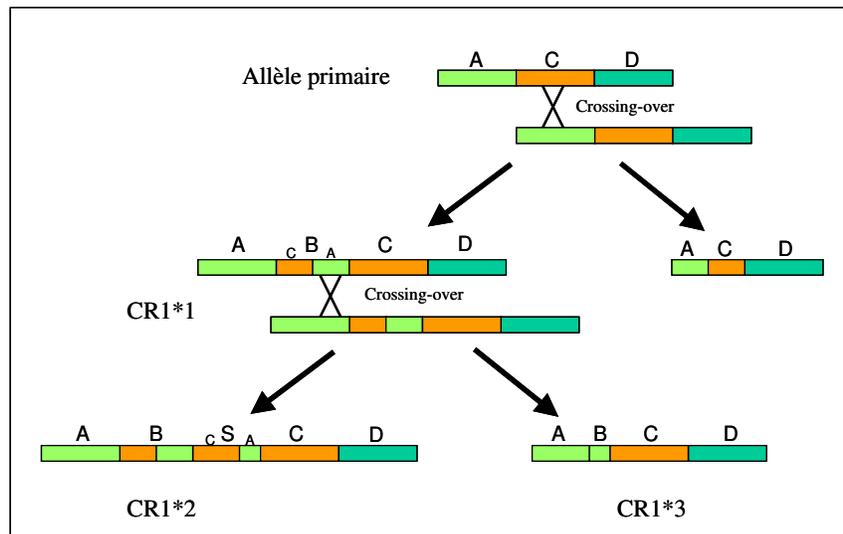
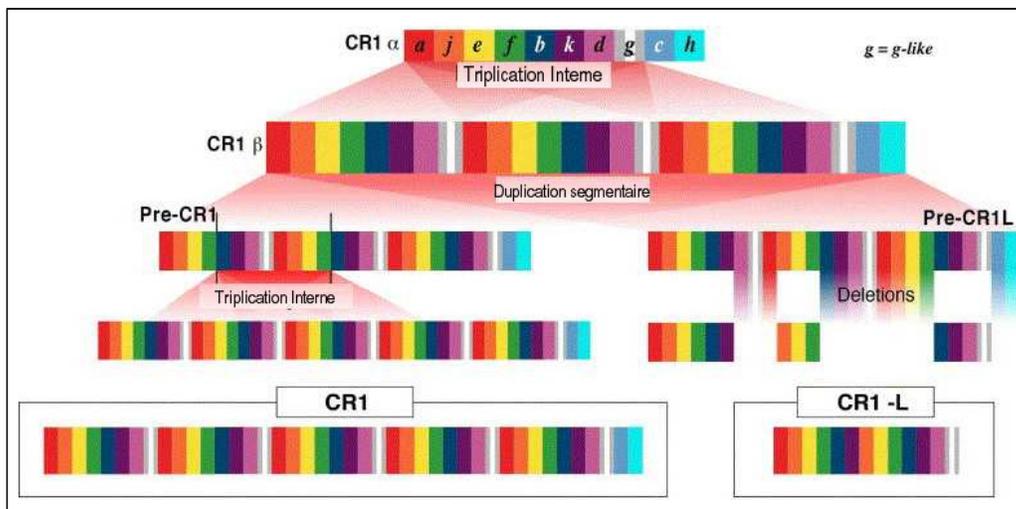


Figure 9 : Mécanismes d'évolution des allèles de CR1. D'après Vik D. *et al.* 1993 [77].

## II.6. Evolution des gènes CR1 et CR1like

CR1 et CR1like pourraient avoir évolué à partir d'un gène ancestral commun, CR1  $\alpha$ , contenant une copie de chaque SCR « *a, j, e, f, b, k, d, g<sup>-like</sup>, c, h* ». Le domaine contenant « *a, j, e, f, b, k, d et g<sup>-like</sup>* » a été dupliqué 2 fois pour donner un gène plus long, CR1  $\beta$ , contenant 3 copies « *a,j,e,f,b,k,d, g<sup>-like</sup>* » et une copie des SCR « *c* » et « *h* ». Une duplication de CR1  $\beta$  conduit à la formation du gène pré-CR1 et pré-CR1like. Une triplification du domaine « *b, k, d, g<sup>-like</sup>, a, j, e* et *f* » dans le pré-CR1 a conduit à la formation de CR1. Des délétions de « *d, g<sup>-like</sup>* et *a* », de « *b, k, d, g<sup>-like</sup>, a, j, e,* et *f* » puis de « *c* et *h* » dans le pré-CR1-like ont conduit à la formation de CR1like [82].

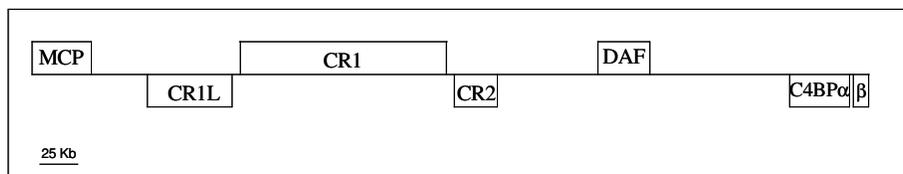


**Figure 10 : Modèle proposé pour l'évolution des gènes CR1 et CR1like (CR1L) humains après analyses génomiques et phylogénétiques. D'après Mc Lure *et al*, 2005 [82].**

## II.7. Localisation chromosomique du gène de CR1 : le RCA (*Regulator of Complement Activation*)

Les premières études familiales chez l'Homme ont mis en évidence une liaison entre le gène de la C4bp [83] et celui du CR1 [29]. Ultérieurement, le facteur H [84], le CR2 [85], DAF [86] et MCP [87] se sont ajoutés à la liste de ces molécules. Cette région du chromosome 1, sise en 1q32 [85], porte le nom de RCA [*Regulator of Complement Activation*]. Finalement, la carte physique de cette zone a été établie [88,89](voir

Figure 11, page 36), sans que la position du gène codant pour le facteur H puisse être déterminée.



**Figure 11 : carte de la région du RCA contenant les gènes du CR1, CR1L, CR2, DAF, C4BP et MCP. D'après Genbank.**

Ces molécules, de fonctions et de structures protéiques proches (elles sont toutes constituées de SCR), sont probablement le produit de duplications intragéniques à partir d'un gène ancestral [79].

## II.8. Sites de fixations aux C3b et C4b

Le CR1 est le récepteur du C3b et du C4b. L'affinité de C3b pour son récepteur varie de  $0,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  à  $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  [90,91] alors que le C3b dimérique présente une affinité supérieure ( $K_a = 5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) [91]. L'affinité de C3b dimérique est plus représentative de ce qui peut se dérouler lorsque le C3b est fixé de façon covalente à une surface. L'affinité du CR1 pour le C4b dimérique est plus faible ( $K_a = 2,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) [92].

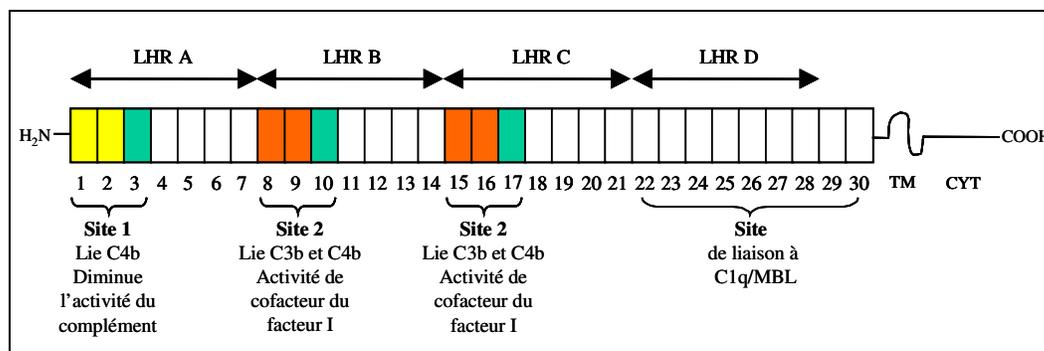
Le CR1 est également capable de fixer, avec une moindre affinité, d'autres fragments du C3, comme C3b i (C3b inactif) et C3c [93].

Les sites de liaisons de C3b se situent au niveau des trois SCR N-terminaux des LHR B et C. Le site de liaison de C4b se situe au niveau des trois SCR N-terminaux du LHR A [94,95]. Les trois SCR suivants sont également importants à la bonne qualité de la liaison mais ne sont pas responsables de la spécificité de celle-ci [95] (voir Figure 12, page 37).

Le CR1 se fixe sur la partie N-terminale de la chaîne  $\alpha$  du C3b [96,97]. La phosphorylation de C3b améliore la liaison à CR1 [98].

Le CR1 des caucasiens homozygotes (643T/ 981H) au niveau des SCR (10/16) a une plus grande affinité pour C4b que le CR1 des caucasiens homozygotes (643I/ 981Q). Ceci n'est pas observé pour le ligand C3b [72].

Dans le SCR8, une cystéine supplémentaire (483R>C) est observée chez 6,3% des afro-américains et 2,4% des caucasiens. Elle induit une baisse de la capacité de liaison de CR1 pour C3b, C3bi et C4b de plus de 80% [71].



**Figure 12 : Sites de liaison de C3b et C4b au CR1\*1. Les SCR homologues sont colorés de façon identique. Position des sites de liaison de C1q et des MBL au CR1\*1. D'après Krych-Goldberg M. *et al.* 2002 [267].**

## II.9. CR1 récepteur du C1q et de MBL (*mannan-binding lectin*)

Deux études [99,100] indiquent que CR1 est également un récepteur de C1q et de MBL. Le CR1 semble avoir une plus grande affinité pour C1q que pour C3b dimérique ( $K_a = 4,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  contre  $9,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Cette liaison se ferait entre la partie collagène de C1q et le LHR-D et / ou les deux derniers SCR de CR1. L'interaction CR1-C1q pourrait accroître la capacité de CR1 à se lier à C4b [101].

L'affinité de CR1 pour MBL est la même que pour C1q mais sa liaison avec MBL semble plus stable qu'avec C1q [100].

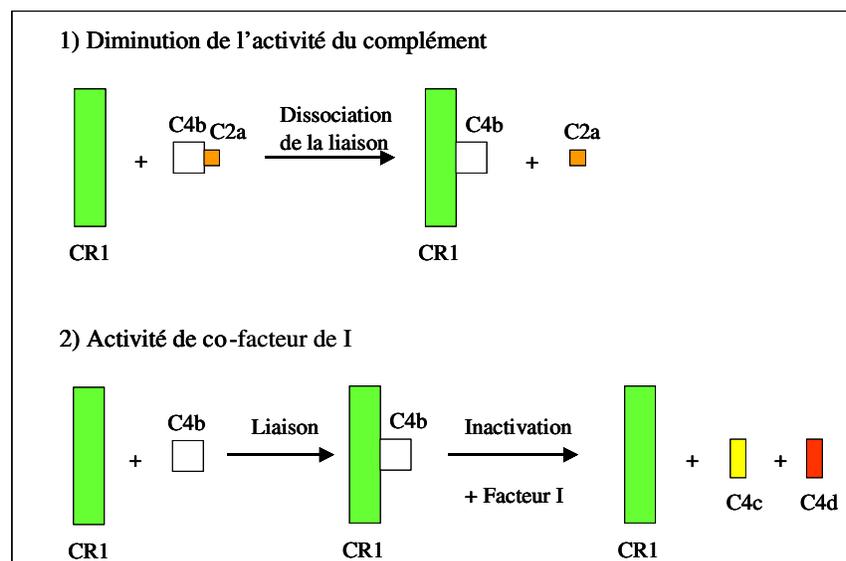
## II.10. Inactivation des voies classique et alterne du complément par le CR1

Le CR1 est un inhibiteur de la voie classique [102] et de la voie alterne [53] du complément. Le CR1 intervient à plusieurs niveaux, il dissocie C2a du complexe C4b2a et C3b de C3bBb, augmente le clivage de C4b [103] et de C3b par le facteur I [104] (voir Figure13). Des études *in vitro* ont montré que le LHR A est capable d'inhiber la C3 convertase et de façon moindre la C5 convertase [105]. Cependant, le LHR A seul, perd la fonction de cofacteur de I capable d'activer le clivage de C3b et C4b [106,107,109].

A l'inverse les LHR B et LHR C possèdent cette activité cofacteur de I mais ne sont pas capable d'inhiber les C3 et C5 convertases [107,109].

L'inhibition de la C5 convertase nécessite la combinaison des LHR A, B et C [105].

Un arrangement conformationnel des sites 1 et 2 est nécessaire pour inhiber efficacement la C5 convertase (Diminution de l'activité du complément). Le site 1 dissocie la C5 convertase de la voie classique tandis que le site 2 fixe la sous-unité C3b. En outre la jonction SCR1/SCR2 et la phenylalanine en position 82 jouent un rôle critique pour inhiber efficacement la C3 convertase (Diminution de l'activité du complément) [110].



**Figure 13 : Inactivation de la voie classique du complément par CR1, en dissociant la C3 convertase ou comme cofacteur du facteur I. D'après Hourcade *et al*, 2000 [111].**

### **III. Le CR1 érythrocytaire**

#### **III.1. Densité de CR1 érythrocytaire**

Plusieurs techniques sont disponibles pour déterminer la densité de CR1 érythrocytaire (CR1/E). Les premières utilisées ont été l'agglutination des globules rouges par des anticorps anti-CR1 [112] et la formation de rosettes en présence d'érythrocytes recouverts de C3b [113]. Ces techniques rudimentaires ont été rapidement remplacées par des procédés d'immunomarquage utilisant des anticorps anti-CR1 radiomarqués [53,114]. Il est également possible de mesurer par ELISA la concentration de CR1 dans des extraits membranaires [115]. Bien que précises, ces techniques ne permettent d'obtenir qu'une valeur moyenne de la densité de CR1/E. La répartition de la densité de CR1/E sur l'ensemble d'une population érythrocytaire n'est disponible que par une analyse en cytométrie de flux après immunomarquage. Cette technique était rendue difficile par la faible densité de CR1/E, néanmoins une technique d'amplification permet maintenant de mesurer facilement la densité de CR1/E [3].

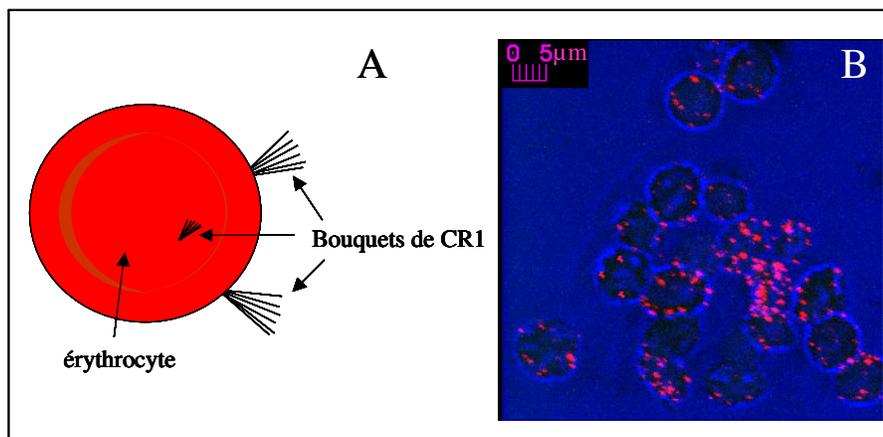
Il est à noter que certaines équipes estiment que les densités de CR1/E sont surestimées d'un facteur 2 ou 3 [116]. Cette erreur serait induite par la structure répétitive de CR1 et par la multiplicité du nombre d'épitopes pour chaque anticorps qu'elle entraîne [117]. Depuis que le CR1 soluble recombinant est utilisé comme standard des mesures par ELISA, ce type d'erreur est impossible. La découverte récente d'un nouvel anticorps monoclonal anti-CR1 (CR1-2B11), qui ne reconnaît qu'un seul épitope dans les SCR29-30, en fait l'outil idéal pour la mesure de la densité CR1/E [118].

La densité moyenne de CR1/E est de 500 molécules par érythrocytes, cette densité varie d'un individu à l'autre (de 100 à 1000 CR1/E) et d'un érythrocyte à l'autre chez un même individu. (Tableau 6, page 41)

#### **III.2. Distribution de CR1 à la surface des érythrocytes**

Les molécules de CR1 ne sont pas réparties de façon aléatoire à la surface des érythrocytes, mais sont regroupées en bouquets [119] (Figure 14, page 40). Par exemple les érythrocytes exprimant un nombre moyen de 500 sites, ont à leur surface 8 à 20 bouquets constitués de 30 à 75 molécules de CR1 [120]. Cette distribution est spécifique des érythrocytes et des

polynucléaires neutrophiles activés et n'est pas retrouvée à la surface des autres types cellulaires [121].

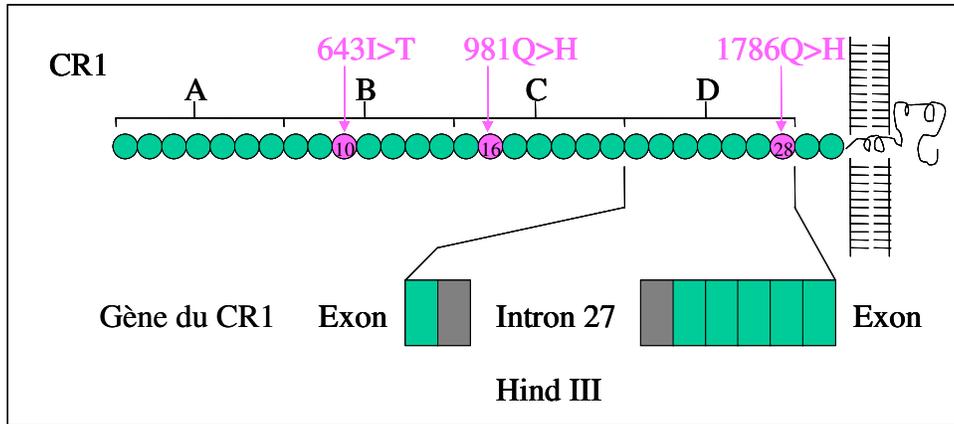


**Figure 14 : (A) Représentation schématique de la répartition géographique de CR1 à la surface des érythrocytes. (B) Analyse par microscopie confocale de la distribution de CR1 à la surface des érythrocytes. Les molécules de CR1 érythrocytaires ont été marquées par un anticorps monoclonal anti-CR1 couplé à un fluorochrome.**

### **III.3. Contrôle génétique de la densité de CR1 érythrocytaire**

La densité de CR1/E est régulée par deux allèles autosomiques co-dominants liés à une mutation ponctuelle dans l'intron 27 du gène codant pour le CR1\*1 [122,123]. Cette mutation produit un site de restriction supplémentaire pour l'enzyme *HindIII* (voir Figure 15, page 41), les fragments de restriction obtenus après digestion par *HindIII* sont de 7.4 kb pour l'allèle lié à une forte expression de CR1(allèle H : High) et de 6.9 kb pour l'allèle lié à une faible expression de CR1(allèle L : Low). Cette liaison est retrouvée chez les caucasiens, les asiatiques mais pas chez les personnes d'origine africaine [124].

Le niveau d'expression du CR1 érythrocytaire est également corrélé à la présence de mutations nucléotidiques ponctuelles dans les exons codant pour les SCR 10, 16 et 28. Il est élevé chez les individus homozygotes (643I/ 981Q) et faible chez les individus homozygotes (643T/ 981H) [72].



**Figure 15 : Localisation du site de restriction *Hind* III, lié au polymorphisme de densité de CR1/E, dans le gène de CR1. D’après Herrera A.H. *et al.* 1998 [124]. Localisation des SNP liés au polymorphisme de densité de CR1/E sur la protéine CR1. D’après Birmingham D.J. *et al.* 2003 [72].**

Il existe donc trois populations d’individus de génotypes différents exprimant des taux distincts de CR1/E (voir Tableau 6).

Génotype <i>Hind</i> III	Q981H	Densité CR1/E
HH	QQ	911
HL	QH	455
LL	HH	156

**Tableau 6 : Les différents génotypes contrôlant la densité de CR1/E chez les caucasiens. D’après Wilson J.G. *et al.*, 1986 [122] et Birmingham *et al.*, 2003 [72].**

Les mécanismes expliquant la régulation de la transcription du gène de CR1 chez l’Homme sont peu connus. Néanmoins, récemment, de nouvelles données ont apporté de nouveaux éclairages. Le traitement des lignées érythroïdes K562 par l’acide rétinoïque et la cytosine arabinoside provoque une augmentation de la synthèse de l’ARNm de CR1 [125]. L’acide rétinoïque est connu pour activer les kinases, et les résultats d’une deuxième publication montrent que l’activation de la transcription de CR1 dans les cellules K562 serait dépendante des tyrosines kinases [126]. Le promoteur de CR1 se caractérise par l’absence de boîte TATA. La majeure partie de l’activité transcriptionnelle se situe dans les -140 pb du site

d'initiation de la transcription [127]. La région située entre -80 pb et -40 pb est impliquée dans l'expression de CR1 [128]. La région située entre -700 pb et -500 pb est légèrement inhibitrice [128].

Les motifs des facteurs de transcriptions : AP1, MZF1, SP1, les protéines Ets et AML1 ont été mis en évidence dans le promoteur de CR1. Elles participeraient à la régulation transcriptionnelle de CR1 [127]. AML1 et les protéines Ets activent le promoteur de CR1 [129]. Les sites de liaison d'AML1, Ets et SP1 se trouvent dans une zone de la région du promoteur de CR1, zone de 38 paires de bases décrites comme indispensable à l'activité transcriptionnelle du gène CR1. Cette zone contient sept sites de liaison potentiels de facteurs de transcription dont SRF (*serum response factor*), SRE (*serum response element*), GCN4-HIS3,4, P2I-CS, H-2RIIBP/T3R, Sp1\_CS4 et ZRE [128]. La fusion TEL/AML1 régule négativement l'expression de CR1 induite par AML1 à travers son site de liaison situé entre -58pb et -53 pb [130,131].

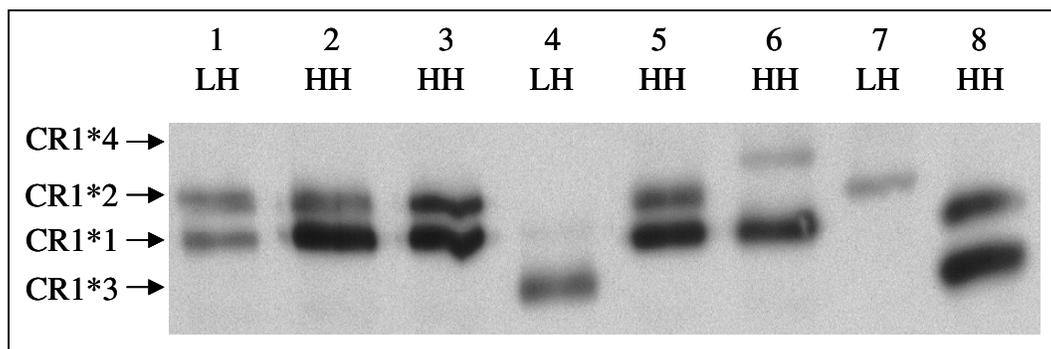
La mise en évidence de polymorphismes dans les éléments transcriptionnels de la région du promoteur et la région 3' non traduite du gène CR1 humain n'ont pas permis d'expliquer les niveaux d'expression du CR1 érythrocytaire déterminés génétiquement par les allèles H et L. [132].

#### **III.4. Régulation physiologique de la densité de CR1 érythrocytaire**

La densité de CR1/E diminue au cours de la vie de l'érythrocyte [133], ceci expliquerait l'hétérogénéité de la densité de CR1/E chez un même individu. Selon certains auteurs, l'intensité du catabolisme de CR1 n'est pas corrélée avec la densité initiale de CR1/E [134], pour d'autres elle est d'autant plus importante que la densité initiale est importante [7]. La demi-vie de CR1 à la surface des érythrocytes est de 11 à 32 jours. La répartition en bouquets de CR1 à la surface des érythrocytes n'est pas modifiée pendant le vieillissement [135].

Une équipe a trouvé une association entre l'allèle L et l'apparition d'une mutation dans le gène de CR1 conduisant au remplacement d'une proline par une arginine dans le SCR 28 [124]. Cette modification entraîne l'apparition d'un site de protéolyse potentiel qui expliquerait une diminution de la demi-vie de l'allèle L par rapport à celle de l'allèle H. Cette observation limitée à quelques individus, n'a pas été vérifiée par notre laboratoire. On peut constater chez certains individus hétérozygotes pour le polymorphisme de longueur une différence dans le niveau d'expression des deux allèles. Mais cette différence n'est pas corrélée aux génotypes de

densité de ces individus (Figure 16, page 43), comme ce qui devrait être observé dans le cas d'une régulation en cis.



**Figure 16 : Analyse par western blot du polymorphisme de la taille de CR1 chez huit individus. Le génotype codant pour la densité de CR1/E de chaque personne est indiqué au sommet du gel. La personne 1 est LH, pourtant il n'y a pas de différences dans le niveau d'expression de chacun de ces allèles. Par contre les individus 2, 3, 5 et 6 sont LL ou HH et chacun de leurs allèles s'expriment différemment.**

### III.5. Fixation des complexes immuns par les érythrocytes

L'affinité des complexes immuns pour les érythrocytes est très forte ( $K_a=5$  à  $14 \cdot 10^{-10} M^{-1}$ ) comparée à l'affinité du CR1 pour le C3b (de l'ordre de  $5 \cdot 10^7 M^{-1}$ ) [136]. La bonne fixation des complexes immuns dépend de la taille des complexes. Elle doit être suffisamment importante pour permettre l'incorporation d'une quantité abondante de C3b [137]. Tout ceci s'explique par la liaison multivalente des complexes immuns aux bouquets de CR1 présents à la surface des érythrocytes. D'ailleurs, les leucocytes, dont le CR1 n'est pas en bouquets, fixent beaucoup moins bien les complexes immuns malgré un nombre plus élevé de CR1 par cellule [121].

Seule une fraction d'érythrocytes est capable de fixer les complexes immuns, il s'agit probablement d'une population érythrocytaire ayant un plus grand nombre de bouquets de CR1 ou des bouquets contenant plus de molécules de CR1 [138]. Le nombre de complexes immuns fixés par les érythrocytes est corrélé à la densité de CR1/E [139]. *In vitro*, on observe même un transfert des complexes immuns des érythrocytes ayant une faible densité vers les érythrocytes disposant d'une plus forte densité de CR1/E [140].

Le nombre de sites de fixation de C3b à la surface de CR1 varie avec la taille des allotypes. Pourtant, les différences d'affinité observées entre les érythrocytes exprimant l'allotype CR1\*4 (250 kDa) et ceux exprimant le CR1\*1 (190 kDa) sont minimales, observables uniquement lors de la phase d'association, et inexistantes à l'équilibre [139].

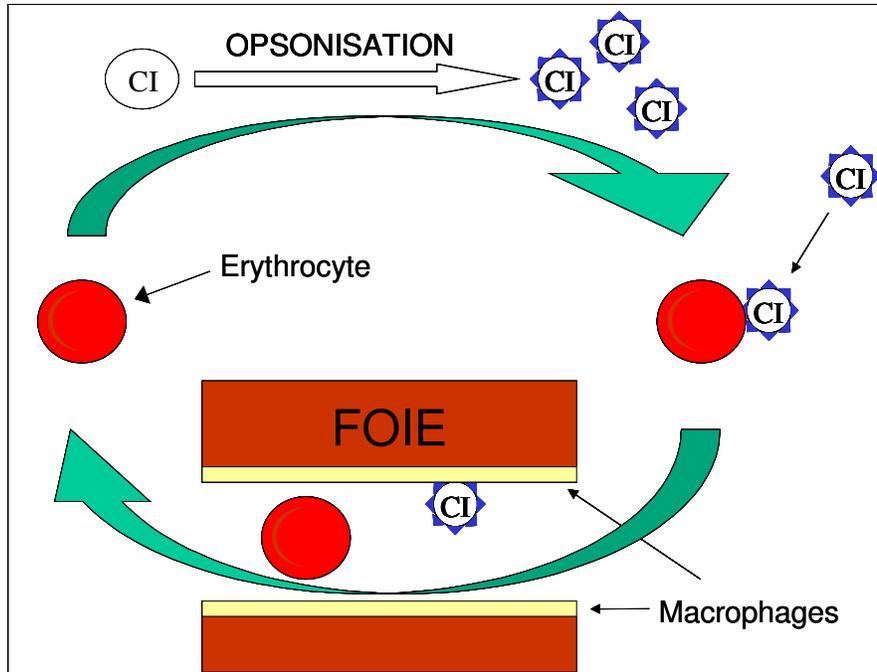
L'activation du complément par les complexes immuns continue après leur fixation à la surface des érythrocytes. Cette activation est cependant fortement diminuée par l'action de CR1 et du facteur I. Cependant, on observe un dépôt de C3b à la surface des érythrocytes portant les complexes immuns [104,141-142].

La fixation des complexes immuns n'entraîne pas un remaniement de la distribution des molécules de CR1 à la surface des érythrocytes [139].

### **III.6. Transport et clairance des complexes immuns**

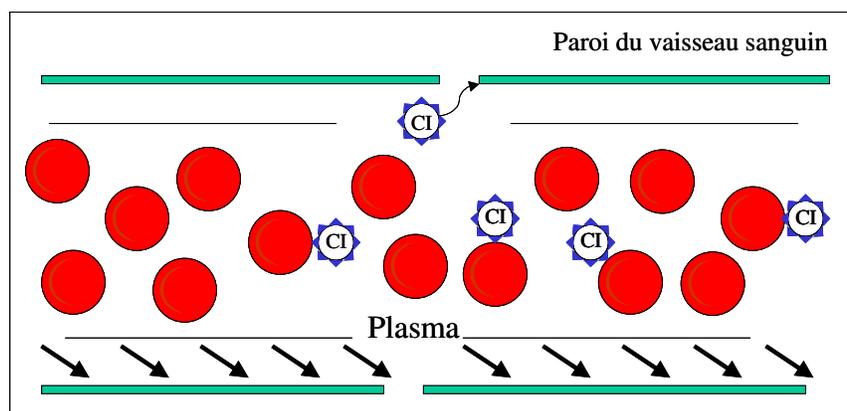
Un grand nombre d'études ont mis en évidence le rôle de CR1, à la surface des érythrocytes, dans le transport et la clairance des complexes immuns chez les primates. Ces modèles varient en fonction de l'espèce étudiée, du lieu où sont formés les complexes immuns (*in vitro* ou *in vivo*) et de leur composition.

Les premières études effectuées chez les primates (Babouins, Macaque rhésus et Macaque cynomolgus) montrent que les complexes immuns formés *in vitro* (complexes SAB/anticorps anti-SAB) sont rapidement fixés par les érythrocytes *via* CR1. Ils sont ensuite transportés à la surface des globules rouges jusqu'au foie et à la rate où ils sont éliminés. Les érythrocytes retournent ensuite dans la circulation où ils peuvent éventuellement fixer d'autres complexes immuns (voir Figure 17, page 45).



**Figure 17 : Mécanisme de la clairance des complexes immuns (CI).**

Les complexes immuns qui ne se fixent pas aux érythrocytes (en raison de leur taille, de leur faible opsonisation ou du type d'anticorps impliqué) sont éliminés de la circulation plus rapidement. En fait, ils ne se déposent pas dans le foie et la rate mais au hasard dans les autres tissus où ils peuvent provoquer des lésions (voir Figure 18, page 45). Les organes privilégiés pour ce type de dépôt sont fortement vascularisés comme les reins, les poumons et le cerveau.



**Figure 18 : Répartition des complexes immuns entre la surface des érythrocytes et la phase fluide de la circulation sanguine. Les complexes immuns non-fixés aux érythrocytes se déposent dans les tissus. D'après Schifferli J.A. *et al.* 1989.**

De nombreuses études effectuées chez l'Homme ont confirmé ces résultats. Le modèle le plus fidèle de la formation des complexes immuns *in vivo* est l'injection d'antigènes HBs (antigène de surface du virus de l'hépatite B) à des sujets vaccinés contre l'hépatite B [139]. Dans ce modèle, seule une faible fraction des complexes immuns se fixe aux érythrocytes (10% à 50%). Il en est de même dans tous les modèles où les complexes immuns sont formés *in vivo*. Ces complexes de petites tailles, car constitués en présence de complément, fixent moins de C3b et se lient moins bien aux érythrocytes [144] (voir Tableau 7, page 47).

Espèces	Formation des complexes immuns	Composition des complexes immuns	Pourcentage des complexes se fixant aux érythrocytes	Références
Babouin, rhésus	<i>in vitro</i>	SAB / anticorps anti-SAB de lapins	60%	[145]
Babouin	<i>in vitro</i>	DNP-SAB / anticorps monoclonal de souris anti-DNP	90%	[146]
Chimpanzé	<i>in vitro</i>	ADN / anticorps humain anti-ADN	70%	[147]
Babouin	<i>in vitro</i>	ADN / anticorps humain anti-ADN	85%	[148]
rhésus	<i>in vivo</i>	ADN / anticorps humain anti-ADN	55%	[149]
Cynomolgus	<i>in vivo</i>	GGB / anticorps anti-GGB	20%	[150]
	<i>in vitro</i>	IgG humaines agrégées	25%	[151]
	<i>in vitro</i>	TT / anticorps humain anti-TT	50%	[152]
Homme	<i>in vivo</i>	anticorps monoclonaux / anticorps humains anti-monoclonaux	10%	[153]
	<i>in vitro</i>	Antigènes HBs/Anticorps anti-HBs	60%	[139]
	<i>in vivo</i>	Antigènes HBs/Anticorps anti-HBs	10%	[154]

**Tableau 7 : Différents modèles d'étude de la clairance des complexes immuns chez les primates. GGB = Gamma globuline bovine. SAB = Sérum albumine bovine. DNP = Dinitrophénol. Hbs = Antigène de surface du virus de l'hépatite B. TT= toxine tétanique. Birmingham D.J. 1995 [52].**

Le mécanisme expliquant le transfert des complexes immuns des érythrocytes vers les macrophages du foie n'est pas encore précisément connu et plusieurs hypothèses sont envisageables.

La première hypothèse implique le facteur I et le CR1. Ces deux molécules clivent le C3b, en iC3b et C3dg qui ont une forte affinité pour CR3 et une faible affinité pour CR1 [155]. La liaison des complexes immuns aux macrophages se ferait *via* CR3 et les récepteurs des IgG (FcγR) [147], la coopération entre ces deux récepteurs induisant le processus de phagocytose. Cette théorie est confirmée *in vitro* [156,157] mais se heurte à d'autres études *in vivo* qui montrent que le facteur I n'est pas nécessaire au transfert des complexes immuns vers les macrophages [158,159]. De plus, la clairance des complexes immuns chez le Chimpanzé est comparable à celle observée chez les autres primates bien que le CR1 de Chimpanzé ne soit pas un cofacteur du Facteur I. Il semble aussi probable que la perte d'affinité du CR1 érythrocytaire pour les complexes immuns, au fur et à mesure de la dégradation de C3b, entraînerait une libération de ces complexes dans tout l'organisme et pas seulement dans le foie et la rate.

Une deuxième hypothèse proche de la première explique le transfert des complexes immuns par la fixation de ces complexes aux molécules de CR1 et aux FcγR présents à la surface des macrophages. Le rôle des FcγR dans la phagocytose des complexes immuns est confirmé par des études *in vivo* et *in vitro* [147,158,159]. Ces expériences montrent une forte inhibition du transfert des complexes immuns en utilisant des anticorps monoclonaux anti-FcγR. Cette inhibition est aussi observée *in vitro* en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CR1.

Le clivage de CR1 par des protéases présentes dans le foie et la rate est aussi une des hypothèses permettant d'expliquer la libération des complexes immuns de la surface des érythrocytes. L'observation de la diminution de la densité de CR1 chez les patients atteints de maladies à complexes immuns (voir X.4.2) est le principal argument soutenant cette proposition. Cette diminution est consécutive à la clairance des complexes [153,160] et CR1 est sensible à la protéolyse [133]. Des fragments de CR1 sont même retrouvés à la surface de ces érythrocytes [161].

Mais la perte de CR1 n'a apparemment pas lieu dans le foie [162]. De plus des études *in vitro* montrent que la diminution de CR1, après le contact des érythrocytes avec les polynucléaires neutrophiles, est réversible et serait due à un masquage des épitopes de CR1 après fixation des complexes immuns par les érythrocytes [163]. Il semble donc que le clivage de CR1 ne soit pas le mécanisme principal expliquant le transfert des complexes immuns des érythrocytes

vers les cellules de Küpffer. Craig *et al.* ont montré dans un modèle *in vitro* que le CR1 se localisait avec des complexes IgM-C3b et des complexes immuns-C3b liés à de la glycophorine A en rompant sa distribution en bouquets [164].

## **IV. Rôle du CR1 sur les autres types cellulaires**

### **IV.1. CR1 et polynucléaires**

Le CR1 est présent à la surface de tous les types de polynucléaires. Seul dix pour cent du CR1 cellulaire est exprimé en surface, la fraction restante est présente dans de petites vésicules intracellulaires [165]. Ces vésicules ne sont pas les granules spécifiques des différents polynucléaires mais des vésicules sécrétoires rapidement mobilisables [166]. Elles sont transférées spécifiquement à la surface de la cellule après stimulation et influx de calcium libre dans le cytoplasme. La translocation du CR1 à la surface ne s'accompagne pas forcément de l'exocytose des granules [167,168].

L'exocytose des granules des polynucléaires neutrophiles entraîne un changement de la distribution de CR1. Le CR1 est déjà partiellement regroupé sous forme de bouquets [169], l'exocytose provoque un regroupement supplémentaire du CR1 à la surface des polynucléaires neutrophiles, cette modification ne semble pas suffisamment importante pour augmenter la capacité des polynucléaires neutrophiles à capter les complexes immuns [170].

L'activation des polynucléaires neutrophiles et de toutes les cellules phagocytaires s'accompagne d'une phosphorylation spécifique de CR1 [69].

La co-incubation des granulocytes activés avec des érythrocytes inhibe l'augmentation de la densité de CR1 à la surface de ces granulocytes, cette inhibition peut-être levée par augmentation du stimulus activant les granulocytes [171]. Les auteurs proposent que ce phénomène permettrait de limiter l'expression de CR1 à la surface des granulocytes quand ceux-ci sont dans le sang périphérique. Les granulocytes redeviennent activables lorsqu'ils sont localisés dans les tissus.

La densité de CR1 des granulocytes augmente sous l'action de  $\text{TNF}\alpha$ , IL8 et C5a [172]. Celle des polynucléaires neutrophiles augmente au cours des infections bactériennes [173] mais diminue au cours de l'infection grippale [174]. Celle des monocytes est augmentée dans les 2 cas d'infection [174]. Les polynucléaires neutrophiles dont le CR1 est bloqué captent beaucoup moins bien les adénovirus [175].

## IV.2. CR1 et Phagocytose

Le rôle spécifique de CR1 dans la phagocytose est mal connu, mais il semble jouer un rôle important dans sa régulation. L'activation préalable des cellules est nécessaire à l'internalisation des complexes opsonisés fixés *via* le CR1 [176]. Les mécanismes permettant l'activation de CR1 consécutive à l'activation de la cellule sont mal connus, il semble que l'activation des macrophages entraîne l'activation de la protéine kinase C et la phosphorylation de CR1 [177].

La fixation des complexes immuns opsonisés aux molécules de CR1 activées engendre l'activation de la phospholipase D connue pour provoquer le processus d'internalisation et une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire qui favorise la fusion des lysosomes au phagosome [178].

## IV.3. Rôle du CR1 dans la réponse anticorps

Le CR1 est impliqué à plusieurs niveaux de la réponse anticorps : il joue un rôle dans les processus d'activation et d'anergie des lymphocytes B et dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les résultats disponibles ne permettent pas toujours de différencier les rôles respectifs de CR1 et de CR2, car de nombreuses expériences sont effectuées chez des souris déficientes pour le gène *Cr2* qui code ces deux molécules. Toutefois une étude chez l'Homme a montré qu'un agrégat de C3 mimant le C3b multimérique en se liant au CR1 inhibe fortement et de façon dose dépendante la prolifération des lymphocytes B induite par un anticorps anti-IgM; cela même en présence des cytokines costimulatrices IL-2 et IL-15. La libération de  $Ca^{2+}$  cytosolique et la phosphorylation des résidus tyrosines des protéines cytoplasmiques sont aussi inhibées par le C3 multimérique. Ceci indique que le CR1 exprimé par les lymphocytes B humains transmet un signal inhibiteur. CR1 joue un rôle antagoniste de CR2 dans la régulation de l'activation des lymphocytes B *via* le BCR. [179].

CR1 joue également un rôle important dans l'activation du complément par les lymphocytes B *via* la voie classique. Il favorise le dépôt de fragment C3 et la formation du complexe d'attaque membranaire à la surface des lymphocytes B périphériques normaux. La formation du complexe d'attaque membranaire induit des modifications de la polarité membranaire, des libérations de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et plus généralement conduit à l'activation des voies de transduction cellulaires [180].

CR1 assiste CR2 dans l'opsonisation des antigènes comme cofacteur du facteur I conduisant à la dégradation de C3b lié à l'antigène en iC3b puis en C3dg, ligands préférentiels de CR2.

CR1 renforce le rôle de CR2 dans l'activation de la voie alterne du complément à la surface des lymphocytes B en capturant rapidement le C3i de la phase liquide et en formant un complexe ternaire stable avec C3i et CR2. Une fois incorporé à ce complexe, l'activité de cofacteur de CR1 pour le facteur I dans le clivage de C3i/C3b est supprimée. CR1 contribue alors à la dégradation des fragments C3b générés par la convertase de la voie alterne initiée par CR2 qui peut aller s'attacher à d'autres molécules de la surface des lymphocytes B. C3dg résultant de l'activité du facteur I peut se fixer au CR2 [181].

#### **IV.3.1. CR1 et tolérance des lymphocytes B aux antigènes du soi**

Des études menées chez les souris déficientes pour les gènes de C3, de C4 ou de CR1/CR2 montrent que le C4, mais pas le C3, et l'expression de CR1/CR2 à la surface des lymphocytes B jouent un rôle important dans le mécanisme conduisant à l'anergie clonale de ces lymphocytes autoréactifs [182]. Ce mécanisme n'est pas lié au complexe CD21/CD19/Tapa-1 exprimé par les lymphocytes B car C3 (qui se lie à CD21) ne semble pas impliqué. Les auteurs proposent que l'opsonisation des antigènes du soi permet leur orientation et leur concentration dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires où ils sont en contact avec les lymphocytes B autoréactifs immatures.

Ce mécanisme expliquerait le paradoxe du lupus érythémateux disséminé : pourquoi certains déficits en protéines du complément conduisent à des maladies auto-immunes ?

#### **IV.3.2. CR1 et activation de la réponse anticorps**

Au moins trois types cellulaires sont impliqués dans la réponse anticorps : les cellules présentatrices des antigènes, les lymphocytes TH et les lymphocytes B. CR1 est exprimé à la surface de toutes ces cellules, et des études déjà anciennes ont montré que l'opsonisation des antigènes est indispensable à une bonne réponse humorale [183].

Le transport des antigènes vers les organes lymphoïdes secondaires est la première étape de la réponse humorale. Les érythrocytes et CR1 sont impliqués dans ce processus, il est d'ailleurs intéressant de noter que le traitement à l'érythropoïétine (qui augmente le nombre d'érythrocytes avec une forte densité de CR1/E, voir XII.1) entraîne une augmentation de la réponse humorale [184].

La présentation des antigènes est également dépendante du CR1. Tout d'abord, le CR1 à la surface des cellules dendritiques folliculaires retient les complexes immuns et permet la

capture des antigènes par les lymphocytes B *via* leurs immunoglobulines de surfaces. Un défaut de CR1/CR2 à la surface des cellules dendritiques folliculaires chez la souris entraîne une diminution de la durée de la réponse primaire et un défaut de réponse secondaire [185]. Dans ce cas, le défaut de CR1 semble plus grave que le défaut de CR2 [186]. Ensuite, il existe à la surface des lymphocytes B un complexe CR1/CR2 [187] distinct du complexe CR2/CD19 (responsable, avec le récepteur des cellules B, de la phagocytose des antigènes). Il semblerait que le complexe CR1/CR2 fixe les complexes immuns opsonisés. Après clivage du C3b par le CR1 et le facteur I, ces complexes se dirigent vers CR2/CD19. L'activation de CR1 à la surface des lymphocytes B provoque également une augmentation de la production d'anticorps par ces lymphocytes [188,189].

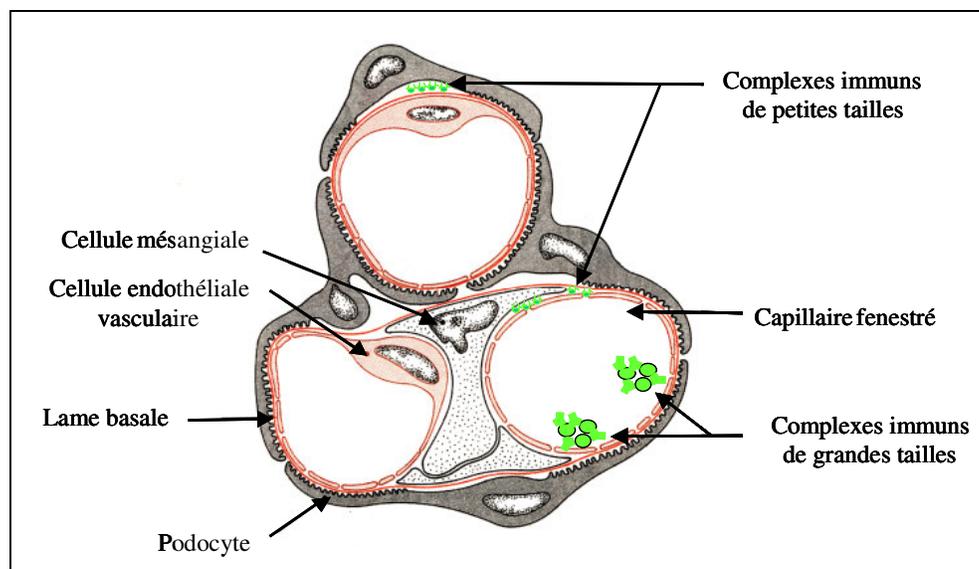
Le dépôt de C3 à la surface des cellules présentatrices de l'antigène augmente la prolifération des lymphocytes TH spécifiques de l'antigène présenté. Ce phénomène est initié par la liaison des lymphocytes TH, *via* leurs récepteurs CR1 et CR2, aux cellules présentatrices des antigènes. Les récepteurs du complément à la surface des lymphocytes T permettraient d'augmenter les contacts intercellulaires dans les ganglions lymphatiques [190]. Il a été récemment montré que des anticorps anti-CR1 inhibaient la prolifération des lymphocytes T et que le CR1 transmet un signal inhibiteur chez les lymphocytes T humains [191]. Toutes ces données pour l'instant disjointes, montrent l'importance de l'immunité innée dans l'immunité acquise. Les relations entre ces deux domaines, longtemps considérés comme distincts, sont actuellement un des axes majeurs de la recherche en immunologie [192,193].

#### **IV.4. Le CR1 à la surface des podocytes glomérulaires**

Dans les reins, CR1 est localisé uniquement à la surface des podocytes glomérulaires. Les autres protéines membranaires régulatrices du complément sont exprimées à la surface de tous les types cellulaires du glomérule. Le rôle spécifique de CR1 n'est pas connu, par contre la présence importante de régulateurs du complément dans le rein s'explique facilement car le rein est le lieu privilégié où vont se déposer les complexes immuns non fixés par les érythrocytes (Figure 19, page 53).

Les podocytes glomérulaires rejettent dans les urines des vésicules membranaires ayant du CR1 à leur surface [194]. Ce CR1 urinaire est présent à une concentration (3 ng/ml), dix fois inférieure à celle du CR1 soluble plasmatique. L'exocytose de vésicules enrichies en CR1 est un phénomène connu pour d'autres types cellulaires (voir XI.1), elle permettrait d'expulser le complexe d'attaque membranaire de la surface des cellules attaquées par le complément.

On observe une disparition de l'expression de CR1 par les podocytes, dans le cas de certaines pathologies rénales comme les glomérulonéphrites, le lupus érythémateux disséminé et les gloméruloscléroses diabétiques [195]. Le taux de CR1 urinaire diminue dans le lupus érythémateux disséminé et cette diminution est corrélée à la baisse du niveau d'expression du CR1 glomérulaire. Le CR1 urinaire a été envisagé comme un marqueur potentiel non invasif du suivi glomérulaire pour cette pathologie [196].



**Figure 19 : Représentation schématique de la structure d'un glomérule et localisation des complexes immuns en fonction de leur taille. D'après Roitt I.M. *et al.* 1994.**

## V. Le CR1 soluble

### V.1. Détection

Il existe une forme soluble de CR1 présente dans le plasma. Sa concentration varie de 15 à 80 ng/mL (moyenne =  $30 \pm 8$  ng/mL). Cette concentration est corrélée à la densité de CR1/E et représente environ 7% de la quantité totale de CR1 présent à la surface des érythrocytes. Le CR1 soluble a un poids moléculaire équivalent à celui de l'allèle de CR1 exprimé par les cellules (voir II.3) [197]. On trouve également du CR1 soluble dans le liquide synovial [198] et dans le liquide céphalorachidien [199].

La concentration de CR1 soluble est augmentée chez les malades atteints de cirrhose du foie

( $158.3 \pm 49.9$  ng/mL), chez les patients dialysés ( $54.8 \pm 11.7$  ng/mL) [200] et ceux frappés de désordres hématologiques [201] mais pas chez les malades atteints de lupus érythémateux disséminés ou de SIDA [197,198]. Cette augmentation est réversible, un taux normal de CR1 soluble est retrouvé après une greffe de rein ou de foie. Il y a également une corrélation entre la quantité de CR1 soluble dans le plasma et la gravité de la maladie hépatique [202].

L'administration de G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) à des individus sains entraîne une augmentation importante de la concentration de CR1 soluble ( $43.8 \pm 15.4$  ng/mL à  $118.3 \pm 44.7$  ng/mL). Ce changement est corrélé à l'augmentation du nombre de leucocytes et à la quantité d'ARNm codant pour le CR1 présent des leucocytes [201].

## V.2. Origine

Deux hypothèses permettent d'expliquer la présence de la forme soluble de CR1 dans le plasma : l'épissage alternatif de l'ARN codant pour CR1 ou la protéolyse de la forme membranaire de CR1.

Un intron du gène de CR1 contient un site de polyadénylation qui conduirait, après épissage alternatif, à l'expression d'une forme sécrétée de CR1 [79]. Mais, cette forme ne contiendrait que les 9 ou les 16 premiers SCR de la partie N-terminale de CR1 et n'aurait donc pas le poids moléculaire de la forme soluble de CR1.

La protéolyse de la forme membranaire de CR1 est actuellement l'explication la plus plausible de la présence du CR1 soluble. C'est un mécanisme déjà connu pour de nombreuses molécules transmembranaires ayant une forme soluble (récepteur pour le TNF, pour le NGF pour l'IL4... ) [203].

Le fait que les malades lupiques ne présentent pas de différences dans l'expression du CR1 soluble alors qu'ils expriment un taux faible de CR1/E (voir X.4.2) montre que le CR1 soluble ne provient pas de la protéolyse de CR1 à la surface des érythrocytes. L'augmentation de la concentration du CR1 soluble chez les personnes traitées par le G-CSF semble indiquer que les leucocytes sont les cellules qui expriment cette molécule. *In vitro*, le surnageant de culture de cellules transformées par l'ADNc codant pour le CR1 contient du CR1 soluble. Le clivage de CR1 a lieu dans un compartiment intracellulaire, probablement au niveau de la région trans de l'appareil de Golgi [204]. La diminution du catabolisme de CR1 par le foie des patients atteints de problèmes hépatiques explique l'augmentation de la concentration de CR1 soluble chez ces personnes.

### V.3. Fonctions

La quantité de CR1 soluble présent dans le plasma est relativement faible par rapport à d'autres inhibiteurs solubles de l'activation du complément. Par exemple, le facteur H (un autre inhibiteur de la formation des C3 convertases) est présent à une concentration vingt mille fois supérieure (3  $\mu$ M contre 0.15 nM). Bien que le CR1 soluble soit cent fois plus actif que le facteur H [205], il ne peut être considéré à ces concentrations comme un inhibiteur important de l'activation du complément.

## VI. Comparaison aux autres molécules du RCA

Le CR1 est la molécule du RCA qui possède le plus grand spectre d'action. Elle lie le C3b, le C4b et le C3bi. De plus, c'est à la fois un activateur de la dissociation des convertases et un cofacteur du facteur I dans le clivage du C3b. Le Tableau 8 (page 55) montre que l'activité de CR1 recouvre pratiquement toutes les activités des autres molécules du RCA. Ceci en fait une molécule de grand intérêt comme agent thérapeutique dans les nombreuses pathologies où le complément est impliqué.

Protéines	Ligands	Dissociation des convertases	Cofacteur du facteur I
Facteur H	C3b	+	+
C4bp	C4b	+	+
DAF	C3b et C4b	+	-
MCP	C3b et C4b	-	+
CR1	C3b, C4b et C3bi	+	+
CR2	C3bi et C3dg	-	-

**Tableau 8 : Fonctions des différentes molécules du RCA. D'après Birmingham D.J. 1995 [52].**

## VII. CR1 et groupes sanguins

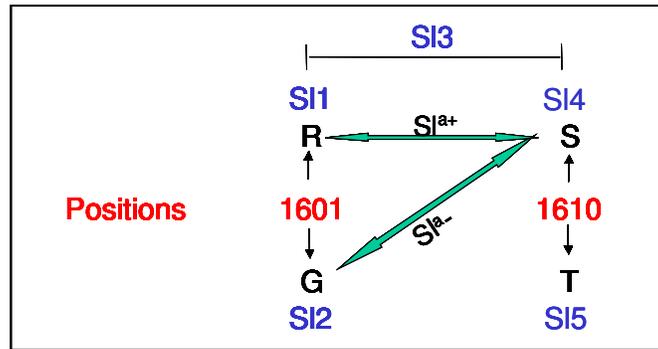
Le CR1, comme de nombreuses protéines membranaires des érythrocytes, présente des antigènes de groupes sanguins. La détermination des groupes spécifiques du CR1 a été rendue possible par l'existence d'individus rares possédant des érythrocytes de phénotype « null » pour différents groupes sanguins (phénotype Hegelson). Les globules rouges qui n'expriment pas les antigènes Knops (Kn), McCoy (McC), Swain-langley (Sl) et York (Yk) ne s'agglutinent pas en présence d'anticorps monoclonaux anti-CR1.

L'immunoprécipitation d'extraits membranaires d'érythrocytes par les anti-sérums réagissant avec les groupes sanguins Knops, McCoy, Swain-langley et York, permet d'isoler une molécule de poids moléculaire identique à celui du CR1. De plus, ces mêmes anti-sérums peuvent être neutralisés par du CR1 soluble recombinant [206].

Pour l'instant, huit antigènes différents (Kn<sup>a</sup>, Kn<sup>b</sup>, McC<sup>a</sup>, McC<sup>b</sup>, Sl<sup>a</sup>, Vil, Yk<sup>a</sup> et KAM) sont présents sur CR1. Ils se situent tous dans les SCR 24 et 25 codés par l'exon 29 du CR1\*1. L'antigène Kn<sup>a</sup> résulte d'une guanine en position 4708 codant pour une valine en 1561. L'antigène Kn<sup>b</sup> résulte d'une adénine en position 4708 codant pour une méthionine en 1561. L'antigène McC<sup>a</sup> résulte d'une adénine en position 4795 codant pour une valine en 1590. L'antigène McC<sup>b</sup> résulte d'une guanine en position 4795 codant pour un acide glutamique en 1590. L'antigène connu comme Sl<sup>a</sup> a été sous divisé en Sl 1, Sl 2, Sl 3, Sl 4 et Sl 5. Cette nouvelle terminologie prend en compte à la fois les épitopes linéaires et conformationnels à la surface de la protéine CR1. Les antigènes Swain-langley / Vil (Sl1/Sl2) résultent d'un polymorphisme nucléotidique 4828A>G qui code pour une arginine (Sl1) et pour une glycine (Sl2) en position 1601. Le polymorphisme nucléotidique 4855A>G code pour une sérine en position 1610 sur Sl4 et pour une thréonine sur Sl5 en position 1610. Sl3 requiert à la fois Arg1601 et Ser1610. [75] (voir Figure 20, page 57).

Les antigènes KAM-/KAM+ résultent d'un polymorphisme nucléotidique 4870A>G qui code pour une isoleucine (KAM -) et pour une valine (KAM +) en position 1615 [74].

Un nouvel SNP A4646G a été mis en évidence : une adénine en position 4646 code pour une asparagine en position 1540. Une guanine en position 4646 code pour une sérine en position 1540 [74] (Tableau 10, page 58).



**Figure 20 : Représentation schématique des SNP correspondant aux sous-divisions du SI<sup>a</sup>. D'après Moulds J. *et al.* 2002 [75].**

Les érythrocytes de phénotype « null » pour l'un des groupes sanguins liés au CR1 expriment une molécule de CR1 de poids moléculaire normal capable de fixer le C3b. Par contre l'individu de phénotype « null » pour les quatre groupes sanguins Knops, McCoy, Swainlangley et York expriment une faible densité de CR1 érythrocytaire (moins de vingt CR1/E). Ce phénotype semble donc être fortement lié à la densité de CR1. Le CR1 érythrocytaire des personnes produisant des anticorps contre les groupes Knops, McCoy, Swainlangley et/ou York est identique à celui des autres individus [207,208].

Les anticorps dirigés contre les groupes sanguins portés par CR1 sont du type « titre élevé, avidité faible » et n'entraînent pas de problèmes cliniques particuliers.

Ces résultats amènent d'autres conclusions. Les quatre groupes sanguins sont distincts mais portés par la même molécule, donc l'existence de nombreuses combinaisons entre chacun de ces groupes montre l'important polymorphisme de CR1 et l'existence d'allèles supplémentaires aux quatre précédemment décrits (voir Tableau 9, page 58). Ces allèles ne diffèrent pas par leur taille, mais par leur antigénicité.

Antigène	Kn <sup>a</sup>	Kn <sup>b</sup>	McC <sup>a</sup>	McC <sup>b</sup>	SI <sup>a</sup> (SI1)	Vil (SI2)	Yk <sup>a</sup>
Caucasiens	99%	4%	98%	0%	98%	0%	92%
Africains	99%	0%	90%	44%	60%	80%	98%

**Tableau 9 : Répartition des différents groupes sanguins portés par le CR1 dans les populations d'origine caucasienne et d'origine africaine. D'après Moulds J. *et al.* 1991 [207].**

polymorphisme	Génotype (%)	Génotype (%)		
		Brésiliens		
		caucasiens n=33	asiatiques n=42	afro-brésiliens n=43
4646A>G	A/A	30 (91)	42 (100)	43 (100)
N1540S	A/G G/G	3 (9)		
4708G>A	G/G	31 (94)	42 (100)	42 (98)
V1561M	G/A	2 (6)		1 (2)
Kn a/b	A/A			
4795A>G	A/A	32 (97)	42 (100)	25 (58)
K1590E	A/G	1 (3)		15 (35)
McC a/b	G/G			3 (7)
4828A>G	A/A	31 (94)	42 (100)	6 (14)
R1601G	A/G	2 (6)		24 (56)
SI1/SI2	G/G			13 (30)
4855T>A	T/T	32 (97)	42 (100)	43 (100)
S1610T	T/A	1 (3)		
SI4/SI5	A/A			
4870A>G	A/A	19 (57)	26 (62)	4(9)
I1615V	A/G	12(36)	14 (33)	19 (44)
KAM-/KAM+	G/G	2(6)	2(5)	20 (47)

**Tableau 10 : Fréquence génotypique des six SNP de l'exon 29 du gène CR1 dans les trois populations brésiliennes (caucasiens, asiatiques et afro-brésiliens). D'après Covas *et al.*, 2007 [74].**

## VIII. Le CR1 chez les primates non-humains

### VIII.1. Classification des primates

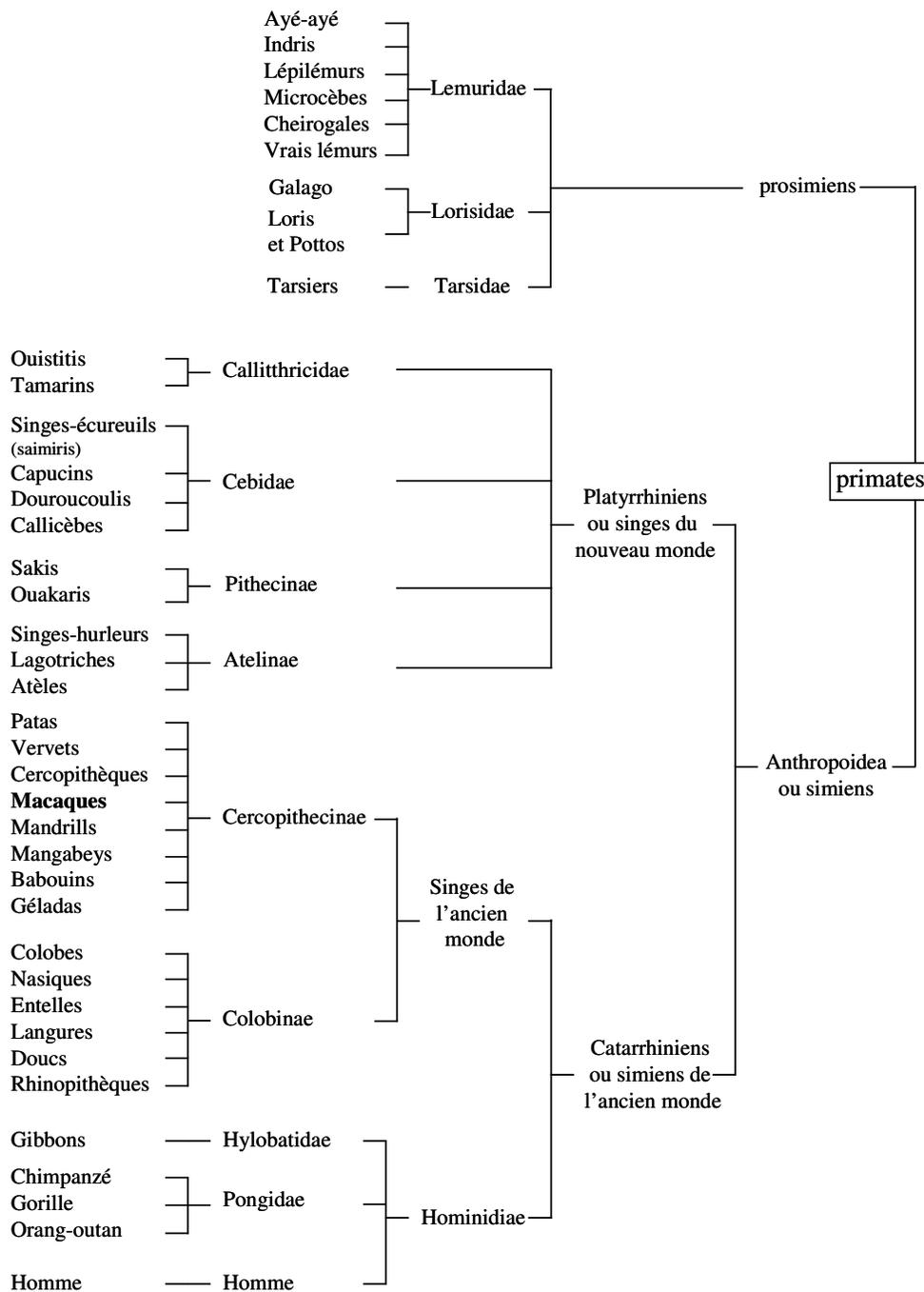


Figure 21 : Classification des primates.

## VIII.2. Le CR1 érythrocytaire

Le CR1 des primates non-humains est moins étudié que celui des hommes, bien que ceux-là servent souvent de modèle à ceux-ci. La clairance par le foie des complexes immuns transportés par les érythrocytes a été observée pour la première fois chez les primates non-humains en 1983 [145], alors que la première caractérisation du récepteur du C3b chez une de ces espèces, le Babouin, ne date que de 1989 [209]. Par chromatographie d'affinité utilisant une colonne de C3i-Sepharose, une molécule de 65 kDa a été isolée de la membrane des érythrocytes du Babouin, celle-ci réagit avec les anticorps monoclonaux dirigés contre le CR1 humain. En utilisant les mêmes techniques, des molécules de 75 kDa et de 135 kDa ont été isolées respectivement sur les érythrocytes de Chimpanzé et de Macaque cynomolgus [162,210]. Chez l'Orang-outan et le Gorille, une forme de CR1 d'une taille proche de la forme humaine (225-220 kDa) est observée [211]. Néanmoins chez ces deux espèces, il existe également des formes plus courtes de récepteur du C3b (73 kDa pour le Gorille et 130 kDa pour l'Orang-outan) comme chez le Babouin, le Chimpanzé et le Macaque cynomolgus. Chez le Babouin, le Chimpanzé et le Macaque cynomolgus, ce CR1 de bas poids moléculaire est codé par un gène homologue au pseudogène humain : *CR1like* (CR1L).

Une étude générale sur 10 espèces a mis en évidence qu'il existait une forme de CR1 de bas poids moléculaire à la surface de tous les érythrocytes de singes [210]. Parmi ces espèces, cinq expriment également une protéine de haut poids moléculaire qui correspond au CR1 (voir Tableau 11, page 63).

La densité de CR1 érythrocytaire chez les primates non-humains est de dix à cent fois supérieure à celle de l'Homme [210, 212], ce qui permet aux érythrocytes de ces espèces de fixer plus de complexes immuns [213]. Les formes courtes de CR1 sont plus exprimées que les formes longues, mais celles-ci compensent cette plus faible densité par une plus forte affinité pour le C3b et le C4b. La faible affinité des formes légères pourrait expliquer la nécessité de leur plus forte densité.

La répartition du CR1, à la surface des érythrocytes de certains primates non-humains (Macaque cynomolgus [212] et *Cercopithecus aethiops* (données personnelles)), est semblable à la répartition en bouquets observée chez l'Homme. Chez le Chimpanzé, il a également été décrit une répartition en bouquets des molécules de *CR1like* érythrocytaires. Ces bouquets plus compacts sont composés d'un plus grand nombre de molécules que chez l'Homme [214].

### VIII.3. Ligands de *CR1like*

Le *CR1like* de Babouin (65kDa) lie uniquement C3b [210]. Le *CR1like* de Chimpanzé (75kDa) lie C3b et C4b *via* un unique site de liaison [215]. Il régule l'activation du complément par une activité de cofacteur avec le facteur I permettant de cliver C3b en C3bi. En revanche, il ne permet pas de cliver C3bi en C3dg [216].

Son affinité est trois à quatre fois plus faible pour les dimères de C3 que le CR1 humain. Les érythrocytes de Chimpanzé transportent 15 à 20 fois plus de complexes immuns que les érythrocytes humains [214].

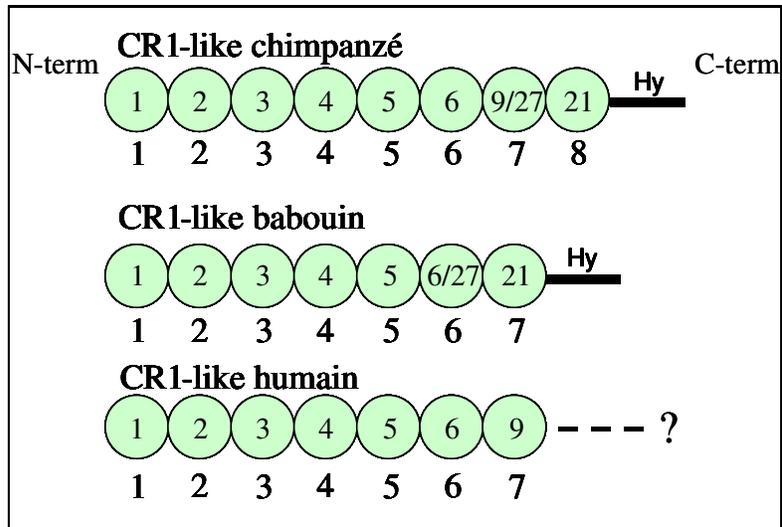
Il n'a jamais pu être montré que C1q soit un ligand du *CR1like* des primates [217].

### VIII.4. Structure de *CR1like*

Les six et demi premiers SCR du *CR1like* de Chimpanzé coïncident avec les six et demi premiers SCR de *CR1like* humain déduits de la séquence génomique. La seconde moitié du septième SCR est homologue à la seconde moitié du SCR 27 de CR1 humain. Le SCR C-terminal est homologue au SCR 21 de CR1 humain.

Les cinq et demi premiers SCR du *CR1like* de Babouin coïncident avec les cinq et demi premiers SCR de *CR1like* humain. La seconde moitié du sixième SCR est homologue à la seconde moitié de SCR 27 de CR1 humain et le SCR C-terminal est homologue au SCR 21 de CR1 humain.

Chez le Chimpanzé et le Babouin, le SCR C-terminal de *CR1like* est suivi d'une courte séquence hydrophobe (Hy) homologue au premier tiers de la région transmembranaire de CR1 humain. Cette séquence est impliquée dans l'ancrage phospholipidique de *CR1like* à la membrane du globule rouge *via* une liaison glycoposphatidylinositol. [217] (Figure 22, page 62).



**Figure 22 :** Arrangement des SCR de *CR1like* chez le Chimpanzé et le Babouin et prédiction des SCR de *CR1like* humain à partir de la séquence génomique *CR1like* humaine. (Hy) : correspond à une courte séquence hydrophobe homologue au premier tiers de la région transmembranaire de CR1 humain. (?) : indique qu'il n'y a pas de SCR supplémentaire ou de région transmembranaire homologue à celle de CR1 humain. D'après Chen *et al.* 2000 [215].

Espèces	Poids moléculaire de CR1 <i>like</i> /CR1 érythrocytaires (kDa)	Poids moléculaire du CR1 <i>like</i> /CR1 leucocytaires (kDa)	Nombre de molécules de CR1/E
Macaque rhésus	165/220	165/220	4700
Macaque cynomolgus	135/200	135/220	6000
Mangabey	68	200* env.	16500
Babouin	64	200* env.	12800
Sykes	145	200* env.	9300
Patas	150	200* env.	1800
Colobe	57/220	200* env.	7700
Gibbon	55/175	200* env.	4200
Chimpanzé	77	200* env.	4300
Gorille	73/220	73/220	15000
Orang-outan	130/225	130/225	6800
Homme	200 env.	200 env.	100-1000

**Tableau 11 : Poids moléculaire et densité du CR1 chez les primates [209-211].**

env. : environ ; \* : espèce n'exprimant que CR1 leucocytaire.

### VIII.5. Le CR1 à la surface des leucocytes

Contrairement aux érythrocytes, les leucocytes expriment majoritairement la forme de CR1 de haut poids moléculaire. A part chez le Gorille, l'Orang-outan et les Macaques rhésus et cynomolgus, la forme de bas poids moléculaire n'est pas exprimée à la surface des leucocytes. Le Gorille, l'Orang-outan et les Macaques rhésus et cynomolgus expriment CR1 et CR1*like* avec un rapport de densité inversé par rapport à celui observé sur les érythrocytes [210], (tableau 11, page 63).

## VIII.6. Bases génétiques

Deux théories permettent d'expliquer la présence de deux formes de CR1 à la surface des cellules de certains primates : l'épissage alternatif ou l'existence de deux gènes différents. L'équipe de John Atkinson a isolé plusieurs ADNc chez le Chimpanzé. L'un de 6044 nucléotides code pour le CR1 de 220 kDa [218]. Cette séquence présente une homologie de 98.8% avec le gène codant pour le CR1 humain. En utilisant d'autres amorces de PCR un autre ADNc (nommé CR1a) de 1985 nucléotides codant pour une molécule composée du peptide signal, des SCR 1 à 6, 28 à 30, de la partie transmembranaire et cytoplasmique du CR1 a été isolé. Compte tenu des six sites potentiels de N-glycosylation, le poids moléculaire prévisible de cette molécule est de 75 kDa. Un dernier ADNc (nommé CR1b) de 1731 nucléotides existe également. Il code pour une molécule composée de huit SCR suivis d'une région hydrophobe et d'un codon stop. Cette molécule présente une homologie importante (94,7 %) avec la séquence du CR1 de Chimpanzé et une homologie très importante (97,4 %) avec la séquence du CR1*like* humain [78]. Le poids moléculaire prévisible de cette forme de CR1 est de 65 kDa.

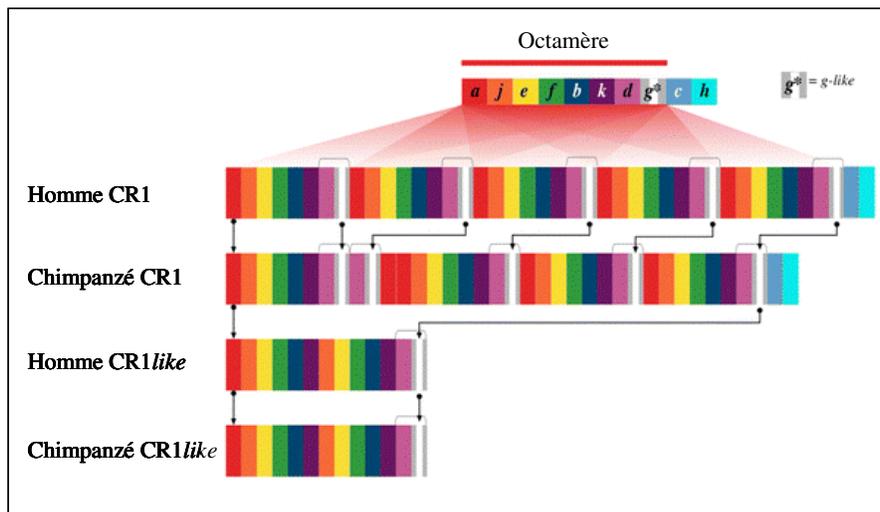
Du fait de sa totale homologie avec l'ADNc codant pour le CR1 de Chimpanzé, le CR1a semble être issu d'un épissage alternatif. De part sa taille prévisible, cette molécule semblait être la meilleure candidate pour la forme courte de CR1 à la surface des érythrocytes de Chimpanzé.

L'absence de région codant pour une partie intracytoplasmique dans CR1b, conduit à la synthèse d'une molécule plus instable. De plus, aucune molécule de 65 kDa n'a jamais été isolée chez le Chimpanzé, que ce soit par des anticorps anti-CR1 ou par affinité avec le C3b. Tous ces indices permettaient d'imaginer que l'ARNm CR1b n'était pas traduit, comme cela semble être le cas des séquences CR1*like* chez l'Homme.

Une deuxième étude de la même équipe, menée cette fois chez le Babouin [219] contredit ces conclusions. Un ADNc homologue au CR1 b de Chimpanzé existe chez le Babouin, cet ADNc code pour une molécule de sept SCR et d'un poids moléculaire prévisible de 52 kDa alors que la forme courte de CR1 chez le Babouin est de 65 kDa. Mais la transfection de CR1b de Babouin dans des cellules eucaryotes conduit à l'expression d'une protéine à ancrage glycoposphatidylinositol d'un poids moléculaire équivalent à celui de la forme courte de CR1 chez le Babouin. Il est donc possible qu'il en soit de même chez le Chimpanzé.

Cette étude amène aussi une autre hypothèse, si CR1 b est exprimé chez certains primates, on peut supposer que les séquences CR1like de l'Homme pourraient également l'être. Mais jusqu'à présent aucune forme de CR1 correspondant au gène CR1like n'a pu être isolée chez l'Homme. Toutefois, une étude récente a permis de détecter des ARNm de CR1like dans le foie, la rate et le thymus de fœtus humain ainsi que dans la moelle osseuse d'adultes [80].

McLure *et al.* [81] ont identifié après analyse des séquences génomiques de CR1 et CR1like (CR1L) chez l'Homme et le Chimpanzé, la présence d'un SCR supplémentaire dans chaque unité LHR. Cet SCR nommé *g-like* est dégénéré. Il n'est pas traduit et donc absent des protéines CR1 et CR1like. Les *g-like* se caractérisent par la présence d'un codon stop prématuré. Les gènes CR1 humain et Chimpanzé comportent 5 *g-like*. Les gènes CR1L humain et Chimpanzé comportent un *g-like* chacun. Ainsi l'unité LHR contient 8 SCR plutôt que 7 et forment un octamère composé des sous familles de SCR toujours arrangées dans le même ordre *ajefbkdg-like*. Le gène CR1 contient 42 SCR plutôt que 37. L'octamère *ajefbkdg-like* est retrouvé plusieurs fois dans le gène CR1 et une seule fois dans le gène CR1like. Le second octamère du CR1 de Chimpanzé a perdu les six SCR situés entre le premier et le second *g-like*. Les *g-like* bien que non traduits semblent s'être maintenus au cours de l'évolution au sein de CR1 chez l'Homme et le Chimpanzé comme le montrent les flèches de la figure 23 (page 65).



**Figure 23 : Localisation génomique du nouveau SCR *g-like* au sein des gènes CR1 et CR1like chez l'Homme et le Chimpanzé. D'après McLure *et al.* 2004 [81].**

## IX. Le CR1 chez les rongeurs

Les rongeurs sont souvent utilisés dans des modèles de maladies impliquant le système immunitaire. La possibilité de faire des souris transgéniques ou déficientes pour certains gènes (souris « *Knock-out* ») permet d'étudier précisément les fonctions de nombreuses protéines. Malheureusement, chez les rongeurs les récepteurs du complément présentent de nombreuses différences avec les récepteurs humains.

### IX.1. Protéines récepteurs des fragments du C3

Contrairement aux érythrocytes de primates, les érythrocytes des rongeurs ne participent pas à la clairance des complexes immuns. Chez les rongeurs, les plaquettes sont les principales cellules impliquées dans la fixation et la clairance des complexes immuns.

#### IX.1.1. Chez la souris

Chez la souris, cinq protéines réagissant avec les différents fragments du C3 ont été isolées.

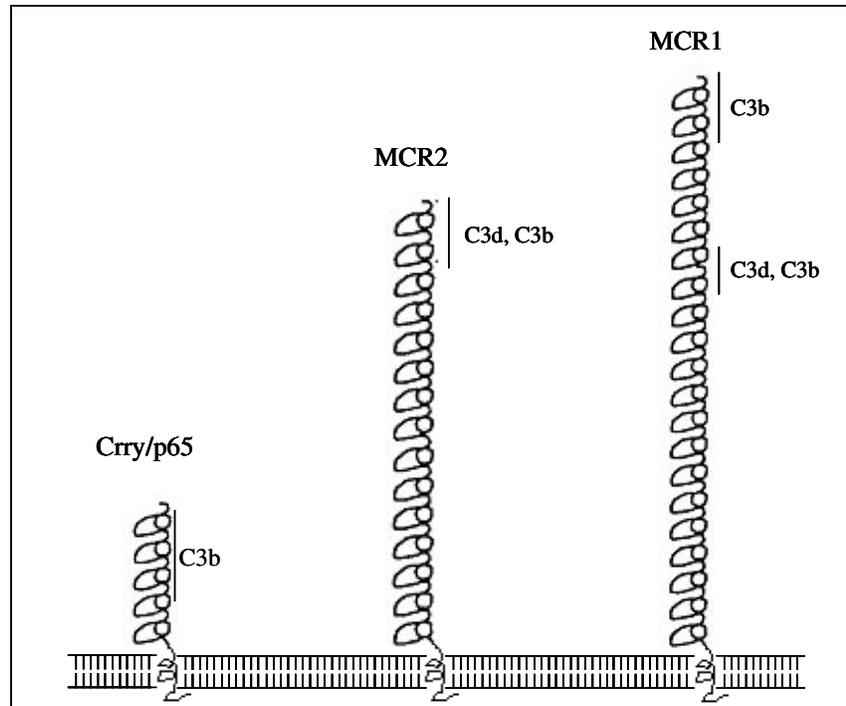
- Crry/p65 (voir Figure 24, page 68) est une protéine membranaire de 65 kDa présente à la surface de pratiquement tous les types cellulaires, seules les cellules issues de la lignée neuronale ne l'expriment pas [220]. Elle a une structure très proche de celle de CR1, elle a d'ailleurs été isolée grâce à des anticorps spécifiques du CR1 humain [221]. Le Crry/p65 est composée de cinq SCR. C'est un récepteur du C3b comme CR1, mais sa fonction est proche de celle de DAF et de MCP chez l'Homme, il régule l'activation de la voie alterne et de la voie classique du complément [136] en inhibant les C3 et C5 convertases. Comme MCP, il est le cofacteur du facteur I. Crry est rapporté comme indispensable à la protection des érythrocytes contre une activation spontanée du complément [223]. Crry/p65 a aussi un rôle de co-stimulateur dans l'activation des lymphocytes CD4 murins [224]. Des souris gestantes et invalidées pour ce gène (Crry<sup>-/-</sup>) meurent après l'activation de la voie classique due à un dépôt anormal de complément dans le placenta. Cela suggère une régulation des molécules du complément au cours du développement du placenta et notamment l'intervention du C3 dans le développement vasculaire de cet organe [225].
- MCR2 (voir Figure 24, page 68) est un des récepteurs du C3d chez la souris. C'est une glycoprotéine membranaire de 150 kDa. Constituée de 15 SCR (comme la forme humaine de CR2), elle a une forte homologie (67%) avec le CR2 humain [226].

Présente à la surface des lymphocytes B matures et des cellules dendritiques folliculaires, MCR2 semble jouer le même rôle que le CR2 humain dans la réponse des lymphocytes B aux antigènes. Le site de liaison au C3d est situé au niveau des SCR 1 et 2 [227].

- MCR1 (voir Figure 24, page 68) est un des récepteurs du C3b et du C3d chez la souris. C'est une glycoprotéine membranaire de 190 kDa constituée de 21 SCR [228]. Elle présente de nombreuses analogies avec MCR2. Ces deux molécules sont exprimées par les mêmes cellules et présentent une parfaite homologie au niveau de leur partie intracytoplasmique, transmembranaire et des 15 premiers SCR C-terminaux. Les 6 SCR suivants présentent une homologie partielle avec le CR1 humain. MCR1 a un site de fixation pour le C3b au niveau des SCR 1 et 2 et un site pour le C3b et le C3d au niveau des SCR 7 et 8 [227,229]. Contrairement au CR1 humain, il ne semble pas capable de fixer le C4b. Bien que possédant le même site de fixation pour le C3d que MCR2, la liaison de MCR1 à C3d est très faible. MCR1 est un des cofacteurs du facteur I [228], pourtant sa capacité à réguler le dépôt de C3 à la surface des cellules qui l'expriment semble faible (beaucoup plus faible que celle de Crry/p65) [230].

MCR1 et MCR2 ne sont pas exprimés à la surface des plaquettes [231]. Crry/p65 est exprimé très faiblement à la surface de ces cellules. Pourtant les plaquettes sont responsables de la clairance des complexes immuns chez les rongeurs.

Deux nouveaux récepteurs du complément exprimés par les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles non-activés ont été mis en évidence [232]. Ces deux molécules nommées C3bR-190 et C3dR-150 (190 et 150 kDa) sont respectivement les récepteurs pour le C3b et le C3d. Ils sont bien distincts de MCR1, MCR2 et Crry/p65, mais leur structure reste pour l'instant inconnue.



**Figure 24 : Représentation schématique des principales formes des récepteurs du complément chez les rongeurs.**

### **IX.1.2. Chez le rat**

Chez le rat, à la surface des plaquettes et des polynucléaires neutrophiles, existent deux récepteurs du C3b de 80 et 200kDa (nommés C3bR-80 et C3bR-200) [233]. Les cellules de rat expriment également des homologues de Crry/p65 de poids moléculaire de 65 et 75 kDa [234]. Crry/p65 serait impliqué dans la régulation de l'activation et de l'adhésion cellulaire des thymocytes [235]. Il intervient dans la prolifération des thymocytes par l'intermédiaire de LFA-1 (leukocyte functional antigen-1) [236]. En collaboration avec CD59, dans un modèle *in vivo*, il protège le rein des lésions complément dépendantes [237].

### **IX.1.3. Chez le lapin et le cobaye**

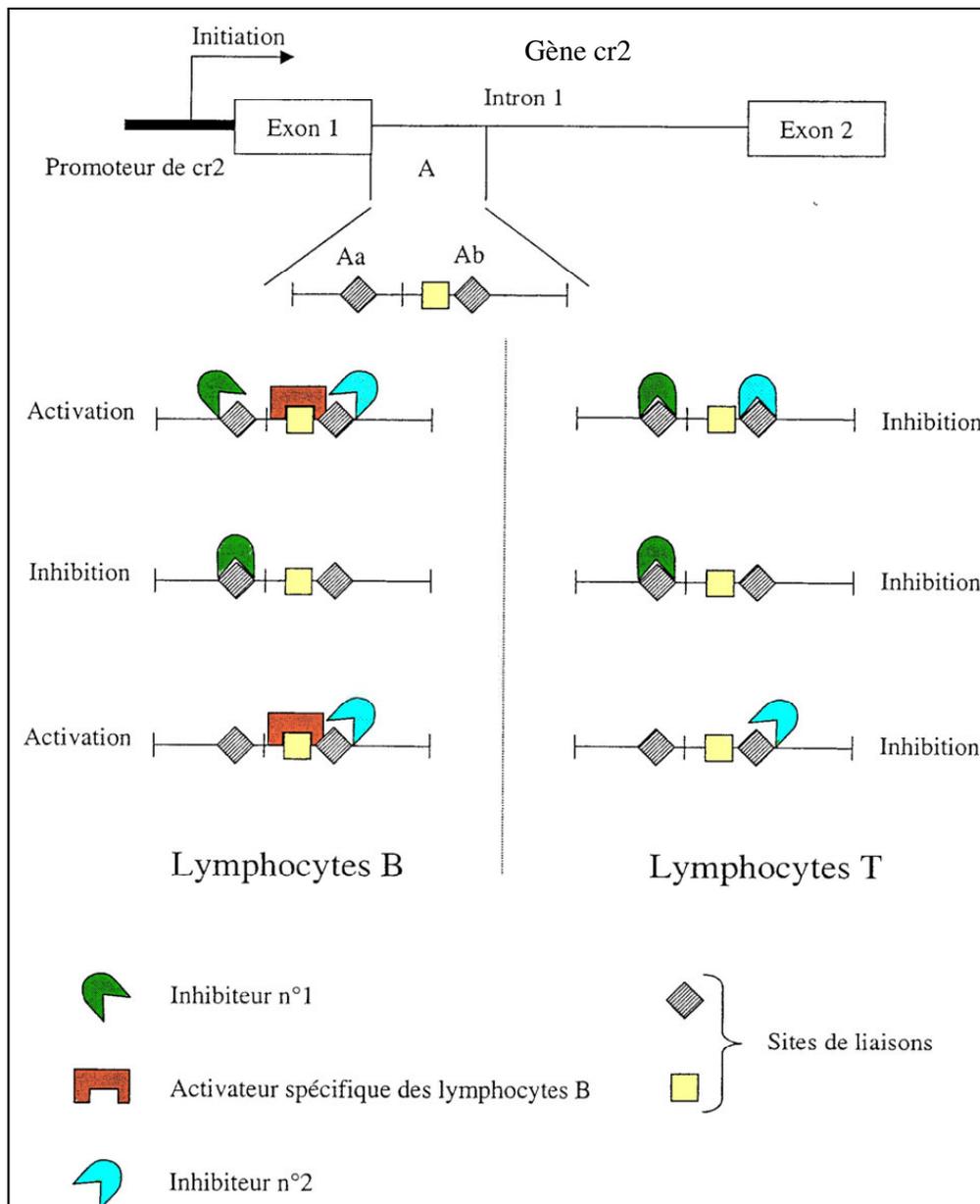
Chez le lapin, les plaquettes et les leucocytes expriment un récepteur pour le C3b de 150 kDa [238].

Les cellules du foie de cobaye expriment une protéine intracellulaire de 20 kDa appelée crrp. Cette protéine présente une forte homologie avec le CR1 humain [239].

## **IX.2. Bases génétiques**

Le MCR1 et le MCR2 sont tous les deux codés par un même gène nommé *cr2*. L'ARN transcrit de ce gène subit un épissage alternatif qui explique l'expression de deux molécules différentes [240,241]. Quatre ARN de 3, 5, 9 et 11 kb sont issus de la transcription de *cr2*. La traduction des ARNm de 3 et 5 kb conduit à l'expression de MCR2 et MCR1 respectivement [150]. Les ARN de 9 et 11 kb sont probablement partiellement épissés. Le *cr2* est localisé sur le chromosome 1 de la souris [230,243], comme les gènes codant pour la C4bp et le facteur H murin [244]. La comparaison avec le RCA humain (voir II.7) n'est pas totalement valable, *cr2* bien que lié aux autres gènes, ne semblent pas appartenir à la même région.

Le promoteur de *cr2* contient au moins trois sites de liaisons pour des protéines liant l'ADN. Quatre protéines ont été isolées, deux sont connues. Il s'agit de Oct-1 et Oct-2, elles sont exprimées par les lymphocytes B et activent la transcription des gènes en aval du promoteur. Dans les lymphocytes B, l'expression de l'ARNm dérivant de *cr2* est corrélée à l'expression de Oct-2 [245]. Ce système de régulation n'est pas le seul responsable de l'expression restreinte de *cr2* aux lymphocytes B. Deux régions (nommée Aa et Ab) du premier intron de *cr2* (comprises entre l'exon codant pour le peptide signal et celui codant pour le premier SCR) contrôlent la transcription de *cr2*. Aa et Ab contiennent chacune un site de liaison pour un inhibiteur de la transcription du gène chez les lymphocytes T et B. Ab contient un site de liaison pour un activateur de la transcription présent uniquement dans les lymphocytes B (voir Figure 25, page 70) [246].



**Figure 25 : Représentation schématique des mécanismes de régulation de la transcription de *cr2*. D'après Hu H. *et al.* 1997 [246].**

Le *Crry/p65* est codé par un gène sur le chromosome 1 à moins de 10 kb de *cr2*. La transcription de ce gène est régulée par une séquence en 5'. Cette séquence GGAA est connue pour être le site de fixation des protooncogènes ets [247].

### IX.3. Applications à l'Homme

Comme pour le gène du CR2 humain, la transcription de *cr2* est régulée par des séquences introniques. Il serait intéressant d'étudier la séquence intronique du gène de CR1 contenant le site *Hind* III lié à la densité de CR1 à la surface des érythrocytes. Il existe peut-être dans cette zone des séquences spécifiques de protéines de régulation de la transcription.

L'homologie entre les séquences et la localisation des gènes *cr2*, *Crry*/p65 chez la souris et de CR1 chez l'Homme permet d'envisager un mécanisme expliquant l'évolution des gènes de CR2 et CR1. Une structure de 60 nucléotides codant pour un SCR, a pu évoluer par duplication et donner naissance aux gènes du facteur H, de la C4bp, de DAF, de MCP, de *cr2* et d'un gène proche de *Crry*. Par duplications ce dernier gène a pu évoluer vers le gène de *Crry* chez les rongeurs et de CR1 chez l'Homme (voir Figure 26, page 71)[248].

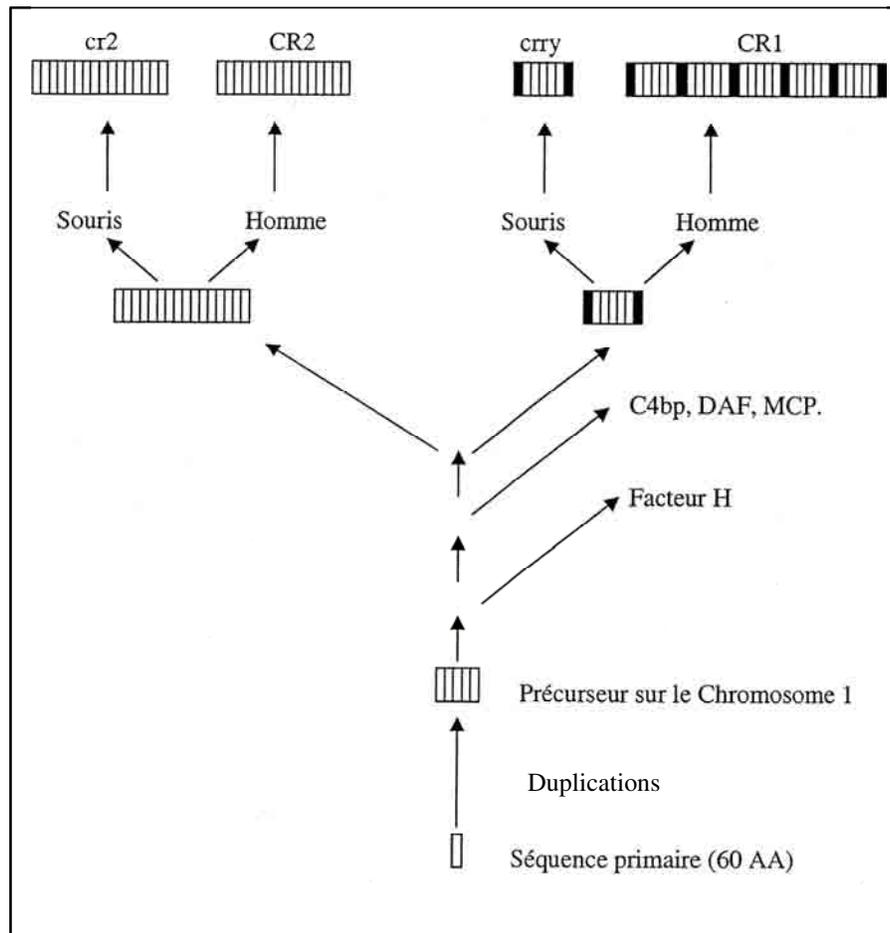


Figure 26 : Evolution probable des gènes des récepteurs du complément. D'après Paul M.S. *et al.* 1989 [248].

Une autre donnée confirme cette hypothèse. Le gène *cr2* contient une région présentant de fortes homologies avec le gène du CR1 humain et le gène de *Crry*. Cette région est également retrouvée dans le gène codant pour le CR2 humain [249], dans une zone comprise entre la séquence codant pour le peptide signal et celle codant pour le premier SCR. Cet exon semble fonctionnel, mais n'est pas maintenu dans l'ARNm mature, il s'agit probablement d'un pseudo exon.

## X. CR1 et pathologies

### X.1. CR1 et Paludisme

Les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* sont capables de former des rosettes avec les autres érythrocytes non-infectés. Cette adhérence est engendrée par l'expression de molécules d'adhésion à la surface des érythrocytes parasités, notamment, une protéine membranaire appelée PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) qui permet leur fixation aux cellules endothéliales [250]. L'exposition des érythrocytes à *Plasmodium falciparum in vitro* n'induit pas de modification de la densité de CR1/E [251].

Les érythrocytes des individus de phénotypes Knops null (Voir VII) exprimant un taux faible de CR1/E forment moins de rosettes avec les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*, mais ceci n'empêche pas, *in vitro*, l'infection de ces cellules par le parasite. CR1 est un ligand de PfEMP1 permettant la formation de rosettes entre les érythrocytes [250].

Cockburn *et al* ont montré qu'en Papouasie Nouvelle Guinée, les populations vivant dans les régions où le paludisme est endémique, présentent une densité CR1/E basse qui les protègent des complications sévères de la maladie [252].

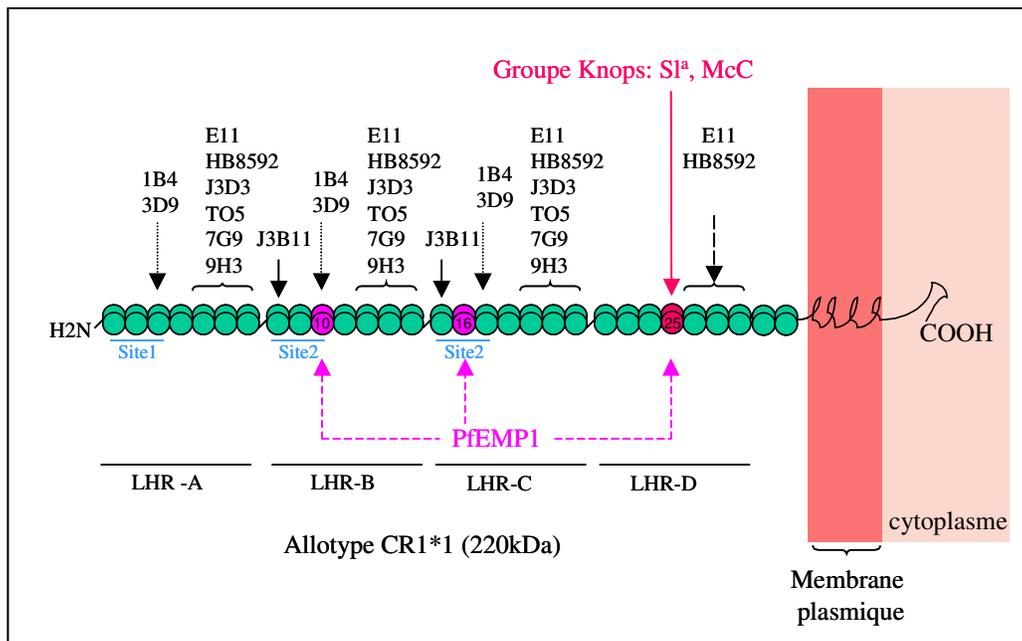
Les régions de CR1 impliquées dans la formation des rosettes avec le clone R29 de *P. falciparum* correspondent aux sites de liaison de C3b des LHR-B et LHR-C et impliquent plus particulièrement les SCR 10 et 17 [253]. La formation des rosettes est aussi influencée par le SCR25, porteur des antigènes McC et S1<sup>a</sup> [73]. L'anticorps monoclonal anti-CR1 J3B11 dont les épitopes sont reportés dans la figure 27 (page 73) permet d'inhiber la formation de rosettes entre érythrocytes sains et érythrocytes infectés par la souche R29 de *P. falciparum*. D'autres molécules comme CD36 [254], les oligosaccharides des groupes sanguins ABO [255], les immunoglobulines [256-258] et les héparanes sulfates *like* peuvent aussi être impliquées dans la formation des rosettes [253].

Dans les régions endémiques pour *Plasmodium falciparum*, on observe une importante

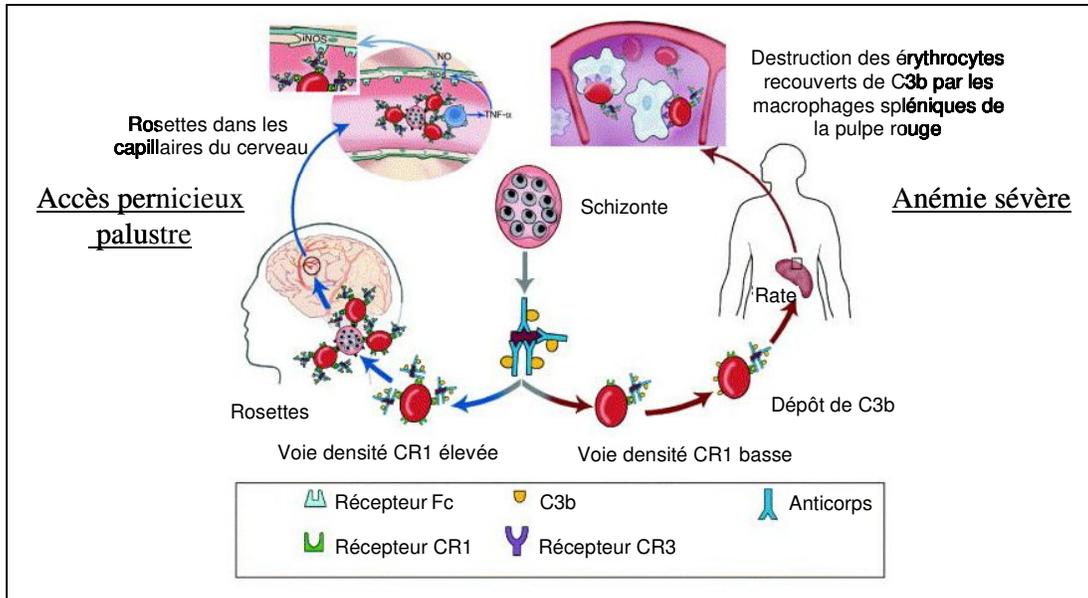
population n'exprimant pas le groupe sanguin SI<sup>a</sup> (antigène porté par CR1) alors que ce groupe est très commun chez les caucasiens. Les érythrocytes SI<sup>a</sup>(-)(SI2) fixent moins PfEMP1 que les érythrocytes SI<sup>a</sup>(+) (SI1), ce groupe sanguin serait donc un facteur protecteur vis à vis de *P.falciparum*, il en serait de même pour le groupe sanguin McC<sup>b</sup>(+) [250]. Au Kenya, le rôle protecteur de l'allèle SI2 vis à vis de l'accès pernicieux palustre a été démontré [259].

Chez la souris, on observe également que les érythrocytes murins infectés par *Plasmodium berghei* sont plus résistants à l'attaque par le complément. Ceci s'expliquerait par l'expression à la surface de ces cellules de formes modifiées de DAF, HSA (pour *heat stable antigen*, un inhibiteur de la formation de CAM) et Crry (une des formes de CR1 chez les rongeurs, voir IX)[260].

Chez l'Homme, il a été montré que plus la densité de CR1 érythrocytaire était élevée et plus il se formait des rosettes [250]. La formation des rosettes contribue à la pathogénie de l'accès pernicieux palustre par obstruction des capillaires cérébraux et ainsi diminution du flux sanguin [261]. Une seule étude a montré l'implication des rosettes dans l'anémie sévère associée à la malaria [262].



**Figure 27 : Localisation des épitopes des anticorps monoclonaux anti-CR1. D'après Nickells *et al.* 1998 [117]; Chen *et al.* 2007 [118]. Localisation des antigènes de groupes sanguins Knops : SI<sup>a</sup> et McC. D'après Moulds J. 2001 [73]. SCR impliqués dans la liaison à PfEMP1 lors de la formation des rosettes. D'Après Rowe *et al.* 2000 [253].**



**Figure 28 : Complications palustres en fonction de la densité CR1/E. D’après Stoute *et al* 2005 [263].**

Stoute *et al.* suggèrent que la densité de CR1 érythrocytaire oriente vers l’une ou l’autre de ces deux complications : l’accès pernicieux palustre ou l’anémie sévère associée à la malaria. Les complexes immuns produits au cours de l’infection, après libération d’antigènes par la rupture des schizontes sont captés par les érythrocytes *via* CR1. Les érythrocytes des individus dont la densité en CR1 est faible sont détruits par les macrophages de la pulpe rouge de la rate, ce qui conduit à l’anémie sévère. Ce processus pourrait également apparaître après une chute de la densité de CR1 consécutive à des attaques répétées de la malaria. Les individus dont la densité de CR1 érythrocytaire est plus élevée portent à la surface de leur membrane plus de complexes immuns. Ils ont une plus grande opportunité de former des rosettes impliquées dans l’obstruction des capillaires cérébraux. C’est là que les complexes immuns interagissent avec les monocytes et les cellules endothéliales pour produire les médiateurs pro-inflammatoires responsables de l’accès pernicieux palustre [263] (Figure 28, page 74).

Une étude récente confirme cette hypothèse. Chez les enfants atteints d’anémie sévère on constate un déficit de CR1 et DAF érythrocytaires qui s’accompagne d’une baisse de capacité de liaison aux complexes immuns et d’une augmentation de C3b *in vivo*. Ces modifications sont spécifiques de l’anémie sévère et pas de l’accès pernicieux palustre [264].

Une autre étude en contradiction avec la précédente ne trouve pas de corrélation entre le niveau des protéines régulatrices CR1 et DAF, et l'anémie sévère [265].

## **X.2. Paludisme et variation de la structure de CR1 à travers les espèces de primates**

Les différences de polymorphismes structuraux de CR1 entre les primates humains et non-humains pourraient avoir un rapport avec la malaria.

Premièrement, le SCR25 est impliqué dans la relation « CR1-malaria » et ce SCR25 est absent des formes de CR1 exprimées (*CR1like*) à la surface des érythrocytes des primates non-humains comme le Chimpanzé ou le Babouin [215,218,266].

Deuxièmement, le *CR1like* est dépourvu des sites 2 (SCR 8,9 et 10 et SCR 15,16 et 17) [267] impliqués dans l'adhérence à l'adhésine malariale PfEMP1. Pour compenser cette absence de sites 2, la mutation de 2 acides aminés dans le site 1 permet au *CR1like* d'augmenter son efficacité de liaison pour C3b et de réaliser ainsi l'adhérence immune [266]. D'ailleurs l'absence de parasitémie chez les primates non-humains est corrélée avec l'absence des SCR 25 et du site 2 [268].

Troisièmement, la différence entre les formes érythrocytaires CR1 et *CR1like* est leur mode de fixation à la membrane. CR1 est transmembranaire et *CR1like* se caractérise par une liaison glycoposphatidylinositol (GPI) [215,218]. Or les liaisons GPI pourraient avoir un rôle protecteur contre la malaria [267].

L'absence de SCR25, de site 2 et la liaison GPI sont des caractéristiques des récepteurs érythrocytaires *CR1like* retrouvés chez les primates résistants à *P. falciparum* (Tableau 12, page 76). L'idée que ces primates ont favorisé au cours de l'évolution, comme moyen de protection contre *P. falciparum*, l'expression de *CR1like* à la surface de leurs érythrocytes est renforcée par le fait que ces espèces de primates ont maintenu l'expression du CR1 long de type « humain » à la surface de leurs leucocytes [267].

Espèces de <i>Plasmodium</i>	Hôte naturel	Hôte expérimental	Infectieux pour l'Homme
<i>P. cynomolgi</i>	<i>M. fascicularis, M. radiata, M. mulatta</i>	<i>Aotus, Cercopithecus aethiops, Papio papio</i>	oui
<i>P. gonderi</i>	<i>Cercocebus aterrimus, C. atys, C. galeritus agilus, Mandrillus leucophaeus</i>	<i>Cercopithecus aethiops, Macaca mulatta, M. radiata, Papio anubis</i>	non
<i>P. coatneyi</i>	<i>Macaca fascicularis</i>	<i>Macaca arctoides, M. mulatta, M. nemestrina, Presbytis cristanus</i>	
<i>P. fragile</i>	<i>Macaca radiata</i>	<i>Macaca mulatta</i>	non
<i>P. fieldi</i>	<i>Macaca nemestrina</i>	<i>Macaca mulatta</i>	non
<i>P. simiovale</i>	<i>Macaca sinica</i>	<i>Macaca mulatta</i>	non
<i>P. inui</i>	<i>Cynopithecus niger, Macaca cyclopsis, M. Fascicularis, M. mulatta, M. nesmestrina, M. radiata, Presbytis cristatus, P. obscurus</i>	<i>Macaca mulatta, Cercophitecus mitis, Aotus, Saimiri sciureus</i>	oui
<i>P. shorti</i>	<i>Macaca radiata</i>	<i>Macaca mulatta</i>	non
<i>P. knowlesi</i>	<i>Macaca fascicularis, M nemestrina, Presbitis melalophus</i>	<i>Macaca mulatta, Aotus, Callithrix jacchus, Cynocephalus papio, Hylobates hoolock, Saimiri sciureus</i>	oui
<i>P. brasilianum</i>	<i>Alouatta fusca, A. palliata, Ateles fusciceps, A. geoffroyi, Aotus, Brachyteles arachnoides, Callicebus moloch ornatus, C. torquatus, Cebus albifrons, C. apella, C. capucinus, Chiropotes chiropotes, Logathrix cana, L. infumata, Saimiri boliviense, S. sciureus</i>	<i>Aotus, Callithrix jacchus, Saguinus geoffroyi</i>	oui
<i>P. simium</i>	<i>Alouatta fusca, Brachyteles arachnoides</i>	<i>Alouatta villosa, Aotus, Ateles fusciceps, A. geoffroyi, A. paniscus, Callithrix jacchus, Cebus capucinus, Lagothrix lagotricha, Saguinus geoffroyi, Saimiri</i>	oui
<i>P. falciparum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Pan troglodytes, Aloutta villosa, Aotus, Saimiri sciureus, Ateles fusciceps, Cebus capucinus, Saguinus geoffroyi</i>	oui
<i>P. vivax</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Pan troglodytes, Aotus, Ateles fusciceps, A. geoffroyi, Saguinus mystax, Saimiri sciureus</i>	oui
<i>P. malariae</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Aotus</i>	oui
<i>P. eylesi</i>	<i>Hylobates lar</i>		oui
<i>P. hylobati</i>	<i>Hylobates moloch</i>		non
<i>P. jeffeyi</i>	<i>Hylobates lar</i>		non
<i>P. youngi</i>	<i>Hylobates lar</i>		non
<i>P. schwetzi</i>	<i>Pan troglodytes, Gorilla gorilla</i>		oui
<i>P. reichenowi</i>	<i>Pan troglodytes, Gorilla gorilla</i>		non
<i>P. rhodaini</i>	<i>P. stayrus verus</i>		non
<i>P. pitheci</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>		non
<i>P. silvaticum</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>		non
<i>P. girardi</i>	Lemurs		non
<i>P. girardi</i>	Lemurs		non
<i>P. berghei</i>	<i>Thamnomys surdaster</i>	<i>Rattus, Mus</i>	non
<i>P. lophurae</i>	<i>Lophura igniti</i>	<i>Gallus, Mus</i>	non
<i>P. gallinaceum</i>	<i>Gallus sonneratii</i>	<i>G. gallus</i>	non

**Tableau 12 : Les différentes espèces de *Plasmodium* et leurs hôtes naturels et expérimentaux. D'après Collins WE. 1988.**

### **X.3. CR1 et infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine)**

Le rôle des récepteurs du complément dans l'infection par le VIH est ambigu. D'un côté ils font partie du système immunitaire et protègent l'organisme, de l'autre ils permettent l'infection de certains types cellulaires et activent la réplication du virus dans les cellules infectées. Il serait difficile de résumer ici tous les articles publiés à ce sujet, pour plus d'informations Speth *et al.* ont publié une excellente et exhaustive revue sur ce sujet [269].

#### **X.3.1. Diminution de la densité de CR1/E chez les sidéens**

L'infection par le VIH peut engendrer une diminution de la densité de certains récepteurs du complément à la surface de plusieurs types cellulaires. Notamment, on constate une diminution de l'expression de CR2 par les lymphocytes T, de CR1 et CR2 par les lymphocytes B [270,271], de CR1 à la surface des podocytes glomérulaires et des érythrocytes [272].

La diminution de la densité de CR1/E est acquise [4] et corrélée à la sévérité de la maladie [273]. Les phénomènes expliquant cette réduction semblent être les mêmes que ceux impliqués dans les maladies à complexes immuns (voir X.4). La production quotidienne d'un grand nombre de virus par l'organisme aboutit en effet à la formation de complexes immuns. Une étude récente a montré que dans un modèle *in vitro*, les complexes immuns VIH-CI mais aussi le virus VIH-1 seul, en absence d'anticorps spécifiques, se fixent aux érythrocytes en présence de complément. Cette adhérence correspond à la réaction d'adhérence immune classique. Elle implique le CR1 érythrocytaire et ses sites de liaison aux C3b/C4b. VIH-CI et VIH activent la voie classique du complément, fixent des fragments C3 et se lient au CR1 érythrocytaire. C1q a été décrit comme indispensable à cette réaction d'adhérence [274]. Il a été rapporté la présence d'autoanticorps anti-CR1 circulant qui n'ont toutefois pas de rôle direct dans la perte de CR1 [275].

### **X.4. CR1 et maladies à complexes immuns**

#### **X.4.1. Définitions des maladies à complexes immuns**

Normalement les complexes immuns formés au cours de la réaction antigène-anticorps sont éliminés rapidement par les macrophages (voir III.6). Les maladies à complexes immuns se caractérisent par un dépôt de ces complexes dans les tissus où ils provoquent des lésions

inflammatoires. Cette inflammation est connue sous le nom d'hypersensibilité de type III de la classification de Gell et Coombs. La non-clairance des complexes immuns est provoquée par une production importante en quantité et en durée d'antigènes (dans le cas de maladies infectieuses chroniques ou en cas de présence persistante d'antigènes exogènes) ou d'anticorps (dans le cas des maladies auto-immunes). Les différentes maladies à complexes immuns sont indiquées dans le Tableau 13 (page 78).

L'hypersensibilité de type III s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'un afflux de polynucléaires sur le lieu de dépôt des complexes immuns. Ne pouvant capturer ces complexes, les polynucléaires libèrent leurs enzymes dans les tissus et provoquent des lésions.

Types de maladies	Complexes circulants	Lieu de dépôts des complexes immuns				
		vaisseaux	reins	articulations	peau	Autres organes
Polyarthrite rhumatoïde	+	+		+		
Lupus érythémateux disséminé	+	+	+	+	+	Cerveau
Périartérite noueuse	+	+	+			Muscle, foie
Polymyosite Dermatomyosite		+			+	Muscle
Vascularite cutanée	+	+			+	
Alvéolite fibrosante	+					Poumons
Cryoglobulinémie	+	+	+	+	+	
<b>Maladies Infectieuses</b>						
Lèpre	+		+	+	+	Yeux
Endocardite infectieuse	+	+	+			Cœur
Paludisme	+		+			
Trypanosomiase	+	+	+			Cœur cerveau
Hépatite	+	+	+	+		Foie
Fièvre hémorragique de la dengue	+		+		+	

**Tableau 13 : Exemples de maladies à complexes immuns. D'après Roitt I.M. *et al.* 1994.**

#### **X.4.2. Diminution de la densité de CR1/E dans les maladies à complexes immuns**

La diminution de la densité de CR1/E dans les maladies à complexes immuns est un phénomène bien documenté. Elle a été notamment observée chez les patients atteints de lupus érythémateux disséminés [113,114,160,276], de polyarthrite rhumatoïde [277], de syndrome de Sjögren [278] ou de sclérodermie. Contrairement à ce qui avait été envisagé au début des années 1980 [160,276,279], cette diminution est acquise [280] et est corrélée à l'intensité de la maladie [281].

La diminution de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes des patients lupiques est également retrouvée à la surface des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes B [282]. Pour les leucocytes, la baisse de densité de CR1 a été corrélée à une baisse du niveau de transcription du gène CR1 [283].

Un génotype codant pour une densité initiale faible de CR1/E n'est pas un facteur prédisposant aux maladies à complexes immuns [284], par contre l'allèle CR1\*2 [285] ou l'allèle CR1\*3 [286] sont sur-représentés chez certaines populations de patients lupiques mais ces résultats ne sont pas confirmés par toutes les publications [287].

#### **X.4.3. Conséquence sur la clairance des complexes immuns**

L'étude de la clairance des complexes immuns chez les lupiques a été faite en utilisant des complexes immuns préformés [154,288]. Après injection, une faible quantité de complexes immuns se fixe aux érythrocytes des patients lupiques (26% contre 63% chez les sujets normaux). Ceci s'explique à la fois par une faible densité de CR1 à la surface des érythrocytes et par une opsonisation médiocre des complexes immuns.

La clairance des complexes immuns peut être divisée en deux périodes.

La première, de courte durée (inférieure à 30 min), suit l'injection et correspond à l'élimination des plus gros agrégats. Chez les patients lupiques, on observe une augmentation de la vitesse de disparition des complexes durant cette période. Ces complexes de tailles importantes sont ceux qui sont les mieux fixés par les érythrocytes et les plus rapidement transportés vers le foie. Chez les patients lupiques, la faible fixation de ces complexes par les érythrocytes entraîne leur dépôt dans les tissus et explique leur disparition rapide du plasma. La deuxième période qui correspond à l'élimination lente de la fraction de complexes de tailles insuffisantes pour être fixés par les érythrocytes, n'est pas différente chez les patients lupiques et chez les sujets sains.

## **X.5. CR1 et Syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS)**

Le CR1 semble impliqué dans la pathogenèse immune du SRAS. Une première étude a montré que la densité de CR1 érythrocytaire chute pendant les phases d'initiation et de progression de la maladie au cours des 2 premières semaines. Elle revient proche de la normale au cours de la phase de convalescence (entre la deuxième ou troisième semaine jusqu'à la septième ou huitième semaine) [289].

## **X.6. CR1 et prééclampsie**

La densité de CR1 érythrocytaire est diminuée chez les patientes prééclamptiques et la baisse de densité est corrélée à la sévérité de la maladie [290].

# **XI. Mécanismes expliquant la diminution de la densité de CR1/E**

Les hypothèses expliquant la diminution de la densité de CR1 peuvent être classées en deux catégories. Il peut s'agir d'une exacerbation des mécanismes physiologiques observés lors du vieillissement des érythrocytes (voir III.4) ou d'un mécanisme spécifique à ces maladies et agissant directement sur l'expression de CR1. L'augmentation du catabolisme de CR1 chez les patients lupiques est confirmée par une étude montrant que les érythrocytes provenant de sujets sains perdent leur CR1 lorsqu'ils sont transfusés chez un patient lupique [291]. Mais d'autres résultats [7] indiquent que la densité de CR1 chez les patients lupiques est déjà inférieure à la normale dès le stade des réticulocytes ce qui suggère des mécanismes de régulation de la synthèse de CR1.

Aucune des hypothèses présentées dans les chapitres suivants n'a pour l'instant pris le pas sur les autres, et la diminution de la densité de CR1/E est probablement causée par plusieurs de ces mécanismes.

## **XI.1. La vésiculation**

Un des mécanismes permettant aux polynucléaires neutrophiles de résister au complexe d'attaque membranaire est l'exocytose sous la forme de vésicules [292]. Ce processus est également utilisé par le pathogène *Naegleria fowleri* pour échapper à la destruction par le complément [293]. Il est possible de provoquer expérimentalement la vésiculation des

érythrocytes en induisant un flux calcique à l'intérieur de la cellule ou en les privant d'ATP. Les vésicules produites sont enrichies en molécules régulatrices du complément comme DAF [294] et MCP [295]. L'enrichissement de ces vésicules en CR1 a également été mis en évidence [296].

Ces résultats permettent d'imaginer un mécanisme expliquant la perte de CR1 chez les patients lupiques. Lors de la fixation des complexes immuns par les érythrocytes, il peut y avoir dépôt des molécules de C3b sur la membrane [297]. Dans les conditions extrêmes qui sont celles d'une maladie à complexes immuns, on peut envisager que ce dépôt est tel qu'il puisse induire la formation d'un complexe d'attaque membranaire. Ce complexe serait ensuite expulsé par vésiculation de la membrane de l'érythrocyte, ainsi que les molécules à proximité dont le CR1.

## **XI.2. La protéolyse**

La protéolyse de CR1 est un des mécanismes proposés pour expliquer le transfert des complexes immuns des érythrocytes vers les macrophages du foie (voir III.5). La production importante de complexes immuns dans le cas des maladies auto-immunes oblige les érythrocytes à effectuer de nombreux cycles de clairance et pourrait expliquer la diminution pathologique de la densité de CR1/E.

La dégradation de CR1 par des protéases sériques est également possible car le CR1 est très sensible à la protéolyse [298]. Chez les malades atteints de pathologies malignes ou inflammatoires associées à la production de protéases (cancer du poumon, polyarthrite rhumatoïde), on observe une corrélation entre l'augmentation de la concentration de protéases sériques et la diminution de la densité de CR1/E [299]. De la même façon chez les sidéens on observe une diminution spécifique de la densité de CR1/E, différente de la diminution non-spécifique observée pendant le vieillissement des érythrocytes [300]. Cette manifestation s'accompagne d'une augmentation des fragments de dégradation de CR1 à la surface des érythrocytes. Ce résultat doit cependant être nuancé : il n'a été obtenu que sur une population limitée de patients (quatre), et l'extraction des membranes érythrocytaires permettant l'analyse des fragments de dégradation de CR1 n'est pas faite en présence d'un nombre suffisant d'inhibiteurs de protéases. Utilisée de cette façon, cette technique produit de nombreux artefacts [301].

### **XI.3. Le contrôle génétique de l'expression de CR1**

Le contrôle génétique de l'expression de CR1 à la surface des érythrocytes est l'hypothèse la moins souvent envisagée. En effet, l'érythrocyte ayant perdu son noyau, il faudrait envisager que la régulation ait eu lieu avant le stade réticulocyte. Pourtant une augmentation de l'expression des molécules HLA de classe I est observée à la surface des érythrocytes des patients lupiques [302], on peut donc considérer que la régulation (positive ou négative) de l'expression de molécules à la surface des érythrocytes des lupiques est un phénomène envisageable.

Une régulation de la transcription expliquerait pourquoi la densité de CR1 est diminuée à la surface d'érythrocytes jeunes [7].

Par contre chez des souris MRL/Ipr qui développent spontanément des pathologies auto-immunes, on observe une inhibition précoce de la transcription du gène *cr2* (codant pour le CR1 et le CR2 murins) dans les lymphocytes B [303]. De plus, cette inhibition a lieu avant toute manifestation clinique. Des résultats identiques sont retrouvés chez les souris ayant subies une injection de microbes par voie intrapéritonéale. Il serait intéressant d'examiner, dans ces modèles, la quantité de transcrits du gène *cr2* dans les cellules au stade pré-érythroïde. Chez l'Homme, ces cellules sont difficilement accessibles et ce type d'étude chez les patients atteints de pathologies auto-immunes semble impossible pour l'instant.

### **XI.4. La présence d'auto-anticorps anti-CR1**

La présence d'auto-anticorps anti-CR1 est quelquefois observée chez certains patients lupiques. Chez un de ces malades [304], le taux d'auto-anticorps anti-CR1 est inversement corrélé à la densité de CR1/E et de CR1 à la surface des lymphocytes B. La diminution de l'expression de CR1 à la surface des lymphocytes B peut s'expliquer par l'internalisation de CR1 après pontage de ces molécules par l'auto-anticorps. L'augmentation de la concentration de l'auto-anticorps anti-CR1 peut correspondre à une phase aiguë de la maladie, engendrer une augmentation du nombre de complexes et une diminution de la densité de CR1/E. On peut aussi imaginer un mécanisme plus spécifique, où l'anticorps anti-CR1 formerait des complexes immuns à la surface des érythrocytes, ce complexe étant ensuite éliminé dans le foie par les macrophages.

Quoi qu'il en soit, la présence d'auto-anticorps anti-CR1 est marginale chez ces malades.

## **XII. Utilisation du CR1 en thérapeutique**

Le CR1 est depuis le début des années 1990 l'objet de nouvelles recherches. Son rôle physiologique important et son implication dans de nombreuses pathologies font de cette molécule un agent thérapeutique potentiel. Trois voies ont été jusqu'à présent explorées : l'augmentation de la densité de CR1 à la surface des cellules, l'utilisation d'une forme recombinante soluble de CR1 comme anti-inflammatoire, le routage des antigènes, en vue de leur clairance, vers le CR1 érythrocytaire.

### **XII.1. Augmentation de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes**

L'observation de la diminution de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes des patients atteints de maladies à complexes immuns, a conduit de nombreux auteurs à envisager la restauration de la densité de CR1 comme une des voies permettant le retour à une clairance normale chez ces personnes.

Les premières techniques utilisées ont impliqué la population de globules rouges jeunes qui ont une densité supérieure de CR1 (voir III.4). Il existe deux manières d'augmenter le volume de cette population. La plus rudimentaire consiste à prélever 30% des globules rouges d'un primate et à remplacer le volume globulaire correspondant par une solution isotonique. En une semaine les érythrocytes prélevés sont remplacés naturellement par des érythrocytes plus jeunes. Chez le singe cynomolgus, cette technique permet jusqu'à un triplement de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes de singes traités de cette façon. Cet état est constant pendant plus 10 semaines [212]. Une autre technique consiste à transfuser des singes ayant une faible densité de CR1/E avec des érythrocytes de singes ayant une plus forte densité. Cette technique permet un doublement de la densité de CR1/E chez le receveur, mais cette augmentation est brève (pas plus de quatre jours) [305].

Les singes traités par la technique de déplétion des érythrocytes ne semblent pas mieux protégés que les singes non-traités dans un modèle de glomérulonéphrite expérimentale [305]. Néanmoins, le modèle utilisé est peut être responsable de l'échec de ce procédé. En effet, les complexes immuns sont formés *in vivo* par injection quotidienne de gamma globulines bovines à des singes préalablement vaccinés contre ces gamma globulines. L'introduction rapide de fortes quantités d'antigènes n'est probablement pas comparable à la production lente et régulière d'antigènes observée dans les pathologies à complexes immuns. Dans ce modèle,

il y a probablement un excès temporaire de complexes immuns, par rapport au système du CR1 érythrocytaire qui ne peut empêcher le dépôt de complexes immuns au niveau des reins. Chez les patients atteints de maladies à complexes immuns, la transfusion d'érythrocytes semblent avoir un effet bénéfique. Dans une étude, quatorze patients ont été transfusés avec des érythrocytes [306]. La concentration des complexes immuns circulant diminue de 75 à 100% chez douze de ces patients, cette diminution s'accompagne d'une consommation de complément pendant la première semaine suivant la transfusion. Cette étude ne donne aucune indication sur le lieu de dépôt des complexes, on peut cependant envisager que la transfusion d'érythrocytes permet le transport des complexes immuns vers le foie et la rate. On observe également une augmentation de la densité de CR1/E, ce phénomène est durable et n'est pas uniquement causé par la transfusion mais par l'apparition de nouveaux érythrocytes provenant de la moelle osseuse.

Le traitement des patients par l'érythropoïétine recombinante (rEPO) conduit également à l'augmentation de la population d'érythrocytes jeunes dans la circulation. L'activation de l'érythropoïèse entraîne donc l'augmentation de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes [307]. Chez certains patients lupiques traités avec de la rEPO, on observe une augmentation de 190 % de la densité de CR1/E au bout de quatre mois. Le traitement par rEPO ne change pas les différents paramètres de la maladie des patients lupiques [308].

Ces traitements ne sont applicables que chez des patients présentant une anémie préalable, car une augmentation trop importante de l'hématocrite est dangereuse pour la santé. Mais, l'expérience de transfusion d'érythrocytes chez des patients lupiques indique que l'augmentation de la densité de CR1 à la surface des érythrocytes est une des voies thérapeutiques envisageables.

## **XII.2. Protection des cellules contre le complément par expression de CR1 à leur surface**

Les cellules CHO cultivées *in vitro* et transfectées par l'ADNc codant pour le CR1 sont protégées de la lyse par le complément [309], cette protection est corrélée avec la densité de CR1 à la surface de ces cellules. Les mêmes résultats sont obtenus avec des cellules n'exprimant que les LHR A, C et D de CR1. Des cellules mésangiales de souris, qui expriment le Crry, ont été transfectées par le gène de Crry. Elles expriment une densité supra physiologique de Crry à leur surface. Cette sur-expression protège les cellules de l'attaque par la voie classique du complément [310].

Ces différents résultats indiquent que l'expression de CR1 à la surface des cellules des organes transplantés pourrait empêcher leur destruction par le complément.

### **XII.3. Le CR1 soluble recombinant (rCR1s)**

Le CR1 soluble recombinant a été produit pour la première fois par l'équipe du professeur Fearon au début des années 1990 [205]. L'ADNc codant pour l'allèle CR1\*1 a été modifié par insertion d'un codon stop à la jonction des régions codant pour le domaine extracellulaire et trans-membranaire. Les cellules eucaryotes CHO, transformées par cette construction, sécrètent une molécule de 200 kDa. L'analyse du rCR1s par microscopie électronique indique que cette molécule a une structure filamenteuse et flexible. Comme la forme membranaire, rCR1s fixe le C3b et le C4b, active le clivage de ces molécules par le facteur I et inhibe les C3 et C5 convertases des voies classiques et alternes.

Depuis cette époque, l'action de rCR1s a été testée dans de nombreux modèles d'allogreffes, de xéno greffes et de maladies à complexes immuns. Il a aussi été utilisé pour mettre en évidence l'activité du complément dans certains phénomènes pathologiques tels que l'infarctus du myocarde.

### **XII.4. Protection des allogreffes par le rCR1s**

Lors de la greffe d'un organe entre individus de même espèce, le système immunitaire non-spécifique joue un rôle important (consécutif à des mécanismes spécifiques) dans le rejet de l'organe transplanté. Le complément est impliqué dans ce phénomène avec les polynucléaires neutrophiles et les radicaux libres [205,311]. Même si on peut envisager l'inhibition de l'activation des polynucléaires neutrophiles ou l'injection d'anti-radicaux libres, l'inhibition de l'activation du complément semble être la meilleure voie permettant d'empêcher le rejet [312]. L'utilisation de venin de cobra qui protéolyse de façon spécifique le C3, n'étant pas possible du fait de sa haute toxicité, le rCR1s est actuellement le candidat le plus sérieux comme facteur d'inhibition de l'activation du complément [313].

Le rCR1s a déjà été testé avec succès dans des modèles animaux d'allogreffes de cœur [314], d'intestins [315], de foie [316], de muscles squelettiques [317], de reins [318-320] et de poumons [321,322].

L'étude de l'effet du rCR1s sur la tolérance des allogreffes rénales est faite sur le rat Lewis avec des greffons provenant du rat DA. Sans traitement cette expérience conduit à un rejet

total du greffon en cinq jours. La dose de rCR1s injectée est de 25 mg/kg ce qui permet d'atteindre une concentration plasmatique de 782 pg/mL et une inhibition du complément de 90%. La demi-vie de rCR1s chez le rat est de 30 min et sa présence devient indécélable au bout de 24 heures. Le traitement par rCR1s porte la durée de vie du greffon à neuf jours. On observe principalement une inhibition partielle du dépôt de C3 et du complexe d'attaque membranaire à la surface des tubules rénaux[320]. On constate également une diminution de l'infiltration des leucocytes dans le rein transplanté. Trois observations peuvent expliquer cela [318]. Tout d'abord l'effet protecteur de rCR1s sur les vaisseaux du greffon empêche la migration des leucocytes. Ensuite, peu de monocytes et de macrophages sont présents dans les greffes des animaux traités. Enfin, l'inhibition de la production de C5a par rCR1s explique cette observation.

Le rôle de rCR1s dans la protection des greffes de poumons a été étudié dans des essais de phase I/II chez l'Homme. Les premiers résultats de ces études menées par la société *Avant Immunotherapeutics* (Needham, Massachusetts, EU), qui commercialise le rCR1s sous le nom de TP10, a montré que les transplantés traités par rCR1s retrouvent plus rapidement une ventilation normale que les patients non-traités. TP10 permet d'extuber les transplantés plus tôt [323].

Plusieurs modèles d'allogreffe de poumons chez le porc ont été décrits [321,322]. Les auteurs sont d'accord sur le fait que rCR1s inhibe le dépôt de complément, prévient l'apparition de l'œdème pulmonaire mais n'empêche pas l'infiltration des leucocytes. Ils sont par contre partagés sur la capacité de rCR1s à améliorer d'autres paramètres tels que la ventilation ou les paramètres hémodynamiques. En fait, il semble que si l'on exclue les interprétations non corrélées par des mesures fiables et statistiques, on puisse éliminer ces dernières observations [321].

## **XII.5. Protection des xéngreffes par le rCR1s**

La principale barrière empêchant la xénotransplantation est le rejet hyper aigu. Le complément, les anticorps naturels et les facteurs de la coagulation jouent un rôle important dans la première phase de ce rejet [312]. Les immunosuppresseurs actuellement disponibles sont incapables d'empêcher ce mécanisme et l'humanisation parfaite des organes en vue d'une transplantation chez l'Homme ne semble pas pour l'instant réalisable. L'inhibition de l'activation du complément est une des voies étudiées pour permettre la tolérance des xéngreffes. De nombreuses études effectuées chez l'animal, utilisant le rCR1s ont été

publiées. rCR1s prolonge notamment la survie des xénogreffes de cœur de cobaye chez le rat [324] et de cœur de porc chez le Macaque cynomolgus [325]. Dans ce dernier cas, une injection préalable de 15 mg/kg de rCR1s chez le primate prolonge la survie de la xénogreffe de deux à quatre jours contre une heure en absence de traitement.

Puisqu'on ne peut envisager une inhibition durable du complément, rCR1s seul ne peut permettre la tolérance totale des xénogreffes. Néanmoins, en association avec d'autres techniques, l'inhibition temporaire des voies d'activation du complément pourra être retenue.

## **XII.6. Effet protecteur de rCR1s lors de l'infarctus du myocarde**

L'infarctus du myocarde est suivi d'une réponse inflammatoire qui provoque des dégâts cardiaques quelquefois irréversibles. Ce phénomène nommé *reperfusion injury* en anglais, est lié à la séquestration de leucocytes et au dépôt de molécules du complément (dont le complexe d'attaque membranaire) au niveau des tissus endommagés [326].

Chez le rat, rCR1s a été utilisé avec succès pour diminuer les conséquences de l'infarctus dans un modèle expérimental [205]. Une dose de 3 mg/kg de rCR1s empêche le dépôt du complexe d'attaque membranaire à la surface de l'endothélium des veines et des vaisseaux capillaires, diminue la présence des leucocytes sur les lieux de l'infarctus et diminue la taille de la zone nécrosée. L'utilisation d'une partie de la molécule (du SCR15 au SCR18) : rCR1s-SCR15-18 (15mg/Kg) aboutit au même résultat en diminuant la présence de C3c sur les lieux de l'infarctus et la taille de la zone nécrosée [327].

Chez l'Homme, rCR1s diminue les dommages liés à l'ischémie-reperfusion et protège contre l'infarctus du myocarde. [328]. TP10 protège plutôt les hommes et non les femmes de l'infarctus du myocarde susceptible de survenir pendant la chirurgie cardiaque [329].

## **XII.7. Effet protecteur de rCR1s dans l'hémolyse dépendante du complément**

Le rCR1s est un agent thérapeutique potentiel contre l'hémolyse complément dépendante. Dans un modèle d'alloimmunisation *in vitro*, rCR1s employé à des concentrations de l'ordre du micromolaire inhibe le dépôt de complément à la surface des érythrocytes et empêche leur hémolyse consécutive à l'activation de la voie classique du complément. Un modèle murin de transfusion hémolytique a récemment été mis au point. Des érythrocytes humains sont

transfusés à une souris dans des proportions correspondant à 10% du volume sanguin murin, on observe une hémolyse intravasculaire et une élimination complète des érythrocytes transfusés au bout de 2 heures, cela avec une cinétique de clairance comparable à celle observée au cours d'une réaction d'incompatibilité de groupe sanguin ABO chez l'Homme [330]. Quand on injecte 10 mg /kg de rCR1s au moment de la transfusion, une dose bien tolérée chez l'Homme, la clairance des érythrocytes de groupe O et le dépôt de C3 à leur surface sont complètement bloqués dans la première heure posttransfusion, délai pour lequel la concentration plasmatique de rCR1s est la moitié de la concentration de départ [330]. Le traitement avec le rCR1s prolonge la survie des érythrocytes de groupe A pendant 2 heures après la transfusion, réduit l'hémolyse intravasculaire de moitié et diminue de 100 fois le taux de dépôt de molécules du complément C3 et C4 à la surface des cellules transfusées. Ceci indique que rCR1s est un agent thérapeutique anti-hémolytique potentiel. Toutefois la demi-vie courte *in vivo* des préparations de rCR1s représente une limite puisque, la transfusion doit être continue pour assurer une inhibition efficace du complément. Pour surmonter cet inconvénient, il a été proposé de coupler rCR1s à une partie du fragment Fc d'anticorps pour accroître sa demi-vie. Cette démarche a été fructueuse dans le cas de la molécule Cr1 (homologue murin du CR1 humain [331], DAF et CD59 [332]).

## **XII.8. Clairance des antigènes par des anticorps divalents**

L'équipe de Ronald Taylor à Charlottesville développe depuis quelques années une nouvelle technique utilisant les propriétés du CR1 érythrocytaire pour éliminer des molécules et des pathogènes de la circulation sanguine.

Les immunoglobulines liées aux érythrocytes *via* le CR1 sont reconnues par les macrophages différemment à celles fixées aux érythrocytes par un autre antigène de surface [333]. Ce phénomène explique pourquoi les érythrocytes ne sont pas éliminés de la circulation avec les complexes immuns lors de la clairance. A partir de cette observation l'équipe de R. Taylor a développé des molécules bispécifiques faites d'un anticorps monoclonal anti-CR1 et d'un ligand fixant la molécule à éliminer de la circulation. Ces molécules forment un pont entre le CR1 érythrocytaire et la molécule à éliminer. Cette technique pourrait être utile dans la clairance de pathogènes faiblement opsonisés (comme les haptènes) ou des molécules du soi (auto-anticorps, cytokines....).

La liaison entre les deux valences se fait grâce à une molécule de streptavidine qui lie les deux molécules préalablement biotinylées. La deuxième valence peut-être un anticorps, ou un

antigène lorsque l'on veut éliminer des auto-anticorps. *In vivo* chez le primate, ces hétéropolymères sont capables d'orienter la molécule [160,276] ou la cellule [334] à éliminer vers les érythrocytes, le processus est ensuite similaire à celui de la clairance. Ce phénomène s'accompagne d'une perte de CR1 à la surface des érythrocytes comme c'est le cas lors de la clairance des complexes immuns (voir III.6)[160].

Ces études apportent également des informations sur le transfert des complexes immuns des érythrocytes vers les macrophages du foie. En effet, dans ce système, l'opsonisation de la molécule éliminée n'est pas nécessaire à la clairance. Cette observation, ainsi que la perte de CR1 lors de la clairance conforte l'idée du transfert des complexes immuns par protéolyse du CR1 à la surface des érythrocytes. La phagocytose par les macrophages se fait également sans opsonisation, on peut envisager que l'activation de la phagocytose se fait *via* les récepteurs du fragment Fc et *via* le CR1 monocyttaire lié aux anticorps monoclonaux anti-CR1 de l'hétéropolymère.

Ce système a été testé chez l'Homme en vue d'éliminer les auto-anticorps anti-ADN double brin chez les patients lupiques en utilisant un hétéropolymère composé de l'anticorps anti-CR1 et d'un morceau d'ADN.

King-Konert *et al.* ont construit un anticorps artificiel (ETI-104) composé d'ADN double brin couplé à un anticorps murin anti-CR1 humain. Chez les patients lupiques traités par ETI-104, on observe une baisse significative du taux d'IgG anti-ADN double brin [335].

De même, l'utilisation d'une molécule chimérique composée d'un peptide mimant l'épitope de l'ADN double brin et d'un anticorps anti-CR1 permet de cibler les lymphocytes B autoréactifs et de les empêcher de synthétiser les IgG anti-ADN double brin en induisant un signal inhibiteur *via* CR1 [336].

Cependant, ce système souffre des limites des thérapies utilisant des anticorps monoclonaux. L'humanisation des anticorps monoclonaux est un préalable nécessaire à l'utilisation de ces molécules chez l'Homme.

## **XIII. 1.3 Régulation génique chez les eucaryotes : rappels**

### **XIII.1. Structure des gènes eucaryotes**

Les protéines eucaryotes sont en général codées par des gènes simple copie. Environ la moitié de tous les gènes eucaryotes codant des protéines sont présents à raison d'une seule copie par génome haploïde. Les autres sont présents en multiples copies. Il existe souvent au voisinage d'un gène particulier, des copies non fonctionnelles, appelées pseudo-gènes. Ces gènes dupliqués ont pu apparaître à la suite d'un évènement anormal lors d'un crossing-over chromosomique au cours de la méiose ou à la suite de rétrotransposition. Un ensemble de gènes dupliqués ou apparentés constituent une famille de gènes.

Il existe avant le début de la séquence du gène une région appelée promoteur au niveau de laquelle l'ARN polymérase initie la transcription. L'ARN polymérase eucaryote contrairement à l'enzyme procaryote ne reconnaît pas elle même la séquence du promoteur. De l'autre coté du gène après la fin de la séquence codante, il existe une séquence d'ADN appropriée appelée terminateur, que l'ARN polymérase reconnaît comme site de terminaison de la transcription. Les séquences du promoteur et du terminateur ne sont pas transcrites en ARN mais font toutes deux parties du gène. Les séquences internes appelées introns ne sont pas exprimées dans l'ARNm. Bien que les introns soient transcrits en ARN, il sont enlevés à l'intérieur du noyau au cours de l'épissage. Dans la plupart des gènes eucaryotes il va y avoir plusieurs introns. On appelle exons les parties du gène présentes dans l'ARNm (Figure 29, page 91).

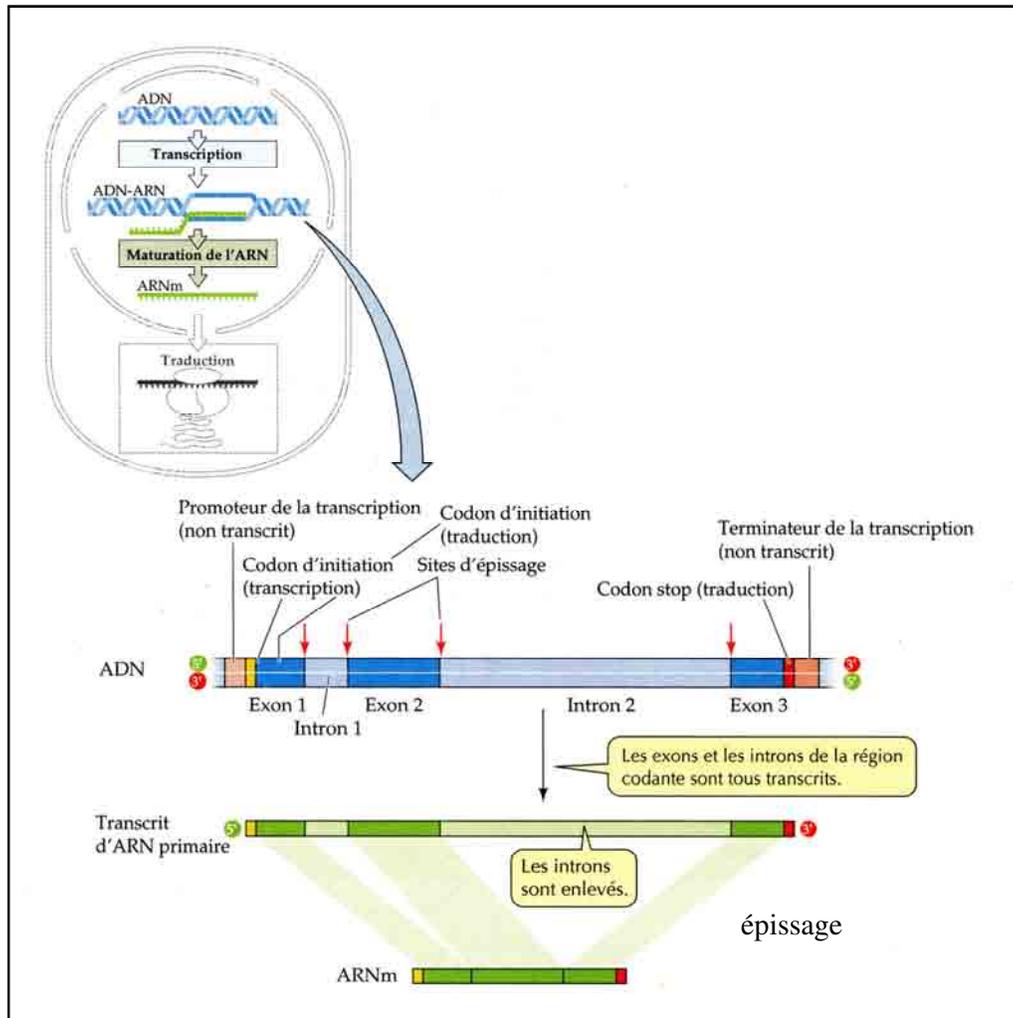


Figure 29 : Structure et transcription d'un gène eucaryote. D'après Sadava D. 1998.

### XIII.2. Contrôle transcriptionnel

Un organisme pluricellulaire contient de nombreuses cellules et tissus spécialisés et chaque cellule possède tous les gènes de cet organisme. Certaines protéines spécifiques doivent être synthétisées au bon moment et dans les bonnes cellules pour que le développement se fasse normalement et que chaque cellule acquière et maintienne sa propre fonction. L'expression des gènes eucaryotes est donc régulée avec précision. Les moyens qui permettent cette régulation sont multiples. Dans certains cas, la régulation génique dépend de l'ADN lui-même : les gènes sont organisés sur le chromosome ou même sélectivement répliqués pour fournir plus de matrice à transcrire. Dans d'autres cas des changements dans les protéines qui se lient à l'ADN peuvent rendre les gènes moins accessibles à la transcription. Le contrôle peut avoir lieu au niveau de la transcription et au niveau de la maturation du pré-ARNm. Le

transport de l'ARNm dans le cytoplasme et la stabilité de l'ARNm dans sa nouvelle localisation peuvent aussi être contrôlés. Une fois que l'ARNm est entré dans le cytoplasme sa traduction en protéine peut être régulée. Enfin lorsque la protéine est synthétisée, sa structure peut être modifiée et son activité en être affectée.

Certaines protéines sont spécifiques du type cellulaire. Des gènes spécifiques peuvent être sélectivement transcrits. Chez les eucaryotes de nombreuses protéines sont impliquées dans l'étape d'initiation de la transcription. Le promoteur est une séquence d'ADN proche de l'extrémité 5' de la région codante où l'ARN polymérase initie la transcription (Figure 30, page 94). L'ARN polymérase II ne se lie pas elle-même au site promoteur et ne peut initier seule la transcription. Il faut pour qu'elle se lie que diverses protéines appelées facteurs de transcription soient assemblées sur le chromosome. La protéine TFII D se lie d'abord à la boîte TATA située à environ 25pb en 5' du site d'initiation de la transcription. La liaison change les conformations de la protéine et de l'ADN, ce qui permet d'obtenir une nouvelle surface qui favorise la liaison des autres facteurs de transcription. L'ARN polymérase II ne se lie que lorsque plusieurs autres protéines sont déjà liées au complexe. Certaines séquences telle que la boîte TATA sont communes aux promoteurs de nombreux gènes et reconnues par des facteurs de transcription que l'on trouve dans toutes les cellules d'un organisme. D'autres séquences dans les promoteurs peuvent être spécifiques de quelques gènes seulement et reconnues par des facteurs de transcription qui n'existent que dans les cellules de certains tissus. Ces facteurs de transcription spécifiques jouent un rôle important dans la différenciation et la spécialisation des cellules au cours du développement.

Il existe en dehors du complexe d'initiation de la transcription, deux autres régions de l'ADN où se lient des protéines pour activer l'ARN polymérase (Figure 31, page 95). Ces régions régulatrices sont regroupées juste en amont du promoteur. Plusieurs protéines peuvent se lier à cet endroit. Leur effet est de se lier au complexe de transcription adjacent et de l'activer. Beaucoup plus loin jusqu'à 20000 pb plus loin, il existe des régions appelées *enhancers*. Les régions *enhancers* sont aussi capables de lier des protéines d'activateurs qui stimulent fortement la transcription. La façon dont ces *enhancers* exercent leur influence à grande distance n'est pas parfaitement comprise. On a pu montrer que l'ADN se courbe et que grâce à cette courbure, l'activateur est en contact avec le complexe contenant l'ARN polymérase. Enfin il existe sur l'ADN des régions régulant négativement la transcription, ces régions

appelées *silencers* ont des effets opposés à celles des *enhancers*. Les *silencers* arrêtent la transcription en se liant à des protéines appropriées appelées répresseurs.

Il semble que chaque gène puisse transcrire dans la plupart une petite quantité d'ARN. Mais la transcription optimale est déterminée par la bonne combinaison de tous ces facteurs.

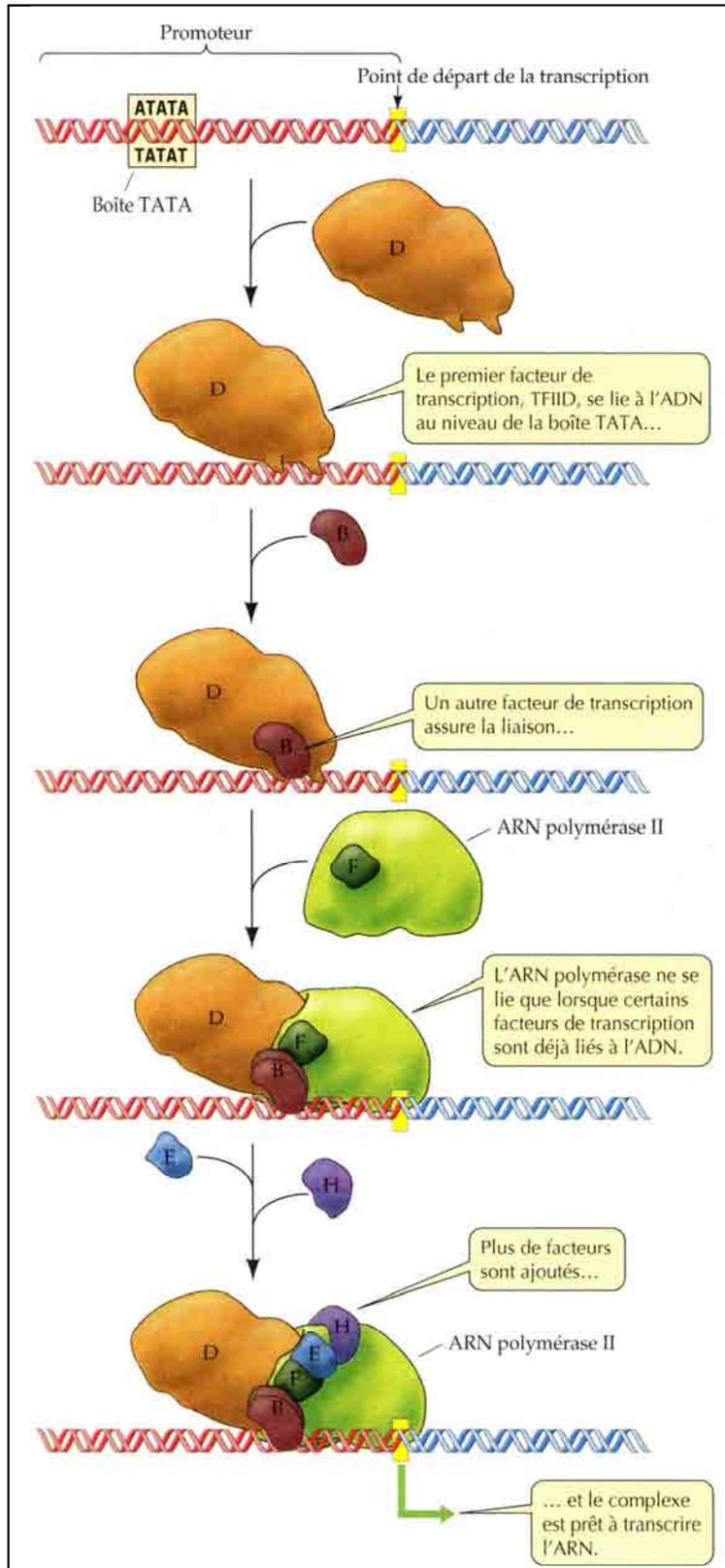
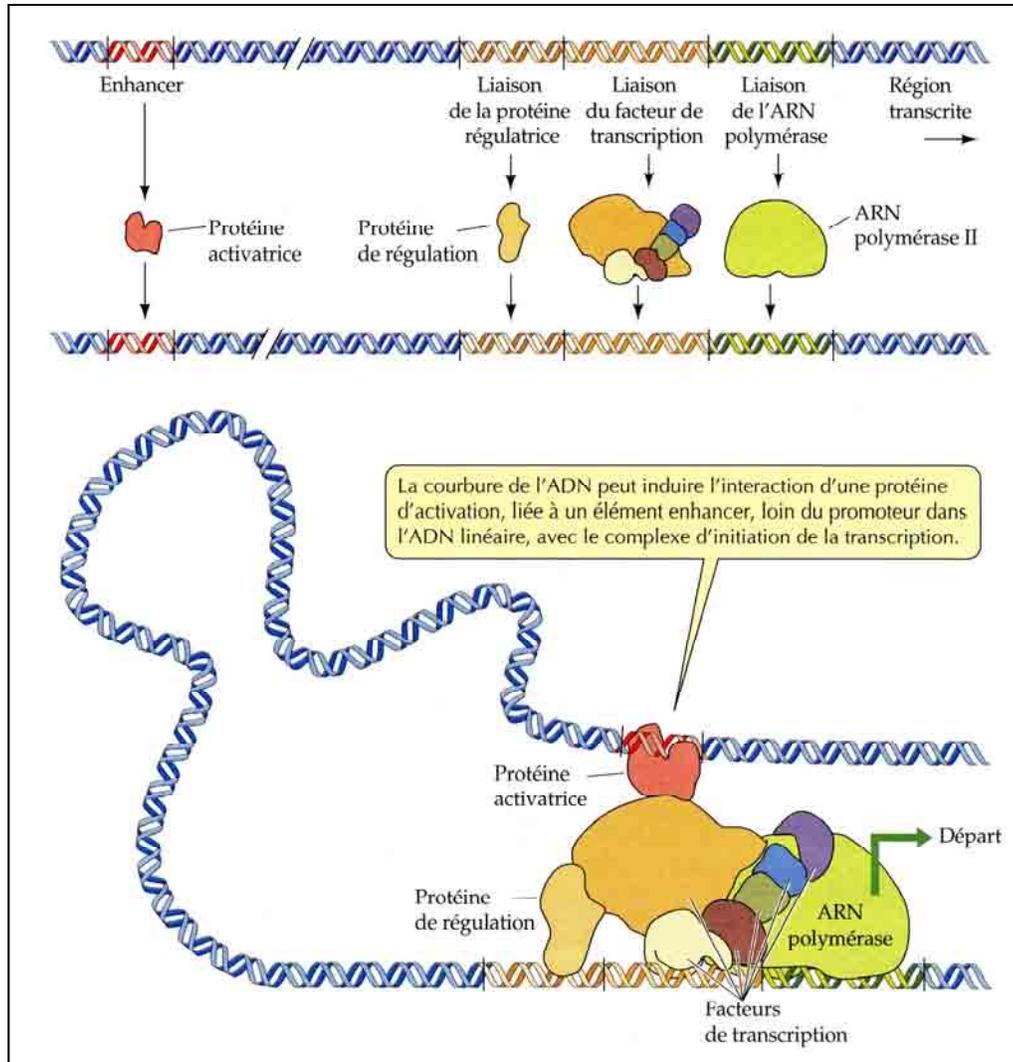


Figure 30 : Initiation de la transcription de l'ADN chez les eucaryotes.



**Figure 31 : Rôles des facteurs, des régulateurs et des activateurs de la transcription.**

## **MATERIELS ET METHODES**

# **I. Analyse de la structure et de la distribution des espèces moléculaires CR1 et CR1like (CR1L) érythrocytaires chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

## **I.1. Echantillons sanguins**

Les échantillons sanguins ont été prélevés dans des tubes vacutainers (Becton Dickinson, France) contenant 0,12 mL d'EDTA à 0,15%. Les échantillons sanguins de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) ont été gracieusement fournis par B. Hurtrel (Institut Pasteur, Paris) et M. Mekkaouch (CNRS, Marseille).

## **I.2. Déplétion des leucocytes**

Les échantillons sanguins dilués au ¼ dans du PBS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) contenant 5 mM de phényl méthane sulfonyl chloride (PMSC) (Merck, France) sont passés à travers une colonne de 2 mL de cellulose composée d'un mélange à parts égales en poids de microcellulose et d'alphacellulose (Sigma, St Quentin Fallavier, France). La numération sanguine est effectuée par un automate (Coulter, Beckman Coulter, Roissy, France).

## **I.3. Traitement des érythrocytes par la phospholipase C**

Trois µL de culot globulaire érythrocytaire sont incubés dans 200µL de TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), SAB 0,1%, glucose 0,8% et 0,4 unités de phospholipase C (E.C. 3.1.4.10) (Sigma, France) au bain-marie à 37°C pendant une demi-heure. Les érythrocytes sont ensuite lavés dans 10 mL de PBS par centrifugation à 350g pendant 5 min à 4°C. Le culot est remis en suspension dans une solution de PBS contenant 1% SAB.

## **I.4. Anticorps utilisés**

Les anticorps monoclonaux anti-CR1 (J3D3 et J3B11) sont purifiés des ascites de souris par la technique de contre précipitation par l'acide octanoïque [337].

Les hybridomes sont cultivés en RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, France), 10% de sérum de veau fœtal (Gibco), L-glutamine (2mM) (Gibco), pénicilline/ streptomycine/ fongizone (1000 U/mL ; 1000 pg/mL ; 2,5 pg/mL) (Sigma, MO, EU). Les hybridomes produisant J3D3 et J3B11 nous ont été donnés par Elizabeth Fischer (INSERM U430, Paris, France). Les anticorps monoclonaux anti-CR1 (E11, E11-FITC et TO5) sont distribués

respectivement par les sociétés sera-Lab (Loughborough, GB) et Dako (Trappes, France). Les anticorps monoclonaux HB8592, 1B4, 7G9, 9H3 et 3D9 ont été gracieusement fournis par R.P. Taylor (Université de Virginie, Charlottesville, Virginie, EU).

### **I.5. Détermination de la densité des sites CR1 à la surface des érythrocytes**

La cytométrie de flux après immunomarquage a été utilisée pour estimer la densité de CR1 érythrocytaire. Deux millions d'érythrocytes, lavés trois fois en PBS, sont incubés pendant 45 min à 4°C avec 2 µg de J3D3 biotinylé. Toutes les incubations et les lavages se font en PBS contenant 1% de SAB. Après trois lavages, 1,5 µg de streptavidine marquée à la phycoérythrine (Tebu, Paris, France), 1 µg d'anticorps biotinylé de chèvre antistreptavidine (Biosys, Compiègne, France) et 1,5 µg de streptavidine marquée à la phycoérythrine sont ajoutés séquentiellement et incubés avec les érythrocytes pendant 45 min à 4°C. Les érythrocytes marqués sont ensuite fixés par 350 µl d'une solution de formaldéhyde (Merck, Nogent/marne, France) à 0,37%.

Les cellules marquées sont analysées avec un cytomètre FACStar plus® (Becton Dickinson, CA, USA). Au moins 10000 événements sont enregistrés pour chaque échantillon. Le canal moyen de fluorescence de toute la population érythrocytaire est utilisé pour quantifier la densité de CR1 par érythrocyte (CR1/E). A chaque expérience une courbe d'étalonnage, établie grâce à trois populations érythrocytaires de densités de CR1 connues, est utilisée pour convertir l'intensité du marquage en nombre de CR1/E [3].

### **I.6. Analyse du poids moléculaire de CR1 par Western-Blot**

Toutes les étapes se font à 4°C. Les érythrocytes sont lavés 3 fois en PBS contenant 5 mM d'EDTA. Vingt cinq µl de culot globulaire sont lysés pendant 15 min dans 20 mL d'eau distillée, contenant 100 µl de PMSC et un mélange d'inhibiteurs de protéases (ICN, Irvine CA, EU). Les membranes sont précipitées par centrifugation (3120 g, 5 min puis 12000 g 15 min). Après élimination des surnageants, le culot de membranes est remis en suspension dans 40 µL de tampon Tris/HCL 20 mM pH 7,4 contenant 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA et 0,5% de NP40. Les particules insolubles sont éliminées par centrifugation (12000 g, 15 min)

Les extraits sont soumis à une séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5% (PAGE-SDS). Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de PVDF (Boehringer

Mannheim, Meylan, France). Le tampon de transfert est constitué de 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 15% de méthanol.

Chaque membrane est ensuite « bloquée » par du PBS contenant 5% de lait écrémé (Lovelait, St Martin belle roche, France) et 0,1% de tween 20. Après trois lavages en PBS-1 % de lait écrémé 0,1% de tween 20, les membranes sont séquentiellement incubées pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps monoclonal anti-CR1 J3D3 (0,1 µg/mL), puis avec l'anticorps anti-souris biotinylé dilué au 1/400 (Amersham, Life Sciences, Les Ullis, France), puis avec de la peroxydase couplée à la streptavidine diluée au 1/500 (Amersham). Les membranes sont ensuite lavées 2 fois 5 min en PBS 1 % lait écrémé puis une fois 10 min en PBS seul.

La révélation est faite grâce au luminol (un substrat de la peroxydase) (kit ECL, Amersham). Le substrat est déposé à la surface de la membrane pendant 1 min à température ambiante. La lumière issue de l'oxydation du luminol par la peroxydase est recueillie sur des films KODAK X-OMAT AR (KODAK, Rochester, EU).

## **I.7. Observation de la répartition géographique des CR1 et CR1like érythrocytaires par microscopies optique et confocale**

### **I.7.1. Monomarquage**

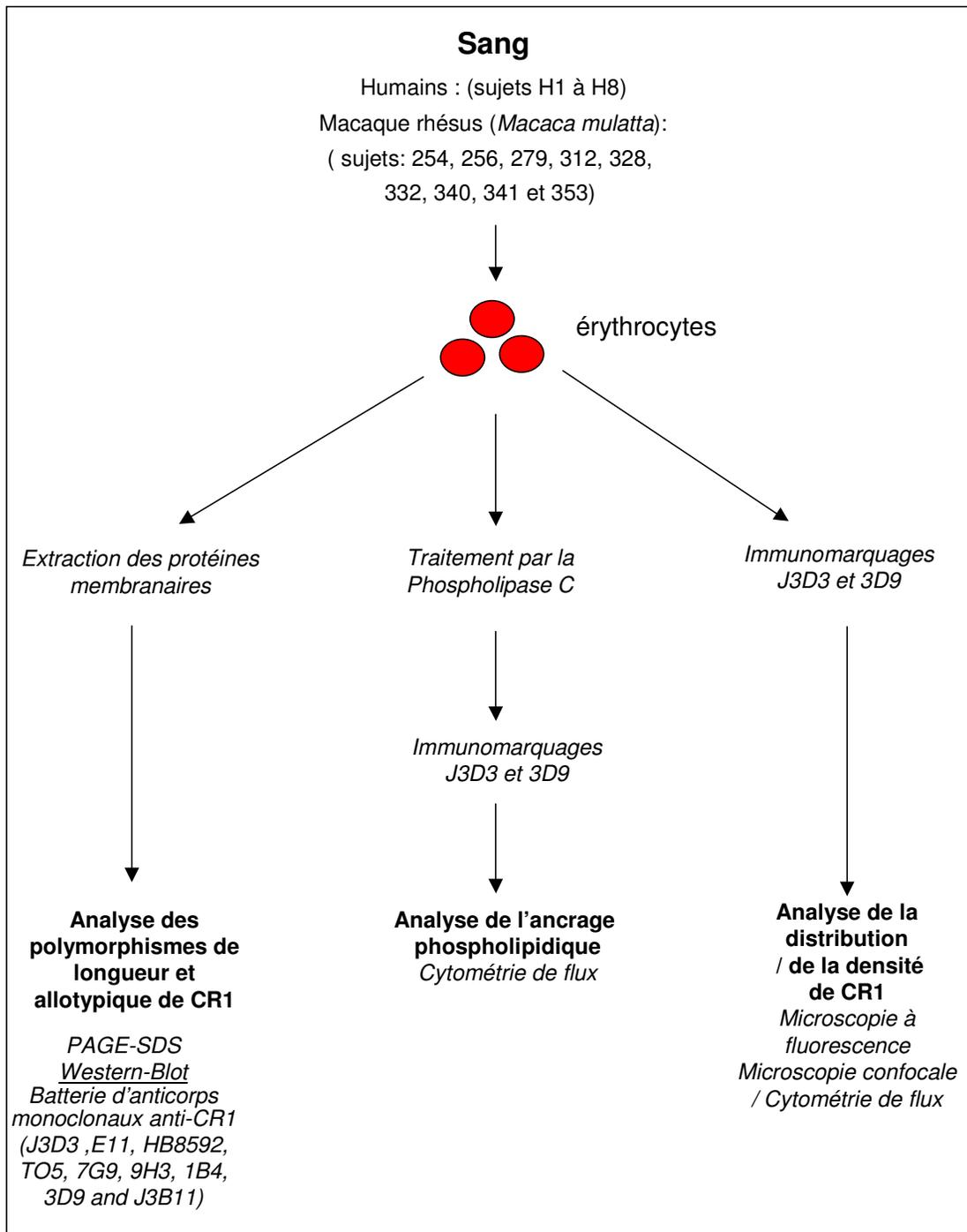
Deux millions d'érythrocytes, lavés trois fois en PBS, sont incubés pendant 45 min à 4°C avec 2 µg de J3D3 ou 3D9 biotinylés. Toutes les incubations et les lavages se font en PBS contenant 1% de SAB. Après trois lavages, 1,5 µg de streptavidine-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France), 1 µg d'anticorps de chèvre anti-streptavidine biotinylé (Biosys, Compiègne, France) et 1,5 µg de streptavidine-Alexa Fluor 488 sont ajoutés séquentiellement et incubés avec les érythrocytes pendant 45 min à 4°C. Les érythrocytes marqués sont ensuite fixés par 350 µl d'une solution de formaldéhyde (Merck, Nogent/marne, France) à 0,37%.

### **I.7.2. Double marquage**

Deux millions d'érythrocytes, lavés trois fois en PBS, sont incubés pendant 45 min à 4°C avec 2 µg de E11-FITC (Pharmingen, San Diego, CA, EU) . Toutes les incubations et les lavages se font en PBS contenant 1% de SAB. Après trois lavages, 1,5 µg de 3D9 biotinylé, 1,5 µg de streptavidine-Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France), 1 µg d'anticorps de chèvre anti-streptavidine biotinylé (Biosys, Compiègne, France) et 1,5 µg de

streptavidine-Alexa Fluor 568 sont ajoutés séquentiellement et incubés avec les érythrocytes pendant 45 min à 4°C. Les érythrocytes marqués sont ensuite fixés par 350 µL d'une solution de formaldéhyde (Merck, Nogent/marne, France) à 0,37%.

Les érythrocytes placés entre lame et lamelle ont été observés grâce à un microscope optique (Zeiss, Göttingen, Allemagne) et à un microscope confocal MRC-1024 (Bio-Rad, CA, EU) équipé d'un laser argon/krypton et de filtres permettant la détection de l'Alexa 568. Les images finales ont été obtenues par projection d'une série de 30 images correspondant à 30 sections optiques différentes de la même région.



**Figure 32 : Protocole suivi pour l'analyse de la structure et de la distribution des espèces moléculaires CR1 et CR1like chez l'Homme et le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*).**

## **II. Recherche et analyse des promoteurs de CR1 et CR1L du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

### **II.1. Southern Blot**

#### **II.1.1. Préparation de la sonde CR1B marquée à la digoxigénine (Dig)**

La sonde correspond à la région du promoteur du gène CR1 humain. Elle est préparée à l'aide du kit PCR-DIG (Roche, Mannheim, Allemagne) permettant l'incorporation de dUTP-Digoxigenine dans le produit de PCR au cours de l'amplification. Cinquante  $\mu\text{L}$  de tampon contenant 250 ng d'ADN sont ajoutés à 250 ng d'amorces 5' et 3', 200  $\mu\text{M}$  de dATP, dCTP, dGTP, 130 $\mu\text{M}$  dTTP, 70 $\mu\text{M}$  DIG-11-dUTP, 5 $\mu\text{L}$  tampon de PCR, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  et 2,62U d'enzyme « *mix long expand high fidelity* » (Roche, Mannheim, Allemagne).

#### **II.1.2. Digestion de l'ADN**

Dix  $\mu\text{g}$  d'ADN sont digérés pendant 5 heures à 37°C par un mélange de 150  $\mu\text{L}$  composé de 60 UI d'enzyme *Hind* III, de tampon enzymatique et d'eau distillée. La qualité de la digestion est vérifiée après migration de 5  $\mu\text{L}$  de ce mélange à travers un gel d'agarose à 0,8%.

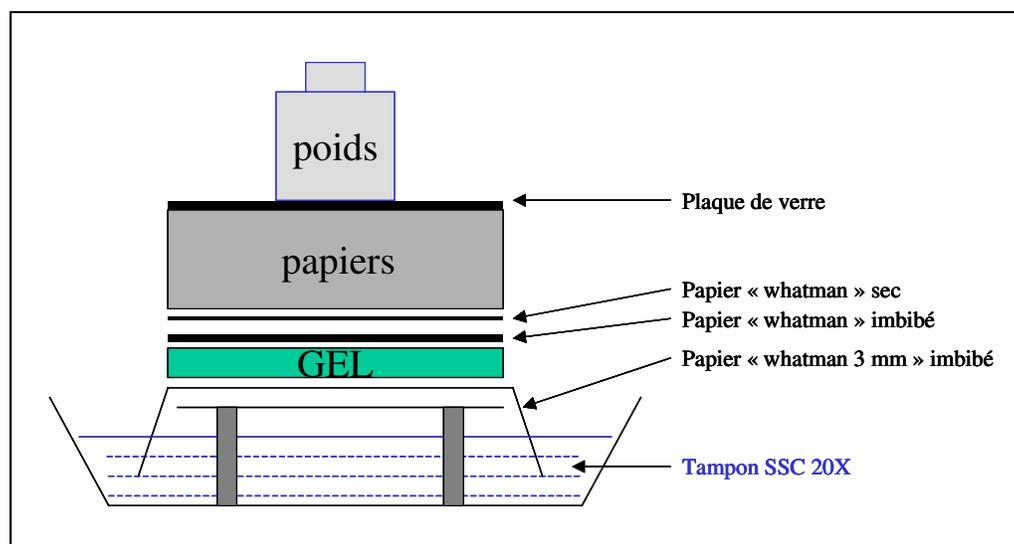
#### **II.1.3. Migration de l'ADN digéré**

L'ADN soumis à une tension de 45 V a migré pendant 18 h à travers un gel d'agarose à 0,8% dans une cuve à électrophorèse. L'ADN est ensuite dépuriné en plaçant le gel sous agitation à température ambiante dans une solution d'HCl 0,25 N pendant 10 minutes. Le gel est ensuite rincé en eau distillée puis déposé pendant 30 min dans un tampon composé de NaOH 0,5N et NaCl 1,5M. Le gel est rincé en eau distillée puis déposé pendant 30 min sous agitation à température ambiante dans une solution composée de Tris 0,5 M, NaCl 1,5 M et EDTA 0,5 mM à pH 8.

#### **II.1.4. Transfert de l'ADN du gel sur la membrane**

L'ADN est transféré par la technique de Blot schématisé (Figure 33, page 103). Le gel retourné est déposé sur un papier whatman trempant dans du tampon 20 SSC ( NaCl 3 M, Na-Citrate 0,3 M, pH 7). La membrane de nylon hybond (Amersham) trempée pendant 3 min dans du tampon 2 SSC (tampon 20 SSC dilué au 1/10) est déposée sur le gel et recouverte

d'un papier whatman imbibé de tampon 20 SSC, d'un papier whatman sec et d'une couche de 15 cm de papier type « sopalin » recouverte d'une plaque de verre sur laquelle repose 1 poids d'un Kg. Ce montage est laissé 18 h. La membrane est ensuite récupérée puis lavée dans du tampon 2 SSC pendant 10 min puis laissée séchée sur papier filtre avant d'être « cuite » au four pendant 2h à 80°C.



**Figure 33 : Schéma de montage pour transférer l'ADN contenu dans le gel sur la membrane de nylon.**

### II.1.5. Hybridation de la sonde non radioactive

La membrane enroulée dans un filtre est placée dans un tube à hybridation. Elle est placée dans un four rotatif pendant une heure à 68°C en présence de solution de préhybridation (0,2 mL/cm<sup>2</sup>) composée de tampon 5 SSC (tampon 20 SSC dilué au ¼), N-laurylsarcosine 0,1%, SDS 0,02% et d'agent bloquant 1% (Roche, Mannheim, Allemagne). Elle est ensuite placée pendant 4h à 68°C en présence de la solution d'hybridation composée de la solution de préhybridation contenant la sonde dénaturée préchauffée à 68°C, à raison de 0,025 mL/cm<sup>2</sup>. La membrane est ensuite lavée 2 fois à température ambiante avec la solution de lavage I composée de tampon 2 SSC et SDS à 0,1% puis 2 fois à 68°C avec la solution de lavage II composé de tampon 0,1 SSC et de SDS à 0,1%.

### II.1.6. Révélation par chimioluminescence

La membrane est rincée dans un bac contenant du tampon I (acide maléique 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 ajusté avec NaOH). Elle est ensuite saturée par le tampon II contenant l'agent bloquant (1mL/ cm<sup>2</sup>) pendant 30 min puis repassée dans un bain de tampon I. La membrane est ensuite placée sous agitation pendant 45 min dans une solution d'anticorps anti-DIG-PA dilué au 1/10000 dans du tampon II à raison de 0,2mL/ cm<sup>2</sup>. La membrane est ensuite équilibrée dans du tampon III (Tris HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ajusté à pH 9,5 avec NaOH) pendant 5 min. La membrane est ensuite égouttée et une solution de substrat CSPD est déposée (0,1 mL/ cm<sup>2</sup>) délicatement à sa surface. La membrane est ensuite séchée puis recouverte de cellophane alimentaire et incubée pendant 15 min dans une étuve à 37°C. Dans la chambre noire, elle est ensuite placée dans une cassette d'autoradiographie sous un film à chimioluminescence pendant 30 min.

## III. Construction des vecteurs contenant les régions promotrices des gènes CR1 et CR1like (CR1L) humains et macaques (*Macaca mulatta*)

### III.1. Biologie moléculaire

#### III.1.1. Isolement et clonage des régions promotrices CR1 et CR1like humaines

L'ADN génomique a été utilisé comme support de PCR pour isoler les régions promotrices CR1 et CR1like humaines.

#### III.1.2. Amorces d'amplification

Les séquences soulignées sont spécifiques des enzymes de restrictions.

##### III.1.2.1. Amplification de la région promotrice CR1 humaine

Amorce en 5': 5'CGC GAG AAG CTT CTC TTG ATT GCT TTC TTC TCA C3'

Amorce en 3': 5'CGC GAG GAA TTC TTC TCC CCA AGC ACA TCT AC3'

L'amorce en 5' contient un site de restriction pour l'enzyme *HindIII* et l'amorce 3' contient un site de restriction pour l'enzyme *EcoRI*.

### ***III.1.2.2. Amplification de la région promotrice CR1like humaine***

Amorce en 5': 5'CGC GAG AAG CTT CTC TTG ATT GCT TTC TTC TCA C3'

Amorce en 3': 5'CGC GAG GAA TTC TCC TCC CGA AGC ACA TCT AC3'

L'amorce en 5' contient un site de restriction pour l'enzyme *HindIII* et l'amorce 3' contient un site de restriction pour l'enzyme *EcoRI*.

### ***III.1.3. Isolement et clonage des régions promotrices CR1 et CR1like macaques (Macaca mulatta)***

L'ADN génomique a été utilisé comme support de PCR pour isoler les régions promotrices des gènes CR1 et CR1like macaques.

#### ***III.1.3.1. Isolement des régions promotrices CR1 et CR1like macaques (Macaca mulatta)***

Pour déterminer des amorces spécifiques des régions promotrices CR1L et CR1 du Macaque, une première PCR à l'aide d'amorces spécifiques du génome humain (CR1B, CR1Linv) a été réalisée. La séquence de l'amplimère obtenue (CR1BS) a été comparée aux séquences des régions promotrices connues de CR1 et CR1L humaines.

A partir de cette nouvelle séquence, 2 couples d'amorces (EG1, EG2, EG1inv, EG2inv) ont été dessinés en espérant qu'ils soient communs aux régions promotrices CR1 et CR1L macaques. Après avoir testé plusieurs combinaisons d'amorces, nous avons obtenu un amplimère avec le couple (EG2, EG1inv) qui a été ensuite séparé en 2 bandes distinctes d'ADN grâce à un gel de métaphore 3% (TEBU, Le Perray-en-Yvelines, France), soumis à une tension de 80 V pendant 19h. Ces 2 bandes ont été extraites à l'aide du kit « gel extraction » Qiagen (Qiagen, Hilden, Allemagne) puis amplifiées au cours d'une nouvelle PCR utilisant les mêmes amorces. Ces 2 produits de PCR ont été séquencés par la société génome express (Meylan, France). Le résultat de ces 2 séquences a permis de dessiner 2 amorces spécifiques des régions promotrices CR1 et CR1L du Macaque (*Macaca mulatta*) en 3', respectivement M3haut et M3Bas. L'amorce 5' (PH1) a été dessinée à partir du génome humain et est commune aux séquences des promoteurs des gènes CR1 et CR1L humains et macaques (Figure 34, page 106).

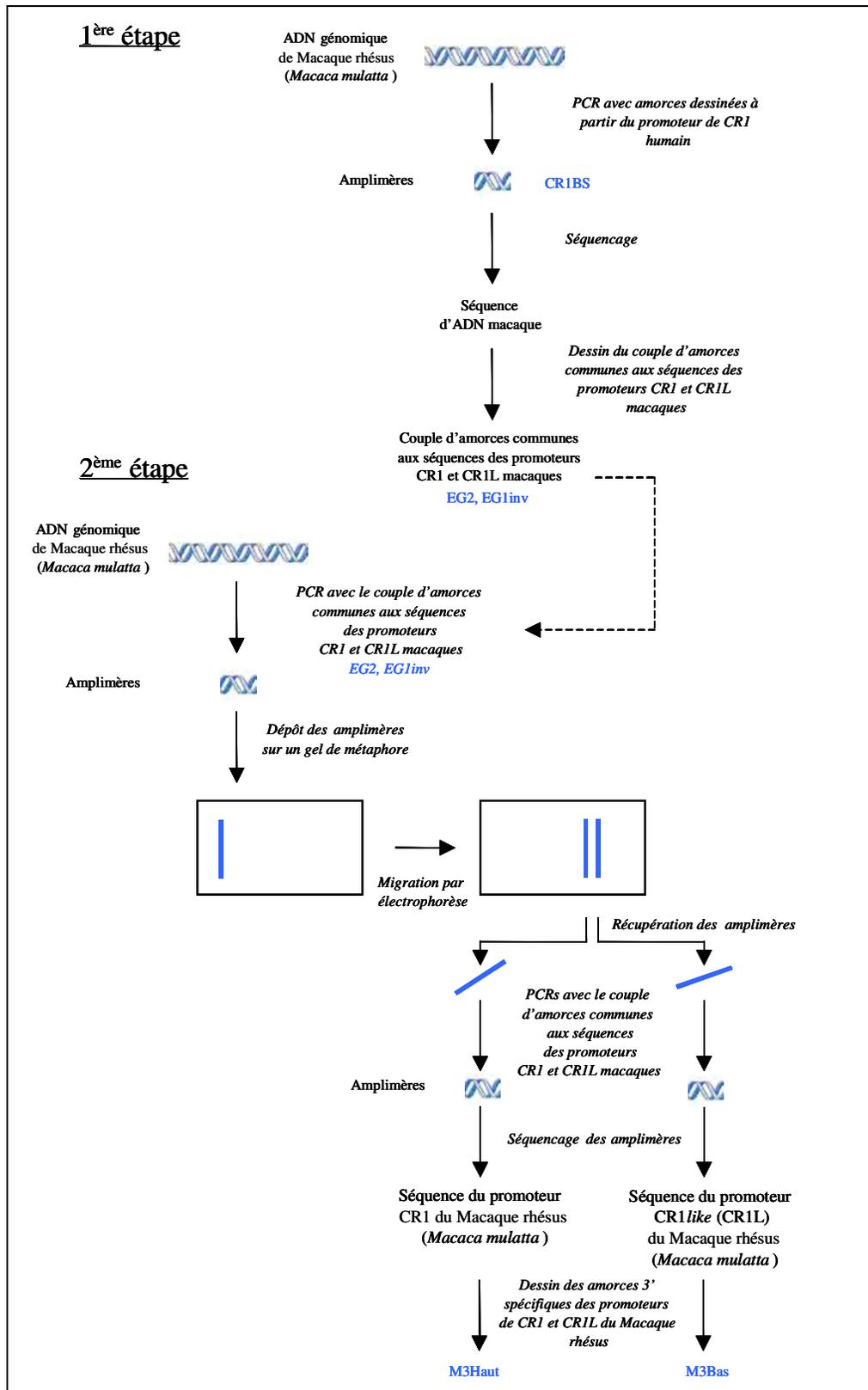


Figure 34 : Protocole suivi pour l'isolement des promoteurs des gènes CR1 et CR1like (CR1L) du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)

### ***III.1.3.2. Amplification de la région promotrice CR1 macaque (Macaca mulatta) (FHCR1inv)***

Amorce en 5': 5'CGC GAG AAG CTT CTC TTG ATT GCT TTC TTC TCA C3'

Amorce en 3': 5'CGC GAG GAA TTC TTC TCC CCA AGC ACA TCT AC3'

L'amorce en 5' contient un site de restriction pour l'enzyme *HindIII* et l'amorce 3' contient un site de restriction pour l'enzyme *EcoRI*.

### ***III.1.3.3. Amplification de la région promotrice CR1L macaque (Macaca mulatta) (MacCR1L1) en vue de son insertion en 5' de la construction codant pour DsRed***

Amorce en 5': 5' CGC GAG AAG CTT CTC TTG ATT GCT TTC TTC TCA C 3'

Amorce en 3': 5' CGC GAG GAA TTC CTA CAA ACC AGA TTT GAT CTC AAA G 3'

L'amorce en 5' contient un site de restriction pour l'enzyme *HindIII* et l'amorce 3' contient un site de restriction pour l'enzyme *EcoRI*.

### ***III.1.3.4. Amplification de la région promotrice CR1L macaque (Macaca mulatta) (MCR1L2) en vue de son insertion en 5' de la construction codant pour DsRed***

Amorce en 5' : 5' CGC GAG AAG CTT CTC TTG ATT GCT TTC TTC TCA C 3'

Amorce en 3' : 5' CGC GAG GAA TTC GCT CCC GGG TTC TCG GAG AAG AGA 3'

L'amorce en 5' contient un site de restriction pour l'enzyme *HindIII* et l'amorce 3' contient un site de restriction pour l'enzyme *EcoRI*.

## **III.1.4. Technique d'amplification de l'ADN par PCR**

L'ADN génomique est utilisé pour l'amplification des régions promotrices des gènes CR1 et CR1L humains et macaques (*Macaca mulatta*). Cent µL de tampon contenant 500 ng d'ADN sont ajoutés à 500 ng d'amorces 5' et 3', 16 nM de dNTP, 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 2U d'ADN polymérase Amplitaq (Perkin Elmer, Roissy, France). La réaction de PCR est réalisée grâce à un thermocycleur *Gene Amp PCR System 9600* (Perkin Elmer, Roissy, France). Le mélange réactionnel est soumis à 30 cycles

d'amplifications, chaque cycle se compose de 1 min à 94°C, 1 min à 56°C et 1 min à 72°C. La spécificité des produits de PCR est analysée après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%, extraction par le kit *gel extraction kit* (Qiagen) et séquençage par la société génome express (Meylan, France).

### III.1.5. Construction des vecteurs contenant les différentes régions promotrices des gènes CR1 et CR1L humains et macaques (*Macaca mulatta*)

#### III.1.5.1. Construction des vecteurs *pDsRed-HumCR1*, *pDsRed-HumCR1L*, *pDsRed-MacCR1* et *pDsRed-MacCR1L1* et *pDsRed-MacCR1L2*

Le vecteur pDsRed (clontech, France) est digéré par *EcoRI* et *Hind III*, puis déphosphorylé. Les amplimères correspondant aux séquences spécifiques des régions promotrices sont digérés avec *EcoRI* et *Hind III* puis ligués dans pDsRed ainsi ouvert.

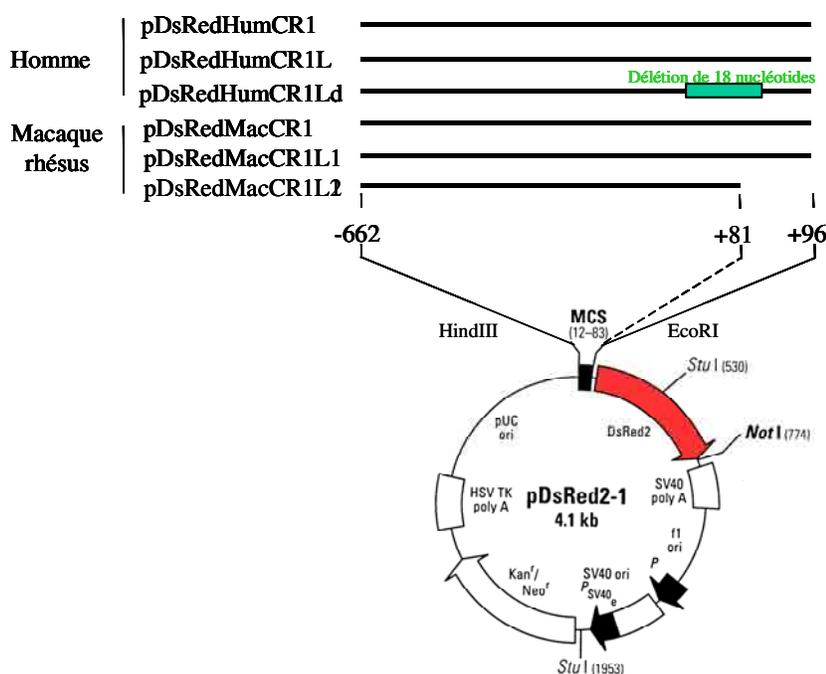


Figure 35 : Vecteurs d'expression eucaryote contenant les promoteurs des gènes CR1 et CR1like (CR1L) humains et macaques (*Macaca mulatta*).

## **IV. Transfections des cellules eucaryotes par les plasmides**

### **IV.1. Transfections simples des cellules eucaryotes par les plasmides**

#### **IV.1.1. Cellules CHO**

La lignée de cellules adhérentes d'ovaire de Hamster (ATCC CRL-9096 ; American type Culture Collection, Rockville, MD, EU) ou CHO ΔG44, a été utilisée pour la transfection des plasmides pDsRed-HCR1, pDsRed-HCR1L, pDsRed-MCR1 et pDsRed-MCR1L1 et pDsRed-MCR1L2. Les cellules CHO ΔG44 non transfectées sont cultivées en milieu HAM F12 (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gln : Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. Tous les milieux sont filtrés sur des filtres Stericup™ de 0,22 µm (MILLIPORE, Saint Quentin-en-Yvelines, France) avant utilisation.

La transfection est réalisée avec le kit de transfection Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Un jour avant la transfection, les cellules sont trypsinées. Trois cents mille cellules par puits sont cultivées en milieu dépourvu de sérum dans une plaque de 24 puits, de sorte qu'elles soient à 90% de confluence le jour de la transfection. Pour chaque puits, 2 µL de lipofectamine sont dilués dans 50 µL d'Opti-MEM et incubés 5 min à température ambiante. Un µg d'ADN dilué dans 50 µL d'Opti-MEM est ajouté. Ce mélange est incubé 20 min à température ambiante puis déposé dans les puits contenant les cellules cultivées dans 0,5 mL de milieu sans sérum. Les cellules sont incubées pendant 24h à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite placées en milieu sélectif HAM F12 supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), 10% de FCS (Gibco BRL) et 1% de L-glutamine. Le lendemain, les cellules sont placées en milieu sélectif HAM F12 supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), 10 % de FCS (Gibco BRL) et 1% de L-glutamine et 750 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.2. Cellules 293T**

La lignée cellulaire 293T est une lignée de cellules adhérentes, résultant de la transformation de cellules primaires de rein d'embryon humain (ATCC CRL-1573). Les cellules 293T sont cultivées en milieu DMEM (Gibco BRL) supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100 U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. La transfection est réalisée comme précédemment avec le kit de transfection Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen). Après transfection, les cellules sont incubées pendant 48h en milieu DMEM, puis placées en milieu de sélection, constitué de DMEM supplémenté avec des antibiotiques, 10 % de FCS (Gibco BRL), 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) et 500 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.3. Cellules CRL1805**

La lignée cellulaire CRL1805 est une lignée lymphoblastoïde de cellules en suspension de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*). Les cellules CRL1805 sont cultivées en milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100 U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

La transfection est réalisée avec le kit de transfection DMR1E-C Reagent (Invitrogen). Pour chaque puits d'une plaque 6 puits, 4 µL sont ajoutés à 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL). Quatre µg d'ADN dilués dans 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL) sont ajoutés et mélangés doucement. La plaque est incubée 30 min à température ambiante. Deux millions de cellules dilués dans 0,2 mL de RPMI sans sérum sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 5h à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. Pour chaque puits, 2 mL de milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec 15 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) sont ajoutés, les cellules sont ensuite incubées à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

Le lendemain, les cellules sont incubées en milieu de sélection, constitué de RPMI supplémenté avec des antibiotiques, 10 % de FCS (Gibco BRL), 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) et 500 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.4. Cellules HeLa229**

La lignée cellulaire HeLa229 est une lignée épithéliale humaine de cellules en suspension. Les cellules HeLa229 sont cultivées en milieu MEM eagle (Gibco BRL) supplémenté avec

des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100 U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL), du bicarbonate de sodium (1,5g/L), 1mM de pyruvate de sodium et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

La transfection est faite avec le kit de transfection DMRIE-C Reagent (Invitrogen). Pour chaque puits d'une plaque 6 puits, 4 µL sont ajoutés à 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL). Quatre µg d'ADN dilués dans 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL) sont ajoutés et mélangés doucement. La plaque est incubée 30 min à température ambiante. Deux millions de cellules dilués dans 0,2 mL de RPMI sans sérum sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 5h à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. Pour chaque puits, 2mL de milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec 15 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) sont ajoutés, les cellules sont ensuite incubées à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

Le lendemain, les cellules sont incubées en milieu de sélection, constitué de RPMI supplémenté avec des antibiotiques, 10 % de FCS (Gibco BRL), 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) et 500 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.5. Cellules K562**

La lignée cellulaire K562 est une lignée érythro-monocytaire humaine de cellules en suspension. Les cellules K652 sont cultivées en milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100 U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

La transfection est faite avec le kit de transfection DMRIE-C Reagent (Invitrogen). Pour chaque puits d'une plaque 6 puits, 4 µL sont ajoutés à 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL). Quatre µg d'ADN dilués dans 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL) sont ajoutés et mélangés doucement. La plaque est incubée 30 min à température ambiante. Deux millions de cellules dilués dans 0,2 mL de RPMI sans sérum sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 5H à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. Pour chaque puits, 2 mL de milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec 15 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) sont ajoutés, les cellules sont ensuite incubées à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

Le lendemain, les cellules sont incubées en milieu de sélection, constitué de RPMI supplémenté avec des antibiotiques, 15 % de FCS (Gibco BRL), 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) et 500 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.6. Cellules U937**

La lignée cellulaire U937 est une lignée monocyttaire humaine de cellules en suspension. Les cellules U937 sont cultivées en milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100 U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL), 10 mM d'hépes et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

La transfection est réalisée avec le kit de transfection DMRIE-C Reagent (Invitrogen). Pour chaque puits d'une plaque 6 puits, 4 µL sont ajoutés à 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL). Quatre µg d'ADN dilués dans 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL) sont ajoutés et mélangés doucement. La plaque est incubée 30 min à température ambiante. Deux millions de cellules dilués dans 0,2 mL de RPMI sans sérum sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 5h à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. Pour chaque puits, 2 mL de milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté 15 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) sont ajoutés, les cellules sont ensuite incubées à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

Le lendemain, les cellules sont incubées en milieu de sélection, constitué de RPMI supplémenté avec des antibiotiques, 10 % de FCS (Gibco BRL), 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) et 500 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.7. Cellules HEL92.1.7**

La lignée cellulaire HEL92.1.7 est une lignée érythroblastoïde humaine de cellules en suspension. Les cellules HEL92.1.7 sont cultivées en milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100 U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL), 10 mM d'hépes et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

La transfection est réalisée avec le kit de transfection DMRIE-C Reagent (Invitrogen). Pour chaque puits d'une plaque 6 puits, 4 µL sont ajoutés à 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL). Quatre µg d'ADN dilués dans 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL) sont ajoutés et mélangés doucement. La plaque est incubée 30 min à température ambiante. Deux millions de cellules dilués dans 0,2 mL de RPMI sans sérum sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 5h à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. Pour chaque puits, 2 mL de milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté 15 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) sont ajoutés, les cellules sont ensuite incubées à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

Le lendemain, les cellules sont incubées en milieu de sélection, constitué de RPMI supplémenté avec des antibiotiques, 10 % de FCS (Gibco BRL), 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) et 500 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.8. Cellules UT7**

La lignée cellulaire UT7 est une lignée monocyttaire humaine de cellules en suspension. Les cellules UT7 sont cultivées en milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100 U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL) et 1% de L-glutamine (Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

La transfection est réalisée avec le kit de transfection DMRIE-C Reagent (Invitrogen). Pour chaque puits d'une plaque 6 puits, 4 µL sont ajoutés à 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL). Quatre µg d'ADN dilués dans 0,5 mL d'Opti-MEM (Gibco BRL) sont ajoutés et mélangés doucement. La plaque est incubée 30 min à température ambiante. Deux millions de cellules dilués dans 0,2 mL de RPMI sans sérum sont ajoutés. La plaque est incubée pendant 5h à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>. Pour chaque puits, 2 mL de milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec 15 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) sont ajoutés, les cellules sont ensuite incubées à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

Le lendemain, les cellules sont incubées en milieu de sélection, constitué de RPMI supplémenté avec des antibiotiques, 10 % de FCS (Gibco BRL), 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) et 500 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.9. Cellules HepG2**

La lignée cellulaire HepG2 est une lignée de cellules épithéliales adhérentes d'origine hépatocytaire. Les cellules HepG2 sont cultivées en milieu RPMI (Gibco BRL) supplémenté avec des antibiotiques (Gibco BRL), comprenant Pénicilline (100 U/mL, Streptomycine (100 U/mL) et Amphotéricine B (0,25 µg/mL), 10 % de FCS (Gibco BRL) et 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) à 37°C / 5 % CO<sub>2</sub>.

La transfection est réalisée comme précédemment décrite pour les lignées CHO et 293T avec le kit de transfection Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen). Après transfection, les cellules sont incubées pendant 48h en milieu RPMI, puis placées en milieu de sélection, constitué de RPMI supplémenté avec des antibiotiques, 10 % de FCS (Gibco BRL), 1 % de L-glutamine (Gibco BRL) et 500 µg/mL de G418 (SIGMA).

#### **IV.1.10. Efficacité de transfection**

Le vecteur pCMV-GFP (Clontech, France) a été utilisé comme contrôle de transfection. La protéine verte fluorescence (GFP) est produite sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV) qui est un promoteur fort. La présence de la protéine verte observée en microscopie à fluorescence témoigne de l'efficacité de transfection.

### **V. Recherche des sites de liaison des facteurs de transcription**

Les séquences des régions promotrices des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) ont été analysées à l'aide d'un logiciel (TESS), mis en ligne par l'université de Pennesylvanie (Etats-Unis) ([URL:http://www.cbil.upenn.edu/tess](http://www.cbil.upenn.edu/tess)).

## **VI. CR1 et paludisme**

### **VI.1. Echantillons d'ADN génomique**

Les échantillons d'ADN génomique de Macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*) ont été gracieusement fournis par D. Birmingham (Département de néphrologie de médecine interne, Université de l'Ohio, EU). Les échantillons d'ADN génomique de Babouin (*Papio Hamadryas*), Mandrill (*Mandrillus sphinx*), Chimpanzé (*Pan troglodytes*), Gibbon (*Hylobates gabriellae*), Orang-outan (*Pongo pygmaeus*) et Gorille (*Gorilla gorilla*) ont été gracieusement fournis par A. Gessain (Institut Pasteur, Paris). Les échantillons d'ADN génomique de singe écureuil (*Saimiri sciureus*), de Tamarin (*Saguinus midas*) et Saki (*Pithecia pithecca*) ont été gracieusement fournis par F. Merien (Institut Pasteur, Cayenne).

Les échantillons d'ADN génomique des sujets humains de phénotype « Hegelson » ont été gracieusement fournis par le Dr N. Pham (CNRGS : Centre Nationale Recherche sur les Groupes Sanguins, Paris).

## **VI.2. Etude de la région SI<sup>a</sup> chez certains singes de l'ancien monde et certains singes du nouveau monde**

Le génotypage SI<sup>a</sup> et la présence d'éventuelles mutations nucléotidiques de la portion du gène de CR1 codant pour l'antigène de groupe sanguin Knops : SI<sup>a</sup> a été entrepris au sein de différentes espèces de primates classifiés dans les singes de l'ancien monde et les singes du nouveau monde. Le génotypage SI<sup>a</sup> est réalisé après séquençage des amplimères correspondant à l'exon 29 codant pour les SCR 24 et 25 de CR1. La PCR est réalisée à partir d'ADN génomique des différentes espèces de primates suivantes : Macaque rhésus (*Macaca mulatta*), Macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*), Babouin (*Papio hamadryas*), Mandrill (*Mandrillus sphinx*), Chimpanzé (*Pan troglodytes*), Gibbon (*Hylobates gabriellae*), Orang-outan (*Pongo pygmaeus*), Gorille (*Gorilla gorilla*), Singe écureuil (*Saimiri sciureus*), Tamarin (*Saguinus midas*) et Saki (*Pithecia pithecca*)

amorce en 5' : TAA AAA ATA AGC TGT TTT ACC ATA CTC

amorce en 3' : CCC TCA CAC CCA GCA AAG TC

L'ADN génomique est utilisé pour l'amplification de l'exon 29 codant pour les SCR 24 et 25 de CR1 des primates. Cent µL de tampon contenant 500 ng d'ADN sont ajoutés à 500 ng d'amorces 5' et 3', 16 nM de dNTP, 10 mM de Tris-HCl pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 2U d'ADN polymérase Amplitaq (Perkin Elmer, Roissy, France). La réaction de PCR est réalisée grâce à un thermocycleur *Gene Amp PCR System 9600* (Perkin Elmer). Le mélange réactionnel est soumis à 32 cycles d'amplifications, chaque cycle se compose de 1 min à 94°C, 1 min à 60 °C et 1 min à 72°C. La spécificité des produits de PCR est analysée après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%, extraction par le kit *gel extraction kit* (Qiagen) et séquençage par la société génome express (Meylan, France).

## **VI.3. Etude de la région SI<sup>a</sup> chez des sujets humains de phénotype « Hegelson »**

Le protocole est identique au VI.2

#### **VI.4. Etude de la formation des rosettes entre érythrocytes de Macaque rhésus et érythrocytes humains infectés par *Plasmodium falciparum***

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie du Pr O. Puijalon de l'Institut Pasteur.

##### **VI.4.1. Culture *in vitro* de la souche 89F5 var O de *Plasmodium falciparum***

La culture de *Plasmodium falciparum in vitro* est fondée sur les protocoles initialement développés par Haynes, Trager et Jensen [338,339]. La souche 89F5 var O de *Plasmodium falciparum* est cultivée en présence d'érythrocytes humains de groupe O+, avec un hémocrite de 5%, dans du milieu RPMI1640 supplémenté avec 25 mM HEPES, 2g/L de bicarbonate de sodium, gentamicine (1mg/L), 92 µM hypoxanthine et 10% de sérum humain AB+. La culture du parasite a lieu dans des boîtes de culture cellulaire (25 cm<sup>2</sup>) placées à l'intérieur d'une enceinte thermostatée à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. La parasitémie est contrôlée quotidiennement au moment du renouvellement du milieu de culture, par coloration de Giemsa afin de la maintenir à une valeur voisine de 5%.

##### **VI.4.2. Enrichissement en rosettes de la souche 89F5 Var O de *Plasmodium falciparum***

Deux mL de culture parasitaire à 5% d'hémocrite sont déposés à la surface d'un milieu de séparation (ficoll, lymphoprep d=1,077) et centrifugés pendant 15 secondes à 824g à température ambiante dans une centrifugeuse (modèle 5702, Eppendorf, Le Pecq, France). Le culot contient les rosettes et est repris dans du milieu de culture parasitaire.

##### **VI.4.3. Marquage des globules rouges de Macaque rhésus avec du C-FDA (Carboxy-Fluoresceine Diacetate, Sigma)**

Cinquante µL de culot érythrocytaire de Macaque rhésus sont remis en suspension dans 1 mL de solution de marquage C-FDA diluée dans du milieu de culture parasitaire pour obtenir une concentration finale de 300 µg/mL. La durée du marquage est de 15 minutes à 37°C. Les érythrocytes sont ensuite lavés 3 fois en RPMI puis repris dans du milieu de culture parasitaire à un taux d'hémocrite final de 5%.

#### **VI.4.4. Rupture des rosettes constituées d'érythrocytes humains en présence d'érythrocytes de Macaque rhésus marqués avec du C-FDA**

Vingt cinq  $\mu\text{L}$  de culture enrichie en rosettes sont mélangés avec un volume égal de globules rouges de Macaque marqués avec du C-FDA dans un microtube type eppendorf. Cette suspension cellulaire est passée plusieurs fois à travers l'aiguille d'une seringue (0,45 mm de diamètre) de façon à dissocier mécaniquement les érythrocytes infectés des érythrocytes non infectés constituant les rosettes. Elle est ensuite placée pendant une heure à l'intérieur d'une enceinte thermostatée à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. La reformation des rosettes est observée au microscope à fluorescence (Zeiss).

## **VII. Etude du dépôt de C4d érythrocytaire (EC4d) chez les patients transplantés rénaux**

### **VII.1. Patients inclus dans l'étude**

L'étude clinique du EC4d a été menée sur les sites de Lyon (Hôpital Edouard Herriot), Paris (Necker) et Reims (CHU Reims) à partir de prélèvements systématiques en périgresse précoce durant la période d'hospitalisation et des rendez-vous de suivi. Les biopsies du greffon rénal (BR) étaient ou bien indiquées (BR non systématique) ou bien réalisées de manière systématique (BR systématique) selon des protocoles propres à chaque équipe. Aucune biopsie n'a été réalisée dans le but spécifique de corrélation avec le EC4d. Les prélèvements pour marquage érythrocytaire C4d étaient réalisés sur tubes EDTA standard de 2,5 mL ou de 5 mL de sang. Ces prélèvements EDTA ont été conservés à 4°C en attendant la quantification du EC4d déterminée par cytométrie de flux, à Reims hebdomadairement.

Le recrutement des patients s'est déroulé sur une période de un an allant du 1<sup>er</sup> mai 2005 au 30 avril 2006. Deux populations contrôles ont été constituées. La première comprenait des sujets volontaires sains non transplantés, la seconde correspondait à des patients lupiques connus non transplantés. Les sujets lupiques avaient tous un diagnostic de lupus érythémateux disséminé (LED) depuis au moins cinq ans. Ils étaient régulièrement suivis au CHU de Reims dans les services des Maladies Infectieuses, par le Pr. Roland JAUSSAUD, ou bien de Médecine Interne, par le Pr. Jean Lou PENNAFORTE.

## **VII.2. Anatomopathologie : analyse en microscopie optique et microscopie à fluorescence**

Les biopsies rénales ont été réalisées en premier lieu à l'occasion d'une dysfonction aiguë ou subaiguë du greffon, puis secondairement lors de biopsies systématiques de dépistage ou au cours des protocoles de recherche des différents services.

Deux carottes biopsiques ont été réalisées pour étude histologique standard et examen en immunofluorescence anti-C4d. L'étude histologique a été réalisée après coloration trichromique de Masson, les lésions observées ont été cotées selon la classification internationale de Banff 1997 Rev 2001.

## **VII.3. Evaluation du dépôt de C4d au niveau des capillaires péritubulaires rénaux**

La microscopie à fluorescence après immunomarquage a été utilisée pour évaluer le dépôt de C4d au niveau des capillaires péritubulaires rénaux. Les lames portant les coupes de biopsies rénales sont incubées pendant 60 min à température ambiante, à l'obscurité et en chambre humide avec un anticorps monoclonal murin anti-C4d humain dilué au 1/100 dans du PBS (A213 Quidel, San Diego, Etats Unis). Après deux lavages de 5 min en PBS, un anticorps anti-souris biotinylé (Amersham, Life Sciences, Les Ullis, France) dilué au 1/50<sup>e</sup> dans du PBS est déposé et incubé pendant 60 min à température ambiante, à l'obscurité et en chambre humide. Après deux lavages de 5 min en PBS, de la streptavidine couplée à l'Alexa 488 (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France) diluée au 1/1000<sup>e</sup> dans du PBS est déposée et incubée pendant 30 min à température ambiante, à l'obscurité et en chambre humide. Après deux lavages de 5 min en PBS et un rinçage dans de l'eau déminéralisée, les lames sont montées en utilisant un milieu pour fluorescence anti-fading. La lecture est réalisée au microscope à fluorescence à 488 nm, grossissement x20.

Les positivités pour le C4d apparaissent sous la forme d'un marquage linéaire vert fluorescent le long des capillaires péritubulaires. Seuls les marquages de plus de 50% des capillaires péritubulaires ont été considérés comme positifs. Les marquages focaux, de même que l'absence de marquage des capillaires péritubulaires ont été considérés comme négatifs. Le marquage des capillaires glomérulaires servait de témoin interne positif. Les lames ont été lues à Necker par deux observateurs, les Drs. Laure Hélène NOEL et Natacha PATEY, à

Lyon et Reims par un observateur unique respectivement le Dr. Brigitte MAC-GREGOR et le Pr. Philippe BIREMBAUT.

#### **VII.4. Evaluation du dépôt de C4d à la surface des érythrocytes (EC4d)**

La cytométrie de flux après immunomarquage a été utilisée pour évaluer le dépôt de C4d érythrocytaire. Deux millions d'érythrocytes, lavés trois fois au PBS, sont incubés pendant 45 min à 4°C avec 2 µg d'anticorps monoclonal murin anti-C4d humain biotinylé (A704 Quidel, San Diego, Etats Unis). Toutes les incubations et lavages se font au PBS contenant 1% d'albumine bovine sérique (SAB). Après trois lavages, 1,5 µg de streptavidine couplée à la phycoérythrine (Tebu, Paris, France), 1 µg d'anticorps de chèvre anti-streptavidine biotinylé (Biosys, Compiègne, France) et 1.5 µg de streptavidine couplée à la phycoérythrine sont ajoutés séquentiellement et incubés avec les érythrocytes pendant 45 min à 4°C. Les érythrocytes marqués sont ensuite fixés par 350 µl d'une solution de formaldéhyde (Merck, Nogent/marne, France) à 0.37%.

Les cellules marquées sont analysées avec un cytomètre FACStar plus® (Becton Dickinson, CA, EU). Au moins 10000 événements sont enregistrés pour chaque échantillon. Le canal moyen de fluorescence de toute la population érythrocytaire est utilisé pour évaluer le dépôt de C4d/E.

La courbe d'étalonnage, établie grâce à trois populations érythrocytaires de densités de CR1 connues (180 sites, 550 sites et 980 sites) et utilisée pour convertir l'intensité du marquage CR1 en nombre de site CR1/E, a été utilisée dans un premier temps comme un standard externe pour établir une échelle de valeurs de C4d érythrocytaire en Unités Arbitraires (UA). Nous avons ensuite utilisé le ratio EC4d MFC% pour évaluer les dépôts de C4d (voir VII.6)

#### **VII.5. Evaluation du dépôt de C3b et d'immunoglobulines (Ig) à la surface des érythrocytes**

La microscopie à fluorescence et la cytométrie de flux après double immunomarquage ont été utilisées pour évaluer le dépôt de C3 et d'immunoglobulines à la surface des érythrocytes. Le protocole est le même qu'au VII.4 sauf qu'en plus de l'anti-C4d, on ajoute au cours de la première étape de marquage soit un anticorps monoclonal murin anti-C3b couplé FITC (Cappel, Cochranville, EU) soit un anticorps de chèvre anti-Ig(H+L) humaines couplé FITC (Southern biotechnology associated, Montrouge, France).

## **VII.6. Détermination du seuil de positivité du marquage C4d érythrocytaire : définition du Ratio EC4d MFC%**

Le marquage lors de manipulations différentes à des temps différents expose naturellement à des variations de signal de fluorescence pour un prélèvement donné qui présente par ailleurs le même nombre de sites antigéniques pour l'anticorps. Pour tenter de neutraliser ce biais de variabilité inter manipulations des valeurs de fluorescence moyennes (MFC) mesurées par le cytomètre et pour avoir un standard comparatif, nous avons défini un rapport constitué par la valeur de l'échantillon à tester (prélèvement Z) divisé par celle d'un témoin sain unique (Témoin Seuil) et exprimé en pourcentage. Le témoin choisi présentait un marquage EC4d parmi les plus élevés des sujets normaux. Ce rapport constitue le EC4d Ratio MFC exprimé en pourcentage :

$$\text{Ratio EC4d MFC\%} = (\text{MFC prélèvement Z} / \text{MFC Témoin Seuil}) \times 100$$

Les patients présentant un ratio EC4d MFC% supérieur à 105 % sont considérés positifs pour EC4d. Le témoin seuil est utilisé au cours de chaque manipulation.

Nous avons également fabriqué un contrôle positif appelé TEDA (voir VII.7) utilisable pendant plusieurs semaines au cours de chaque manipulation, comme standard pour pouvoir comparer les résultats obtenus chaque semaine.

Toutefois c'est le ratio EC4d MFC% qui a été retenu pour comparer la présence des dépôts de EC4d avec celle des dépôts de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires (HC4d) (protocole décrit : Figure 36, page 122).

## **VII.7. Dépôt artificiel de C4d érythrocytaire *in vitro* (TEDA)**

Stérilement, un demi mL de sang frais prélevé sur EDTA est ajouté à 12,5 mL de tampon LIS (100g/L de sucrose, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub> et 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) et incubé sous agitation à 37°C pendant 30 min. Les érythrocytes sont lavés par centrifugation à 2410g à 4°C pendant 5 min. Cinquante µL de volume globulaire sont stockés dans 3 ml d'un milieu de conservation pour érythrocytes (ID cell stab, Cressiers sur Morat, Suisse).

### **VII.8. Trypsination des érythrocytes**

Un volume correspondant à 1/3 de la suspension cellulaire préparée au VII.7 est mélangé à un volume égal de PBS contenant 0,1% de Trypsine-EDTA (Gibco, cergy-Pontoise, France) et incubé à 37°C pendant 15 min sous agitation légère. Après 1 lavage en tampon LIS par centrifugation de 5 min à 2410g à 4°C, le volume globulaire est stocké dans 3 ml d'un milieu de conservation pour érythrocytes (ID cell stab, Cressiers sur Morat, Suisse).

### **VII.9. Papaïnation des érythrocytes**

Cent µL de culot globulaire sont mélangés à 40µL d'une solution aqueuse de papaïne 1% (Merck) et incubés au bain-marie à 37°C pendant 7 min. Après 3 lavages en PBS par centrifugation de 5 min à 2410g à 4°C, le volume globulaire est stocké dans 3 ml d'un milieu de conservation pour érythrocytes (ID cell stab, Cressiers sur Morat, Suisse).

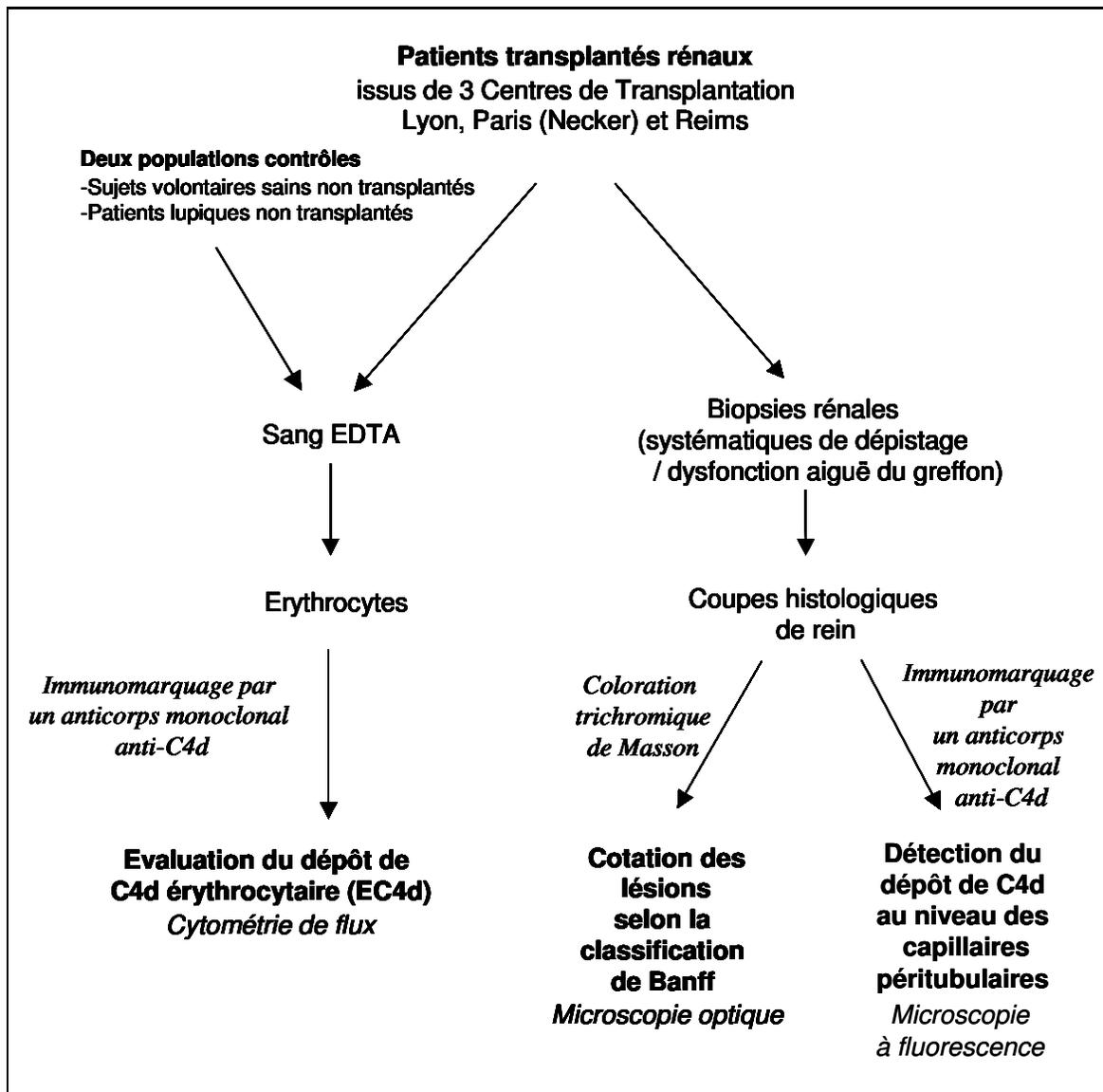
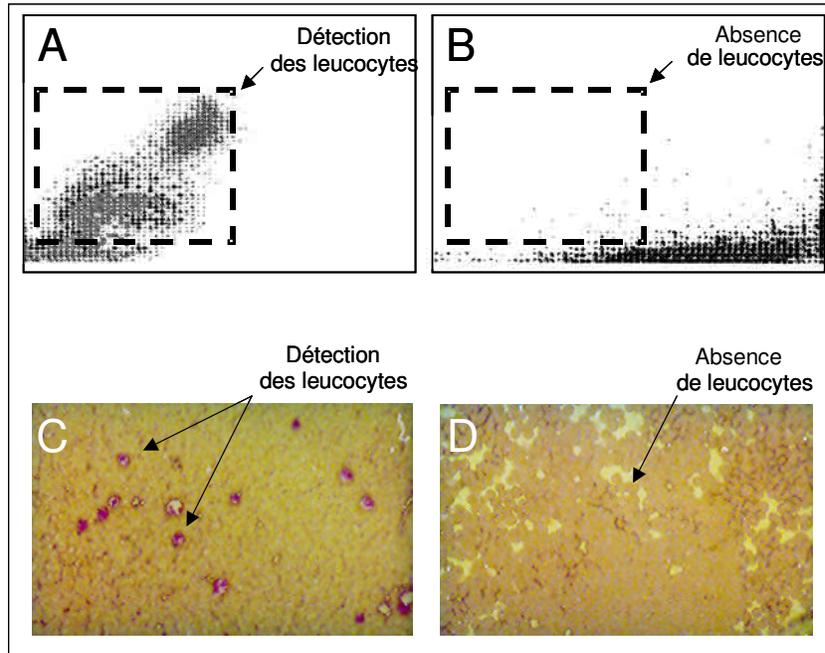


Figure 36 : Protocole suivi pour l'étude du dépôt de C4d érythrocytaire (EC4d) chez les patients transplantés rénaux.

## **RESULTATS**

# I. Etude de la structure et de la distribution des espèces moléculaires CR1 et CR1like (CR1L) érythrocytaires chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)

## I.1. Déplétion des leucocytes



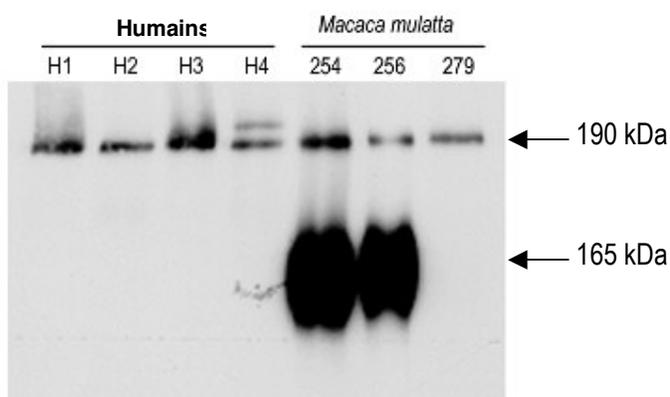
**Figure 37. Déplétion des leucocytes du sang totale de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) après passage au travers d'une colonne de microcellulose.**

La déplétion des leucocytes après passage du sang total de Macaque rhésus à travers une colonne d'alpha cellulose et de cellulose microcristalline a été confirmée après analyse de la numération sanguine par un automate (Coulter, BD, CA, EU). Les leucocytes ne sont plus détectés après passage du sang total à travers la colonne (Figure 37B, page 124) avec moins de  $0,8 \times 10^9/L$  leucocytes alors qu'avant passage le sang de Macaque contient  $9,3 \times 10^9/L$  leucocytes (Figure 37A, page 124). En microscopie optique, l'observation après coloration au May Grünwald Giemsa, des éléments figurés du sang total déposé sur des lames porte objet de microscopie, selon la technique de cyto-centrifugation, montre la présence de leucocytes dans le sang de Macaque rhésus avant le passage à travers la colonne de cellulose (Figure 37C, page 124) et l'absence des leucocytes après (Figure 37D, page 124).

## I.2. Etude du polymorphisme de longueur des espèces moléculaires CR1 et CR1like (CR1L) chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)

Afin de détecter d'éventuels polymorphismes de longueur et de structure de CR1 et CR1like chez l'Homme et chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*), nous avons utilisé une batterie d'anticorps monoclonaux anti-CR1 (J3D3, J3B11, E11, HB8592, 7G9, 9H3 et 1B4) dont la position des épitopes est reportée au niveau de Figure 27, page 73. Chaque anticorps anti-CR1 a été utilisé au cours de l'étude de polymorphisme de longueur pour révéler par western blot la présence des différentes formes de CR1 et CR1like après migration d'extraits membranaires érythrocytaires par la technique PAGE-SDS.

### I.2.1. Comparaison des espèces moléculaires de CR1 entre l'Homme et le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)



**Figure 38 : Analyse du polymorphisme de longueur de CR1 par Western-Blot avec l'anticorps monoclonal anti-CR1 TO5. Les membranes d'érythrocytes solubilisées ont été soumises à une électrophorèse PAGE-SDS (7,5 % d'acrylamide) en conditions non-réductrices. Chez l'Homme, un polymorphisme de longueur est observé. Le sujet H4 présente 2 allotypes CR1 à la surface de ses érythrocytes : CR1\*1 (190kDa) et CR1\*2 (220kDa). Chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) (singes 254 et 256), 2 espèces moléculaires CR1 sont révélées par TO5 : un CR1 de « type humain » (190kDa) et un CR1 spécifique de « type singe » (165 kDa). CR1 de « type singe » est plus abondant. Le Macaque rhésus 279 se distingue car il est dépourvu de CR1 de « type singe » . Il présente un profil humain.**

Chez l'Homme et le Macaque rhésus, l'analyse d'extraits membranaires d'érythrocytes par PAGE-SDS (7.5%) en conditions non réductrices montre des profils antigéniques de CR1 différents :

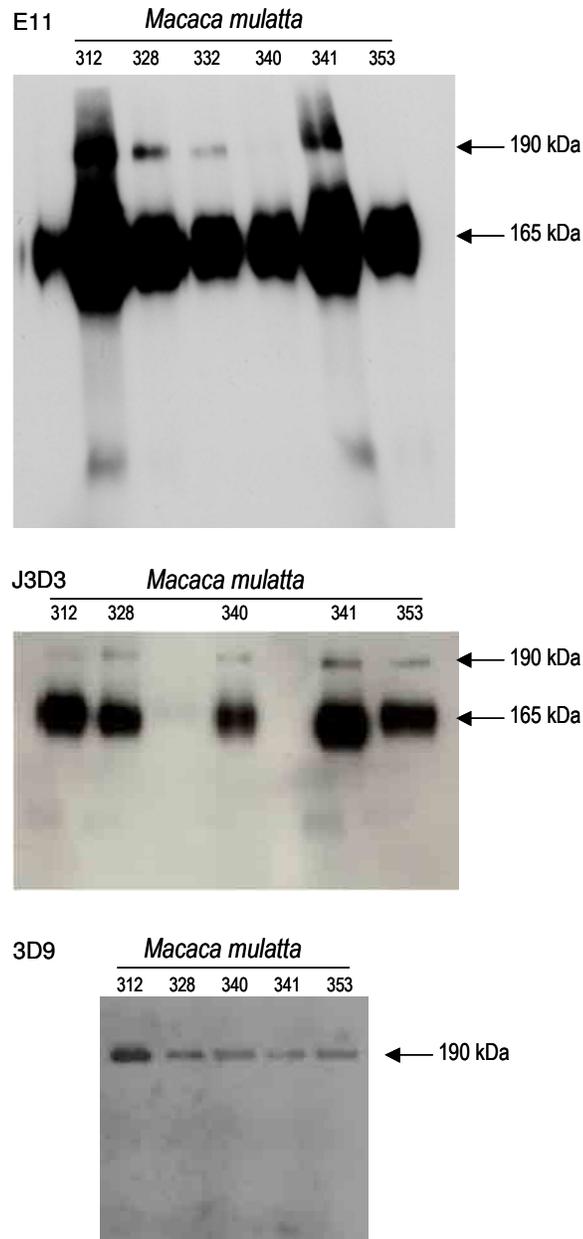
- L'Homme possède un CR1 de haut poids moléculaire (1 ou 2 allotypes). Les sujets H1, H2 et H3 expriment l'allotype CR1\*1 (bande de 190 kDa) alors que H4 exprime les allotypes CR1\*1 et CR1\*2 (deux bandes à 190 kDa et 220 kDa).

- Les Macaques rhésus (sujets 254 et 256) expriment un CR1 érythrocytaire de haut poids moléculaire (190 kDa) analogue au CR1 humain ou CR1 de « type humain » et un CR1 érythrocytaire plus court (165 kDa), spécifique de l'espèce, beaucoup plus abondant, appelé *CR1like* (CR1L) ou CR1 de « type singe » (Figures 38, 39 et 40, pages 125, 127 et 128).

Le Macaque rhésus 279 se distingue des autres Macaques et constitue de ce fait une exception. Quel que soit l'anticorps monoclonal employé (J3D3, J3B11, E11, HB8592, 7G9, 9H3 and 1B4) ici TO5, le singe 279 présente toujours un profil de type humain, c'est à dire, qu'il n'exprime pas la forme courte de CR1 (165 kDa). (Figures 38, 40 et tableau 14, pages 125, 128 )

### **I.2.2. Polymorphisme allotypique de CR1 de « type humain » chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

L'utilisation de l'anticorps monoclonal E11 permet de déceler un polymorphisme allotypique de la forme longue du CR1 ou CR1 de « type humain » chez les Macaques rhésus. La forme longue du CR1 ou CR1 de « type humain » n'est pas détectée chez certains singes (ici 340 et 353) avec l'anticorps anti-CR1 E11 alors qu'elle l'est avec les anticorps anti-CR1 J3D3, 3D9, J3B11, HB8592, 7G9, 9H3 et 1B4. La forme courte (165 kDa) ou CR1 de « type singe » est toujours décelée (Figure 39 et tableau 14, pages 127 et 128).



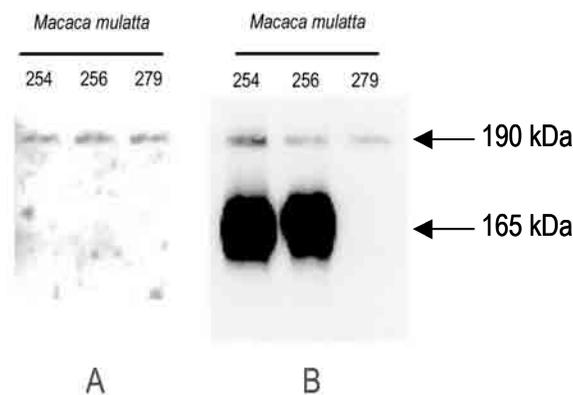
**Figure 39 : Analyse du polymorphisme de longueur du CR1 de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) par Western-Blot avec les anticorps monoclonaux anti-CR1 E11, J3D3 et 3D9. Les membranes d'érythrocytes solubilisées ont été soumises à une électrophorèse PAGE-SDS (7,5 % d'acrylamide) en conditions non-réductrices. Un polymorphisme allotypique a été mis en évidence au niveau du CR1 de « type humain » (190kDa) chez le Macaque rhésus. Le CR1 de « type humain » des Macaques 340 et 353 bien que détecté par J3D3 et 3D9, n'est pas détecté par E11. Par ailleurs, le CR1 de « type singe » qui n'est jamais détecté par 3D9, l'est toujours par E11 et J3D3.**

Anticorps monoclonaux anti-CR1	Humains	<i>Macaca mulatta</i>	
	(H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9)	CR1	CR1
J3D3	+	+	+ sauf 279
J3B11	+	+	+ sauf 279
3D9	+	+	-
Hb8592	+	+	+ sauf 279
1b4	+	+	+ sauf 279
E11	+	+ sauf 340, 353	+ sauf 279
T05	+	+	+ sauf 279
9H3	+	+	+ sauf 279
7G9	+	+	+ sauf 279

**Tableau 14 : Réactivités croisées par western blot des anticorps monoclonaux anti-CR1 humain pour CR1 et CR1like du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) .**

**I.2.3. L'anticorps 3D9 ne détecte que le CR1 de « type humain » de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

L'anticorps monoclonal 3D9 ne se fixe que sur le CR1 de « type humain » des Macaques rhésus. Il n'a pas d'affinité pour le CR1 de « type singe » ou CR1like (absence de bandes de 165 kDa) (Figures 39, 40 et tableau 14, pages 127 et 128).



**Figure 40 : Comparaison de l'analyse du polymorphisme de longueur du CR1 humain et du CR1 de Macaque rhésus par Western-Blot révélé par l'anticorps monoclonal anti-CR1 3D9 (A) et l'anticorps monoclonal anti-CR1 HB8592 (B). Le CR1 de « type singe » (165kDa) n'est pas révélé par 3D9 (A) mais l'est par HB8592 (B). 3D9 ne détecte que la forme CR1 de « type humain » (190kDa). Le Macaque rhésus 279 est dépourvu de la forme CR1 de « type singe » (165kDa) (A, B).**

L'étude de CR1 chez le Macaque rhésus à l'aide d'une batterie d'anticorps monoclonaux anti-CR1, nous a permis de retenir J3D3 qui reconnaît les 2 formes de CR1 (CR1 de « type humain » et CR1 de « type singe » ou *CR1like*) et 3D9 qui reconnaît uniquement le CR1 de « type humain » pour la suite de nos travaux portant sur l'étude de la densité, de la distribution et de l'ancrage des 2 formes CR1 et *CR1like* à la surface des érythrocytes de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*).

Nous avons poursuivi cette étude par l'analyse en cytométrie de flux de la densité des 2 espèces moléculaires de CR1 érythrocytaires de Macaque rhésus : CR1 de « type humain » et CR1 de « type singe » ou *CR1like*.

### **I.3. Quantification des espèces moléculaires CR1 et *CR1like* (CR1L) chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

Pour mesurer la densité de CR1 à la surface des érythrocytes de Macaque rhésus par cytométrie de flux, nous avons utilisé J3D3 pour quantifier les 2 espèces moléculaires de CR1 (190 kDa/165 kDa) et 3D9 pour quantifier la forme CR1 « type humain » (165 kDa).

Concernant la quantification du CR1 humain, J3D3 et 3D9 permettent de dénombrer chez un même individu le même nombre de sites de CR1 érythrocytaire, ce qui montre que la quantification est indépendante de l'anticorps utilisé. (Tableau 15, page 130)

Le CR1 érythrocytaire de « type humain » est 1 à 2 fois plus exprimé chez le Macaque rhésus que chez l'Homme. La densité de CR1 érythrocytaire de « type singe » du Macaque rhésus est jusqu'à 10 fois plus élevée que la densité de CR1 érythrocytaire de l'Homme.

A la surface des érythrocytes de Macaque, on trouve 1/3 de formes CR1 de « type humain » pour 2/3 de formes CR1 de « type singe ».

Comme pour ce qu'on a observé par western-blot (Figure 38, 40, pages 125 et 128), le Macaque rhésus 279 se caractérise par une densité CR1 érythrocytaire comparable à une densité humaine. Comme pour les érythrocytes humains, le marquage par J3D3 ou 3D9 conduit à la détection d'un nombre de sites de CR1 équivalents (305 et 487 sites respectivement). Le déficit d'expression de son CR1 érythrocytaire correspond à une absence d'expression de son CR1 de « type singe ». (Tableau 15, page 130)

		Nombre de sites antigéniques (CR1/E) détectés par les anticorps	
		J3D3	3D9
Humains	H3	659	730
	H4	753	720
	H8	811	852
	H9	585	631
<i>Macaca mulatta</i>	254	8101	2860
	256	8999	2670
	312	5570	2289
	328	3162	1280
	332	1693	734
	340	7040	2365
	341	6795	1991
	279	305	487
	353	3652	1470

**Tableau 15 : Quantification des espèces moléculaires de CR1 érythrocytaires chez l'Homme et le Macaque rhésus par cytométrie de flux à l'aide des anticorps monoclonaux anti-CR1 J3D3 et 3D9.**

#### **I.4. Etude du décapage des espèces moléculaires CR1 et CR1like (CR1L) à la surface des érythrocytes du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

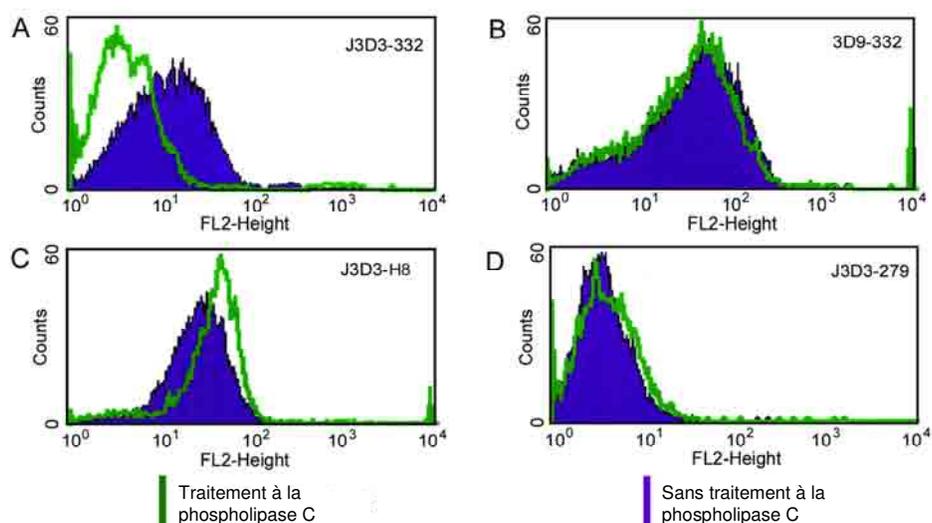
Afin de déterminer si les espèces moléculaires de CR1 érythrocytaire du Macaque rhésus sont des protéines transmembranaires ou des protéines à ancrage glycoposphatidylinositol (liaison GPI), les érythrocytes de Macaque rhésus ont été traités à la phospholipase C (PLC). La perte de CR1 érythrocytaire a été analysée par cytométrie de flux après immunomarquage par J3D3 et 3D9. Le décapage de CD59 de la surface des érythrocytes a permis de contrôler la qualité du traitement par l'enzyme PLC.

L'utilisation de J3D3 fixant les 2 espèces moléculaires de CR1 (CR1 de « type humain » et CR1 de « type singe ») et de 3D9 ne fixant que le CR1 de « type humain » nous a permis de discriminer les espèces moléculaires sensibles à la PLC.

A la surface des érythrocytes du Macaque rhésus (332) traités à la PLC, l'immunomarquage J3D3 diminue quand on compare avec les érythrocytes immunomarqués non traités à la PLC (Figure 41A, page 132), tandis que l'immunomarquage 3D9 demeure inchangé (Figure 41B, page 132).

A la surface des érythrocytes humains, l'immunomarquage J3D3 ne diminue pas après traitement à la PLC (Figure 41C, page 132). Cela suggère que la forme CR1 de « type singe » du Macaque rhésus est à liaison GPI tandis que la forme CR1 de « type humain » est transmembranaire.

Le traitement à la PLC des érythrocytes du Macaque rhésus 279, dont on sait qu'ils sont dépourvus de la forme CR1 de « type singe », n'entraîne pas de décapage de la forme « de type humain », ce qui confirme que cette espèce moléculaire de CR1 est transmembranaire chez le Macaque rhésus (Figure 41D, page 132).



**Figure 41 : Caractérisation de l’ancrage phospholipidique de la forme courte du CR1 érythrocytaire « de type singe » du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*). A, En cytométrie de flux, après traitement par la phospholipase C des érythrocytes de Macaque rhésus 332, le marquage par l’anticorps monoclonal anti-CR1 J3D3 qui reconnaît CR1 « type humain » et CR1 « type singe » diminue. B, Le marquage par l’anticorps monoclonal anti-CR1 3D9 qui reconnaît CR1 « type humain » reste inchangé après traitement par la phospholipase C. Ceci montre que l’espèce moléculaire sensible à la phospholipase C est CR1 de « type singe ». C, Il n’y a pas de baisse de l’immunomarquage chez l’Homme dont le CR1 est transmembranaire. D, Pour le singe 279 déficient pour la forme CR1 de « type singe », on n’observe pas non plus de baisse de l’immunomarquage après traitement par la phospholipase C. Chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*), le CR1 érythrocytaire de « type singe » possède un ancrage membranaire phospholipidique (GPI) et CR1 érythrocytaire de « type humain » est transmembranaire.**

### **I.5. Analyse de la distribution des espèces moléculaires de CR1 érythrocytaire**

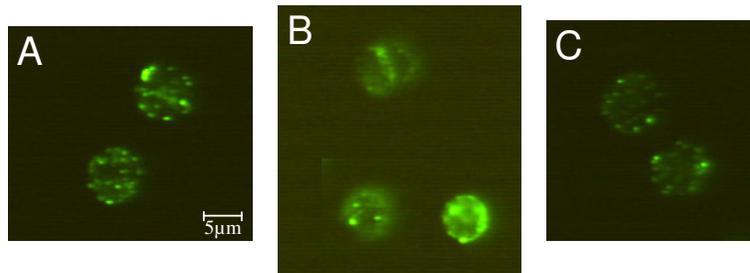
La distribution des 2 espèces moléculaires de CR1 érythrocytaire du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) a été analysée par microscopies optique et confocale.

### I.5.1. microscopie à fluorescence

L'analyse en microscopie à fluorescence des érythrocytes de Macaque immunomarkés par l'anticorps 3D9 spécifique du « type humain » de CR1 montre un marquage granulaire qui traduit une distribution en bouquets du CR1 macaque de « type humain » (Figure 42, A).

L'immunomarquage par J3D3 fixant les 2 espèces moléculaires est granulaire mais aussi plus diffus, ce qui correspond à la distribution en bouquets du CR1 de « type humain » et une distribution diffuse du CR1 de « type singe » (Figure 42, B).

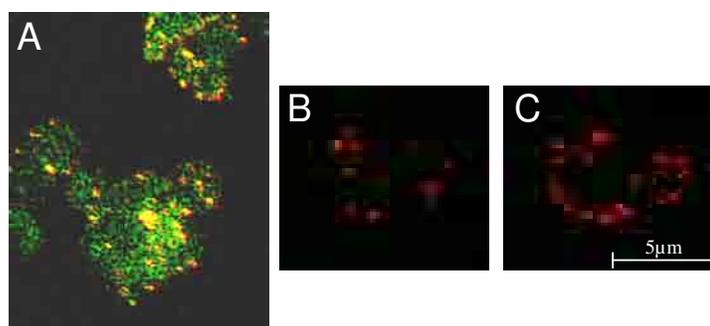
L'immunomarquage par J3D3 des érythrocytes du Macaque rhésus 279, dépourvus du CR1 « type singe » est granulaire ce qui confirme que le CR1 de « type humain » est arrangé en bouquets chez le Macaque rhésus (Figure 42, C). Ces résultats ont été appréciés par la microscopie confocale.



**Figure 42 : Analyse par microscopie à fluorescence de la distribution des 2 espèces moléculaires de CR1 à la surface des érythrocytes de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) après immunomarquage avec les anticorps monoclonaux anti-CR1 : 3D9 et J3D3. L'immunomarquage des érythrocytes du Macaque rhésus 332 par 3D9 est granulaire et correspond à une distribution en bouquets de CR1 de « type humain » (A). L'immunomarquage des érythrocytes de Macaque rhésus 332 par J3D3 est granulaire mais aussi plus diffus et correspond à une distribution en bouquets de CR1 de « type humain » et à une distribution plus diffuse de CR1 de « type singe » (B). L'immunomarquage par J3D3 des érythrocytes du Macaque rhésus 279, dépourvus du CR1 « type singe » est granulaire ce qui confirme que le CR1 de « type humain » est arrangé en bouquets chez le Macaque rhésus (C).**

### I.5.2. microscopie confocale

Après le double marquage des érythrocytes de Macaque rhésus par E11 (FITC) qui révèle les 2 espèces moléculaires : CR1 de « type humain » et de « type singe » et 3D9 (Alexa 568) qui révèle uniquement le CR1 de « type humain », on observe un marquage rouge qui correspond aux bouquets de CR1 de « type humain » transmembranaire, un marquage vert plus diffus qui correspond au CR1 de « type singe » et un marquage jaune qui correspond à des bouquets composés des 2 espèces moléculaires (Figure 43 A, page 134). L'arrangement en bouquets de CR1 de « type humain » est confirmé par l'observation des érythrocytes du Macaque rhésus 279 dont on a montré qu'il n'exprime à la surface de ces érythrocytes que la forme CR1 de « type humain », qui présentent un marquage granulaire (Figure 43 B, page 134). Les érythrocytes humains ont un marquage granulaire caractéristique des bouquets de CR1 (Figure 43 C, page 134).



**Figure 43 : Analyse par microscopie confocale de la distribution des 2 espèces moléculaires de CR1 à la surface des érythrocytes de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) après un double immunomarquage avec les anticorps monoclonaux anti-CR1 : 3D9 (Alexa568) et E11 (FITC). A la surface des érythrocytes de Macaque rhésus 332, le marquage rouge (3D9 Alexa568) correspond aux bouquets de CR1 de « type humain » transmembranaire, le marquage vert (E11 FITC) microgranulaire correspond au CR1 de « type singe » et le marquage jaune correspond à des bouquets composés des 2 espèces moléculaires (CR1 de « type humain » et CR1 de « type singe ») (A). Le Macaque rhésus 279 qui n'exprime à la surface de ses érythrocytes que la forme CR1 de « type humain » présente un marquage granulaire caractéristique d'une distribution en bouquets (B). Les érythrocytes humains ont un marquage granulaire caractéristique des bouquets de CR1 (C).**

Le Macaque rhésus possède à la surface de ses érythrocytes deux espèces moléculaires de CR1. Un CR1 de « type humain » de haut poids moléculaire transmembranaire distribué en bouquets avec une densité analogue à celle retrouvée chez l'Homme.

Le Macaque rhésus possède un CR1 de « type singe » ou *CR1like* qui est plus court que le CR1 « type humain », spécifique, 2 à 10 fois plus abondant et diffus sur toute la surface membranaire érythrocytaire. Il est ancré à la membrane des érythrocytes par une liaison GPI. Ces résultats montrent que *CR1like* qui est un pseudogène dans l'espèce humaine est dans l'espèce Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) un gène exprimé très actif.

Dans ces conditions, en vue de comprendre la régulation génique du CR1 chez l'Homme, nous avons décidé de comparer les séquences des promoteurs des gènes CR1 et *CR1like* humains et macaques. Les différences entre ces séquences pourraient expliquer les différences d'expression des gènes pour ces 2 espèces. Les séquences des promoteurs CR1 et *CR1like* étant inconnues, il nous a fallu les découvrir.

## **II. Recherche des promoteurs des gènes CR1 et *CR1like* du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

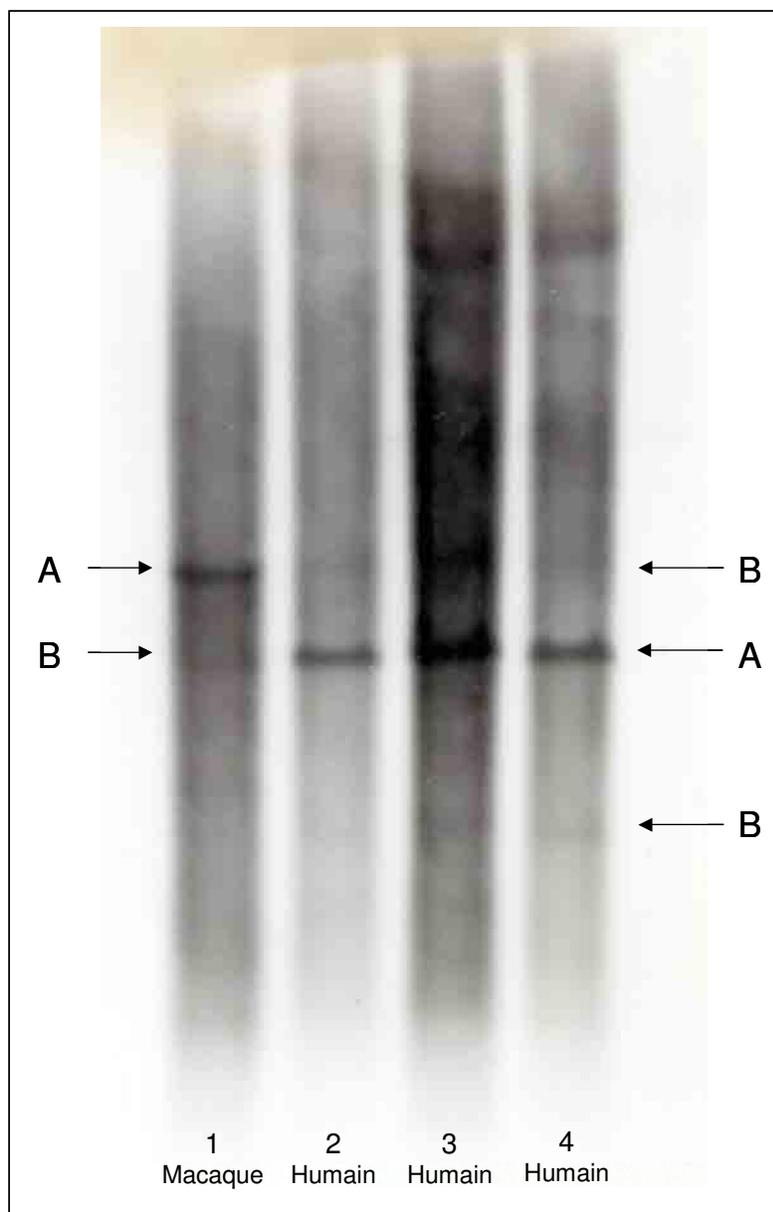
Dans un premier temps, nous avons fabriqué des sondes d'ADN à partir du génome humain, dont les séquences étaient analogues à celles des promoteurs CR1 et *CR1like* humains. Nous avons réalisé des *southern blot* pour hybrider ces sondes à l'ADN génomique de Macaque, de façon à déceler la présence éventuelle de séquences similaires à celles des promoteurs humains CR1 et *CR1like* au sein du génome du Macaque rhésus. Nous avons choisi d'utiliser l'enzyme *HindIII* dont le site de restriction est absent des régions promotrices des gènes CR1 et *CR1like* humains.

### **II.1. Southern blot**

La sonde CR1B dont la séquence correspond à une partie du promoteur du gène CR1 humain s'est hybridée en plusieurs endroits de l'ADN génomique Humain (Figure 44, : piste 2,3 et 4, page 136) mais aussi en deux endroits de l'ADN de Macaque (Figure 44 : piste1, page 136). Pour chaque piste, on constate une nette hybridation (Figure 44 : Flèche A, page 136) de la

sonde mais aussi de faibles hybridations (Figure 44: Flèche B, page 136). Ceci nous montre que le Macaque possède dans son génome une séquence très proche de la séquence du promoteur CR1B humain mais aussi une séquence un peu moins proche pouvant correspondre à la séquence du promoteur du gène *CR1like*.

Ce résultat a conforté notre idée de parvenir à isoler les séquences du promoteur des gènes CR1 et *CR1like* du Macaque à partir d'amplimères obtenus au cours de PCR utilisant des amorces dessinées à partir du génome humain (Figure 34, page 106 ).



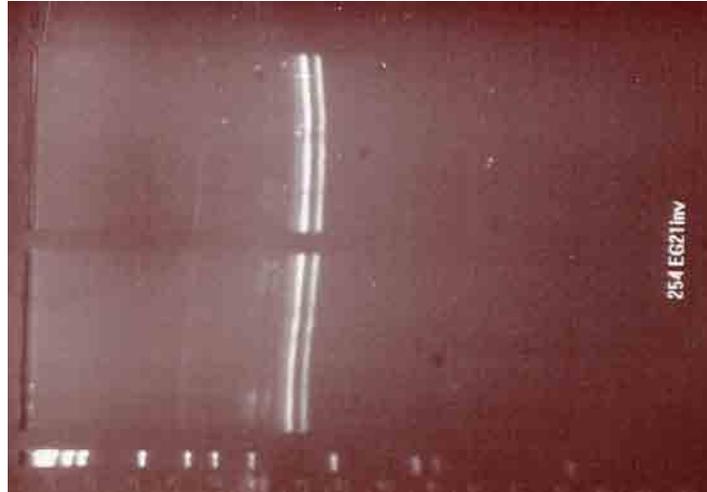
**Figure 44 : Hybridation de la sonde CR1B aux ADN génomiques d'humains et de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*). A : Hybridation forte avec la sonde CR1B. B : Hybridation faible avec la sonde CR1B.**

## **II.2. Détermination des séquences des promoteurs des gènes CR1 et CR1like (CR1L) de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

### **II.2.1. Recherche des amorces spécifiques des régions promotrices des gènes CR1 et CR1like macaques**

Une première PCR à l'aide d'amorces spécifiques du promoteur du gène CR1 humain (CR1B, CR1Linv) a été réalisée à partir du génome du Macaque et nous a permis d'obtenir la séquence CR1BS (Figure 34, page 106). CR1B correspond à l'amorce 5' dessinée dans le promoteur de CR1 humain, CR1Linv correspond à l'amorce 3' dessinée en aval du promoteur CR1like humain dans la zone codant pour la séquence signal. La séquence de l'amplimère obtenu a été comparée avec les régions promotrices connues de CR1 et CR1L humaines. Elle nous a permis de dessiner, 2 couples d'amorces (EG1, EG2, EG1inv, EG2inv) en espérant qu'ils soient communs aux régions promotrices CR1 et CR1L macaques.

Après avoir testé plusieurs combinaisons d'amorces, nous avons obtenu un amplimère avec le couple (EG2, EG1inv). Cet amplimère a été ensuite séparé en 2 bandes distinctes d'ADN (de 452 pb et 439 pb) grâce à un gel de métaphore 3% (Figure 45, page 138). Ces 2 bandes ont été extraites séparément puis amplifiées au cours d'une nouvelle PCR utilisant les mêmes amorces (EG2, EG1inv). Ces 2 produits de PCR ont été séquencés et l'analyse de leurs séquences montre qu'elles correspondent aux séquences des régions promotrices des gènes CR1 et CR1L du Macaque. A partir de ces dernières, nous avons dessiné les 2 amorces (M3Haut et M3Bas) spécifiques des régions promotrices CR1 et CR1L du Macaque (*Macaca mulatta*) en 3' en vue de les amplifier spécifiquement et de les cloner dans le vecteur pDsRed (Figure 46, page 138).



**Figure 45 : Résultat de la migration à travers le gel de métaphore 3% de l'amplimère obtenu après PCR utilisant le couple d'amorces (EG2, EG1inv). L'amplimère contient 2 produits de PCR de tailles différentes : 452 pb et 439 pb.**

**M3Haut 5' TTC TTC TCC CCA AGC ACA TCT AC 3'**  
**M3Bas 5' CTA CAA ACC AGA TTT GAT CTC AAA G 3'**

**Figure 46 : Séquences des amorces (sens 3' 5') spécifiques des régions promotrices des gènes CR1 et CR1like de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*).**

### II.2.2. Analyse des séquences signal

Les amplifications par PCR nous ont permis d'obtenir des amplimères qui ont été séquencés. Les séquences nucléotidiques ont été traduites en acides aminés afin de déterminer les 36 premiers acides aminés des séquences signal de CR1 et CR1like de Macaque rhésus.

Le début de la séquence signal des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhésus a été déduit à partir des séquences nucléotidiques comportant le début de l'exon 1 de ces gènes. La séquence signal du CR1 humain est homologue à 100% à la séquence de référence de CR1 (GenBank, numéro d'accèsion Y00816). La séquence signal du CR1L humain est homologue à 100% à la séquence de référence (GenBank, numéro d'accèsion AL137789.11 et AL365178.1).

Les séquences signal des gènes humains CR1 et CR1L et du gène CR1 de Macaque rhésus présentent 2 méthionines séparées par 4 acides aminés. La seconde méthionine correspond à l'initiation de la traduction du CR1 humain. La séquence signal du CR1 de Macaque rhésus ne présente qu'une seule méthionine correspondant à la première de celle du CR1 humain. La

seconde méthionine correspondant à l'initiation de la traduction pour CR1 humain (127) est absente chez CR1L de Macaque rhésus. (Figure 47 et tableau 16, pages 139 et 140)

Les mutations nucléotidiques en position +96A>T et +98 G>A codent pour une leucine à la place de la seconde méthionine.

La séquence consensus montre que les 4 séquences signal présentent 67% d'homologie entre elles.

La séquence signal de CR1 Macaque rhésus se caractérise par la présence de 2 mutations : G>R en position 23 et V>G en position 35 par rapport à la séquence signal de CR1 humain.

La séquence signal de CR1 Macaque rhésus présente 94% d'homologie avec la séquence signal de CR1 humain.

La séquence signal de CR1L humain se caractérise par la présence d'une mutation : P>Q en position 19 par rapport à la séquence signal de CR1 humain. La séquence signal de CR1L humain présente 88.9% d'homologie avec la séquence signal de CR1 humain.

Les séquences signal des CR1L humain et macaque se caractérisent par la présence de 3 mutations : L>F en position 3, A>V en position 8 et P>R en position 14 par rapport à la séquence signal de CR1 humain. La séquence signal de CR1L de Macaque rhésus présente 75% d'homologie avec la séquence signal de CR1L humain.

La séquence signal de CR1L de Macaque se caractérise par la présence de 6 mutations : M>L en position 6, S>T en position 13, P>H en position 16, P>A en position 25, A>G en position 34, V>G en position 36 par rapport à la séquence signal de CR1 humain. La séquence signal de CR1L de Macaque rhésus présente 69.4% d'homologie avec la séquence signal de CR1 humain. La séquence signal de CR1 de Macaque rhésus présente 83.3% d'homologie avec la séquence signal de CR1L humain et 75% d'homologie avec la séquence signal de CR1L de Macaque rhésus. Les séquences signal des CR1 humain et macaque sont les plus proches. La séquence signal de CR1L de Macaque rhésus est la plus éloignée. (Figure 47, tableau 16, page 135)

	1	5	10	15	20	25	30	35																											
Hum CR1	M	C	L	G	R	M	G	A	S	P	R	S	P	E	P	V	G	P	P	A	P	G	L	P	F	C	C	G	G	S	L	L	A	V	
Mac CR1	M	C	L	G	R	M	G	A	S	P	R	S	P	E	P	V	G	P	P	A	P	R	L	P	F	C	C	G	G	S	L	L	A	G	
Hum CR1L	M	C	F	G	R	M	G	V	S	S	P	R	S	R	E	P	V	G	Q	P	A	P	G	L	P	F	C	C	G	G	S	L	L	A	V
Mac CR1L	M	C	F	G	R	L	G	V	S	S	P	R	T	R	E	H	V	G	P	P	A	P	R	L	A	F	C	C	G	G	S	L	L	G	G
Consensus	M	C	-	G	R	-	G	-	S	S	P	R	-	-	E	-	V	G	-	P	A	P	-	L	-	F	C	C	G	G	S	L	L	-	-

**FIGURE 47. Comparaison des séquences signal des gènes *CR1* et *CR1L* de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*).**

	Hum CR1	Mac CR1	Hum CR1L	Mac CR1L
Hum CR1	-			
Mac CR1	94	-		
Hum CR1L	89	83	-	
Mac CR1L	70	75	75	-

**Tableau 16 : Pourcentages d'homologie entre les séquences signal des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*).**

### II.2.3. Analyse des séquences nucléotidiques

#### II.2.3.1. Comparaison des séquences nucléotidiques des promoteurs de CR1 et CR1L humains et macaques

Les séquences nucléotidiques des promoteurs des gènes CR1 et CR1L humains et macaques dont la taille avoisine les 750 pb ont été comparées les unes aux autres et par rapport à des séquences de référence.

La séquence du promoteur du gène CR1 humain coïncide parfaitement avec la séquence de référence (GenBank numéro d'accèsion L17390). Deux séquences d'ADN pour le promoteur du gène CR1L humain ont été produites : HCR1L et HCR1Ld. HCR1Ld se distingue de HCR1L par la présence d'une délétion de 18 nucléotides (+47 à +64). HCR1L et HCR1Ld présentent respectivement 99.2% et 97.5% d'identité avec la séquence de référence (GenBank numéro d'accèsion AL137789.11).

La séquence du promoteur du gène CR1 humain présente 93.3% d'homologie avec la séquence du promoteur du gène CR1L humain (HCR1L) et 90.9% avec la séquence du promoteur du gène CR1L humain délétée (HCR1Ld).

La séquence du promoteur du gène CR1 de Macaque rhésus présente 87.8% d'homologie avec la séquence du promoteur du gène CR1L de Macaque rhésus. La séquence du promoteur du gène CR1 de Macaque rhésus et la séquence du promoteur du gène CR1L de Macaque rhésus présentent respectivement 91.1% et 87.4% d'homologie avec la séquence du promoteur du gène CR1 humain.

La séquence du promoteur du gène CR1L de Macaque rhésus présente 90.6% et 88.4% d'homologie avec respectivement la séquence du promoteur du gène CR1L humain (HCR1L) et la séquence du promoteur du gène CR1L humain délétée (HCR1Ld). La séquence du promoteur du gène CR1 de Macaque rhésus présente 90.3% et 88.2% d'homologie avec respectivement la séquence du promoteur du gène CR1L humain (HCR1L) et la séquence du promoteur du gène CR1L humain délétée (HCR1Ld). (Figure 48, page 143)

La séquence du promoteur du gène CR1 de Macaque rhésus présente 99% d'homologie avec une partie du génome de Macaque rhésus contenu dans le chromosome1 et référencé « *chromosome 1 genomic contig, reference assembly (based on Mmul\_051212), whole genome shotgun séquence (GenBank accession number NW 001108993)* » en position 9366711 correspondant à une séquence comparable à celle d'une protéine relative à un récepteur du complément.

La séquence du promoteur du gène CR1L de Macaque rhésus présente 99% d'homologie avec une partie du génome de Macaque rhésus contenue dans le chromosome1 et référencé « *chromosome 1 genomic contig, reference assembly (based on Mmul\_051212), whole genome shotgun séquence (GenBank accession number NW 001108993)* » en position 9201878 correspondant à une séquence apparentée à celle de l'antigène CD46 et à celle d'une protéine relative à un récepteur du complément.

La comparaison des séquences signal et des séquences des promoteurs nous permet d'affirmer que nous avons bien isolé les promoteurs des gènes CR1 et CR1L du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*).

#### ***II.2.3.2. Comparaison des séquences nucléotidiques des promoteurs de CR1 humain***

Les sujets humains qui diffèrent par leurs génotypes de densité HH, HL et LL (exprimant respectivement en moyenne 1000, 500 et 180 CR1/E) et les sujets de phénotype Hegelson dont la densité CR1/E est faible (<100), présentent des séquences de promoteurs CR1 identiques.

C-ets-2 C-Myb CP1/CP2 CP1/CP2 HES-1 C-Myb YY1 MBF1  
-662 -658 -651 -645 -639 -634 -629 -620 -612  
HumCR1 AGAAAGGAAGTAACCAAATCCAATACATGAGCAACTGTTCAATCCATCTCCAA  
HumCR1L AGAAAGGAAGTAACCAAATCCAATACATGAGCAACTGTTCAATCCATCTCCAA  
HumCR1Ld AGAAAGGAAGTAACCAAATCCAATACATGAGCAACTGTTCAATCCATCTCCAA  
MacCR1 AGAACAGGATGGACCAAATCCAGTACACAAGCAACTGTTCAATTCATCTCCAA  
MacCR1L AGAAAGGAACTCACCAAATCCAGTACATGAGCGACTGTTCAATTCATCTACA

IRF-1/IRF-2 AP1 YY1 IRF-1/IRF-2  
-608 -598 -594 -574 -571 -567 -553  
HumCR1 TATCTTTGTTAATTGTCCTTTATCCACCCAGTCAGGGCCGCCATCAAACCTCACTTGG  
HumCR1L TATCTTTGTTCAATGTCCTTTATCCACCCAGTCAGGGCCGCCATCAAACCTCACTTGG  
HumCR1Ld TATCTTTGTTAATTGTCCTTTATCCACCCAGTCAGGGCCGCCATCAAACCTCACTTGG  
MacCR1 AATCTTTGTTAATTATCCACTTTATCCACCCAGTCAGGGCCGCCATCAAACCTCACTTGG  
MacCR1L TATCTTTGTTAATTGTCCTTTATCCACCCAGTGAGAGCCGCCATCAAACCTCAATTGG

GATA1 AP1 LBP1 AP1 CP1/CP2  
-548 -543 -527 -517 -502 -498 -493  
HumCR1 ATGTCGGCAAAGCTCCCTGACTGGTCTTCGAGTCCATTATTGCCCTATTCTAATCTA  
HumCR1L ATGTCGCAAAGCTCCCTCC-TGCTGGTCTCCCTCTCCATTATTGCTTAAATCTAGTCT-  
HumCR1Ld ATGTCGCAAAGCTCCCTCC-TGCTGGTCTCCCTCTCCATTATTGCTTAAATCTAGTCT-  
MacCR1 ATGTCGCAAAGCTCCCTGACTGGTCTCCCTCTCCATTATTGCCCTATTCTAATCTA  
MacCR1L ATGTCGCAAAGCTCCCTGACTCGTCTCCCTCTCCATTATTGCTTAAATCTAGTCT-

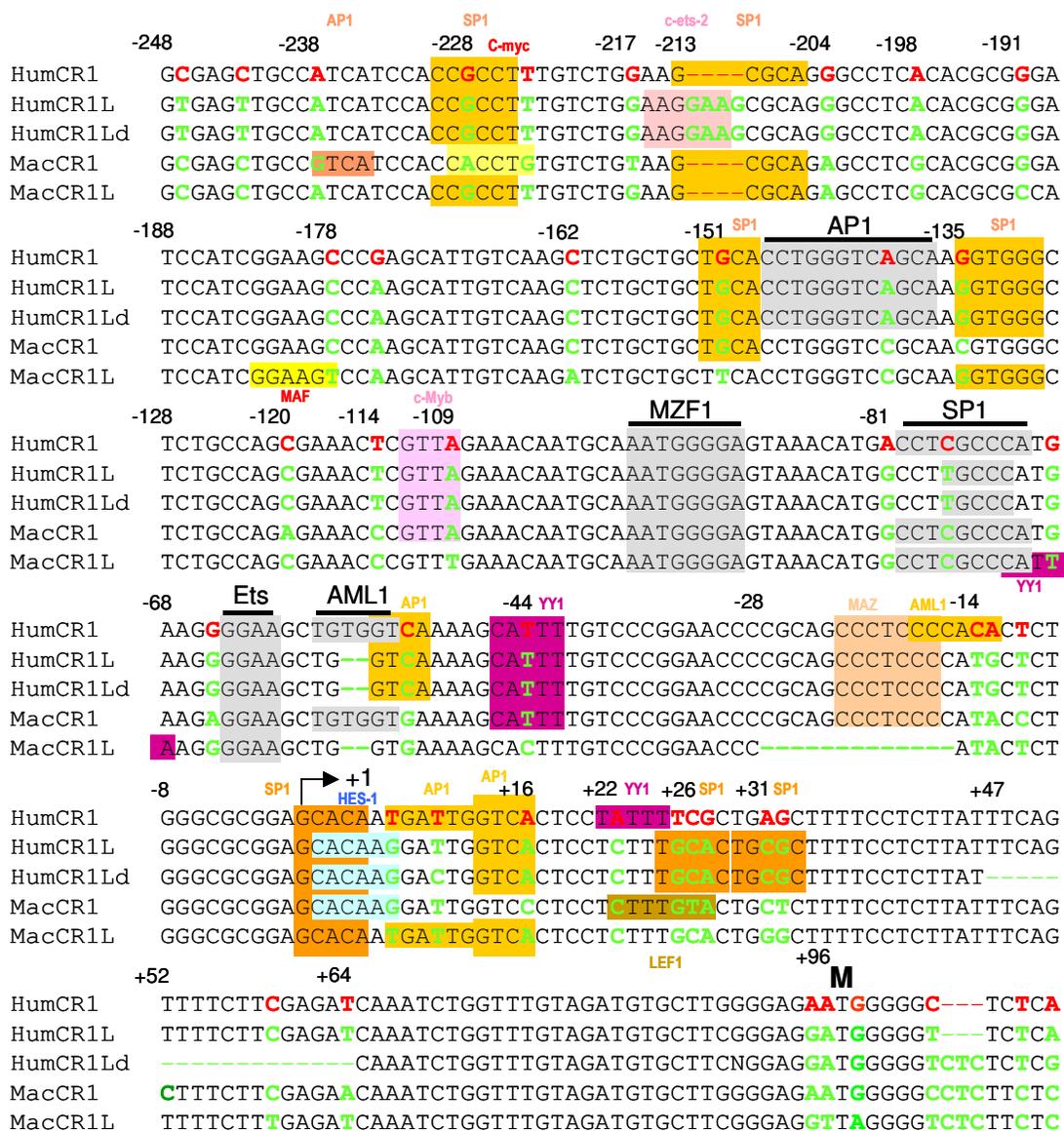
YY1 GATA1 MAZ C-ets-2  
-488 -478 -458 -450 -445 -441 -436 -432  
HumCR1 CCTTCCATACATATACACAGATTTACATTTTTTAAATCTGATCTAATGTCCCTCCCTTT  
HumCR1L ----CCATACATATACACAGATTTACATTTTTTGAATATATATCTAATGTCCCTTCCCTTT  
HumCR1Ld ----CCATACATATACACAGATTTACATTTTTTGAATATATATCTAATGTCCCTTCCCTTT  
MacCR1 CCTTCCATACATATACACACATTTACATTTTTAAATCTATATCCGATCGTCCCTCCCTTT  
MacCR1L ----CCATACATATACACAGATTTACATTTTTTAAATCTATATCTAATGTCCCTTCCCTTT

AP1 C-ets-2  
-428 -421 -415 -409 -404 -391 -386  
HumCR1 TAAAAATCTTTACAAATGGCATGACGCTCTCAATTCAGGGTAAAGGAAATTGTTTCTTCACAT  
HumCR1L TAAAAATCTTTACAAATGGCATGACATCTCAATTCAGGATAAGGAAATTGTTTCTTCACAT  
HumCR1Ld TAAAAATCTTTACAAATGGCATGACATCTCAATTCAGGATAAGGAAATTGTTTCTTCACAT  
MacCR1 TAAAAATCTTTACGATGGCCTGACATCTCAATTCAGGATAAGGAAATTGTTTCTTCACAT  
MacCR1L TAAAAATCTTTACAAATGGCATGATACTCAATTCAGGATAAATTAATTGTTTCTTCACAT

LEF1 AP1 YY1  
-368 -361 -356 -346 -333 -323 -318  
HumCR1 TCCTGTACACCGTACACATCGCCTGCAATTGCCCTTCAACACGAGAGCCAGGCATTTCA  
HumCR1L TCCTGTACACGTGTACACATCGCCTGCAATTGCCCTTCAACACAGAGAGCCAGGCATTTCA  
HumCR1Ld TCCTGTACACGTGTACACATCGCCTGCAATTGCCCTTCAACACAGAGAGCCAGGCATTTCA  
MacCR1 TCCTGTACACGTGTACACATCGCCTGCAATTGCCCTTCAACACAGAGAGCCAGGCATTTCA  
MacCR1L TCCTGTACACGTGTACACATCGCCTGCAATTGCCCTTCAACACAGAGAGCCAGGCATTTCA

GR GR  
-308 -286 -270 -263  
HumCR1 TTAGCTGACCTTCCCACACACATTTCTTGCAAAGAGGAAAGTTAAGCAGGGTGTGGAG  
HumCR1L TTAGCTGACCTTCCCACACACATTTCTTGCAAAGAGGAAAGTCAAGCAGGGTGTGGAG  
HumCR1Ld TTAGCTGACCTTCCCACACACATTTCTTGCAAAGAGGAAAGTCAAGCAGGGTGTGGAG  
MacCR1 TTAGCTGACCTTCCCACACACATTTCTTGCAAAGAGGAAAGTCAAGCAGGGTGTGGAG  
MacCR1L TAACTGACCTTCCCACACACACTCTTGCAAAGAGGAAAGTCAAGCAGGGTGTGGAG

C-Myb AP1



**FIGURE 48 : Séquences des régions promotrices des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*). Le site d'initiation de la transcription de CR1 humain est représenté par une flèche. Le site d'initiation de la traduction de CR1 humain est représenté par un M. Les sites de liaison des facteurs de transcription décrits dans la littérature sont soulignés. Les sites de liaison potentiels obtenus à partir du logiciel TESS sont surlignés en couleur.**

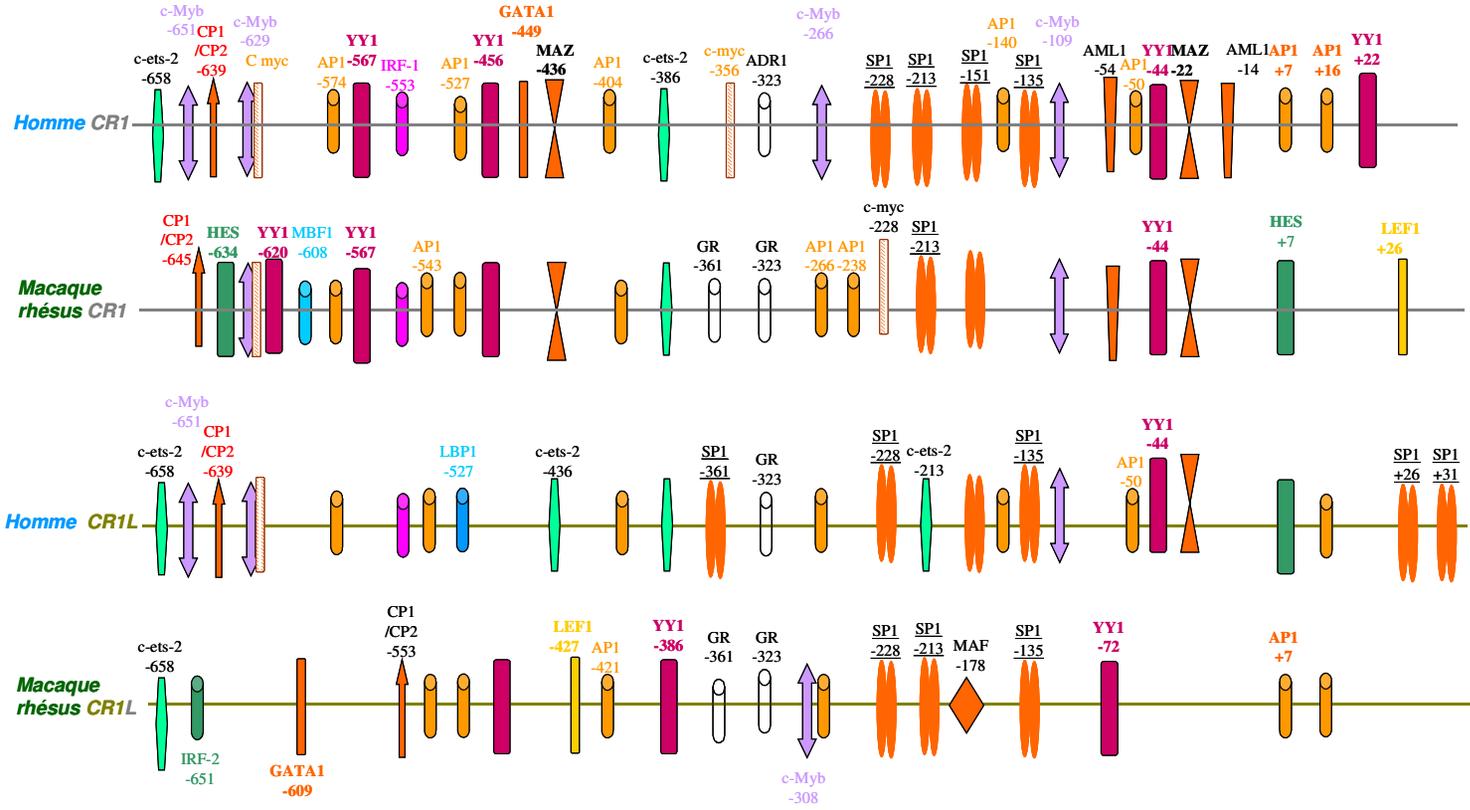


Figure 49 : Positions des facteurs de transcription potentiels mises en évidence par le logiciel TESS au niveau des régions promotrices des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhesus (*Macaca mulatta*). Il n'y a pas d'échelle. Les facteurs communs aux quatre promoteurs (à une position donnée) ne sont pas représentés.

#### **II.2.4. Analyse *in silico* des sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription**

Plusieurs sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription ont été mis en évidence à l'aide du logiciel TESS.

La région promotrice du gène CR1 humain se caractérise par la présence de sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription tels que c-ets-2(-658), c-myb(-651), CP1/CP2(-639), c-myb ou c-myc(-629), AP1(-574), YY1(-567), IRF1/IRF2(-553), AP1(-527), YY1(-456), gata1(-445), MAZ(-436), AP1(-404), c-ets-2 (-386), c-myc (-356), ADR1 (-323), c-myb(-266), SP1(-228), (-213), (-151), (-135), c-myb(-109), AP1(-52), YY1(-44), MAZ(-23), AML1 (-14), SP1(+1), AP1 (+7), (+16) et YY1(+22) (Figures 48 et 49, pages 143 et 144).

La région promotrice du gène CR1L humain se caractérise par la présence de sites de liaison potentiels des facteurs de transcription tels que c-ets-2(-658), c-myb(-651), CP1/CP2(-639), c-myb or c-myc(-629), AP1(-574), IRF1/IRF2(-553), AP1(-543), LBP1(-527), c-ets-2(-436), AP1(-404), c-ets-2 (-386), SP1(-361), GR (-323), AP1(-266), SP1(-228), c-ets-2(-213), SP1(-151), (-135), c-myb(-109), AP1(-52), YY1(-44), MAZ(-23), SP1(+1), HES1(+7), AP1 (+16), et SP1(+26), (+31). La délétion de 18 nucléotides observés chez certains sujets humains, n'entraîne pas de perte ou de gain de sites de liaison pour un facteur de transcription (Figures 48 et 49, pages 143 et 144).

La région promotrice du gène CR1 Macaque rhésus se caractérise par la présence de sites de liaison potentiels des facteurs de transcription tels que CP1/CP2(-645), HES1(-634), c-myb or c-myc(-629), YY1(-620), MBF1(-608), AP1(-574), YY1(-567), IRF1/IRF2(-553), AP1(-543), (-527), YY1(-456), MAZ(-436), AP1(-404), c-ets-2 (-386), GR (-361), (-323), AP1(-266),(-238), c-myc(-228), SP1(-213), (-151), c-myb (-109), YY1(-44), MAZ(-23), SP1(+1), HES1(+7) et LEF1(+22) (Figures 48 et 49, pages 143 et 144).

La région promotrice du gène CR1L Macaque rhésus se caractérise par la présence de sites de liaison potentiels des facteurs de transcription tels que c-ets-2(-658), IRF1/IRF2(-651), gata1(-608), CP1/CP2(-553), AP1 (-543),(-527), YY1(-456), LEF1(-426), AP1(-421), YY1(-386), GR (-361), (-323), c-myb (-305), AP1(-266), SP1(-228), (-213), MAF(-178), SP1(-135), YY1(-69), SP1(+1) et AP1 (+7),(+16). La délétion de 13 nucléotides, qui est spécifique

de l'espèce moléculaire CR1L chez le Macaque rhésus, entraîne la perte du site de liaison pour le facteur de transcription MAZ (-23) (Figures 48 et 49, pages 143 et 144).

Parmi tous ces facteurs de transcription, certains ont déjà été décrits dans la littérature comme nécessaires à la transcription du gène CR1 humain : AP1, MZF1, SP1, Ets et AML1.

AP1(-140), MZF1 (-97), SP1(-77) et Ets (-65) sont présents dans la région promotrice de CR1L humain tandis que AML1(-56) est absent.

MZF1 (-97), SP1(-77), Ets (-65) et AML1(-56) sont présents dans la région promotrice de CR1 de Macaque rhésus tandis que AP1(-140) est absent.

MZF1 (-97), SP1(-77) et Ets (-65) sont présents dans la région promotrice de CR1L de Macaque rhésus mais AP1(-140) et AML1(-56) sont absents (Figures 48 et 49, pages 143 et 144).

La région promotrice du gène CR1L humain dont la protéine n'est pas exprimée à la surface des érythrocytes chez l'Homme se caractérise par la présence de sites de liaison spécifiques pour des facteurs de transcription comme LBP1(-527) à la place d'AP1, c-ets-2 (-436) à la place de MAZ et c-ets-2 (-213) à la place de SP1. Elle se singularise également par la perte d'un site de liaison pour YY1(-456).

Elle présente également comme la région promotrice du gène CR1 de Macaque rhésus un site de liaison pour le facteur de transcription HES(+7) (Figures 48 et 49, pages 143 et 144)

La région promotrice du gène CR1L de Macaque rhésus dont la protéine est surexprimée à la surface des érythrocytes chez le Macaque rhésus se caractérise par la présence de sites de liaison spécifiques pour des facteurs de transcription comme IRF1/IRF2(-651), gata1(-608), LEF1(-426), YY1(-386) à la place de c-ets-2, YY1 (-72) et MAF(-178) (Figures 48 et 49, pages 143 et 144).

La comparaison des régions promotrices des gènes CR1 humain, CR1 de Macaque rhésus et CR1L de Macaque rhésus montre que les sites de liaison pour les facteurs de transcription AP1(-527)(+1), YY(-436), MZF-1 (-91), SP1(-213) (-77) et ETS(-64) sont conservés.

Toutes les régions promotrices ont en commun les sites de liaison pour les facteurs de transcription MZF-1 (-91), SP1 (-77) et SP1 (+1) (Figures 48 et 49, pages 143 et 144).

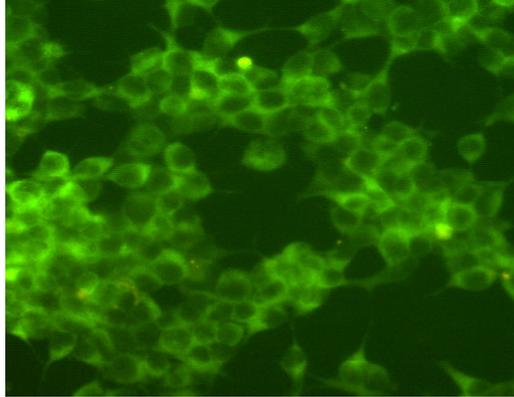
### **II.2.5. Polymorphisme allélique de la région promotrice de CR1L humain**

Certains humains présentent une délétion de 18 nucléotides (+47 à +64) dans la région promotrice de CR1L. Parmi 46 humains, 17 sont homozygotes non délétés soit 37 %, 17 sont hétérozygotes soit 37% et 12 sont homozygotes délétés soit 26%.

### **II.3. Activité des régions promotrices**

Afin de confirmer que les séquences isolées à partir du génome du Macaque rhésus étaient bien les promoteurs de CR1 et *CR1like*, nous avons vérifié leur activité promotrice en plaçant ces séquences en amont d'un gène rapporteur (DsRed) dans un vecteur plasmidique eucaryote. Nous avons transfecté ces constructions dans des cellules eucaryotes cultivées *in vitro*.

Les cellules de la lignée CHO (Cellules ovariennes de hamster chinois) produisent la protéine fluorescente DsRed de J3 à J15 après transfection avec les constructions comportant le gène rapporteur précédé en amont des promoteurs des gènes CR1 et *CR1like* humains et macaques (Figures 51 A,B, tableau 17, pages 149 et 150). Vingt pourcents des cellules transfectées produisent de la DsRed. L'efficacité de transfection est de 90% pour cette lignée. Quatre vingt dix pourcents de ces cellules transfectées avec pCMV-GFP émettent de la fluorescence verte. Les cellules de la lignée 293T (Cellules rénales fœtales humaines) produisent la protéine fluorescente DsRed de J5 à J16 après transfection avec les constructions comportant le gène rapporteur précédé en amont des promoteurs des gènes CR1 et *CR1like* humains et macaques (Figures 51 C, D, tableau 17, pages 149 et 150) Vingt pourcents des cellules transfectées produisent de la DsRed . L'efficacité de transfection est de 90% pour cette lignée. Quatre vingt dix pourcents de ces cellules transfectées avec le vecteur pCMV-GFP émettent de la fluorescence verte (Figure 50, page 148).



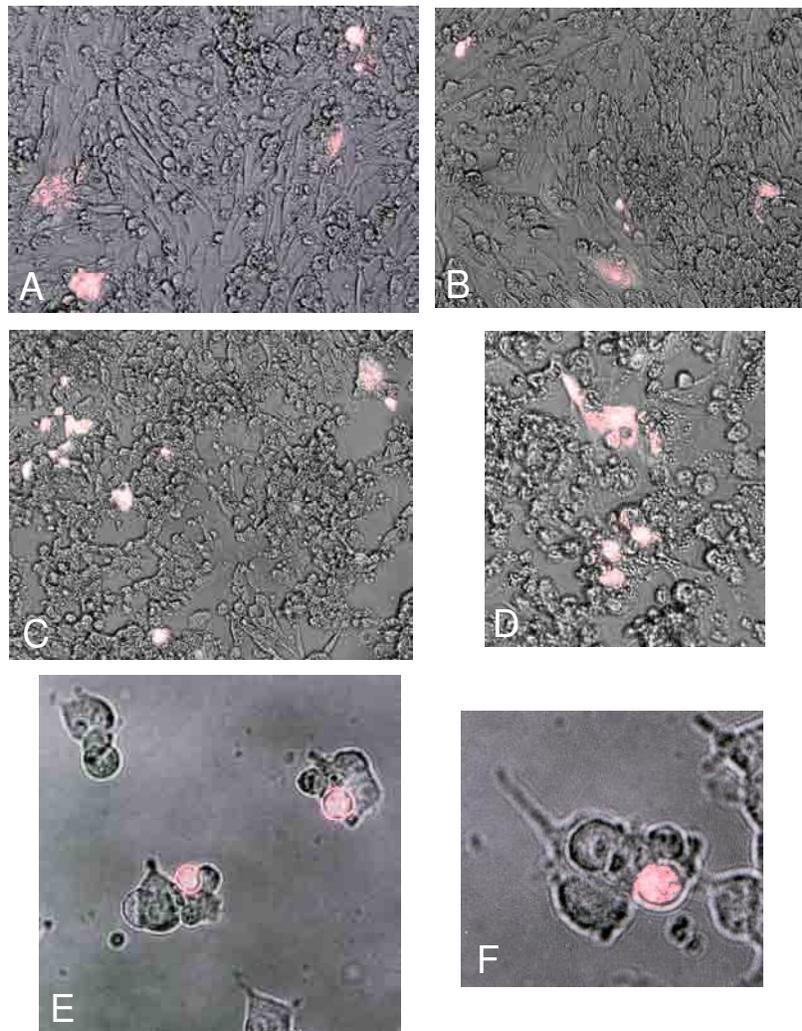
**Figure 50 : Evaluation par microscopie à fluorescence de l'efficacité de transfection des cellules 293T avec le vecteur pCMV-GFP. La protéine GFP (verte) est produite deux jours après la transfection dans plus de 90% des cellules 293T.**

Les cellules de la lignée CRL1805 (lymphocytes macaques infectés par le virus EBV macaque) produisent la protéine fluorescente DsRed de J2 à J7 après transfection avec la construction comportant le gène rapporteur précédé en amont du promoteur du gène CR1 humain (Figures 51 E, F, tableau 17, pages 149 et 150). Cinq pourcents des cellules transfectées produisent de la DsRed à un même niveau d'intensité de fluorescence. L'efficacité de transfection est de 20% pour cette lignée. Les régions promotrices des gènes CR1 macaque, *CR1like* macaque et *CR1like* humain sont inactives dans cette lignée.

Les régions promotrices des gènes CR1 et *CR1like* humains et macaques peuvent être actives dans les cellules des lignées CHO et 293T. Le promoteur CR1 humain peut être actif dans les cellules de la lignée CRL 1805.

Les séquences isolées à partir du génome du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) et placées en amont du gène rapporteur DsRed correspondent effectivement à des régions promotrices des gènes CR1 et *CR1like*.

En revanche, Les transfections d'autres lignées cellulaires humaines comme HepG2, HeLa 229, K562, HeLa 92.1.7, U937 et UT7 n'ont pas permis de produire la protéine DsRed quels que soient les promoteurs transfectés (tableau 17, page 150).



**Figure 51 : Analyse de l'activité des promoteurs des gènes CR1 et CR1like de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) par microscopie à fluorescence. Les promoteurs des gènes CR1 et CR1like de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) ont été placés dans un vecteur d'expression eucaryote, en amont d'un gène rapporteur *DsRed* codant pour une protéine fluorescente. Trois jours après la transfection des cellules CHO, on constate l'activité des promoteurs des gènes CR1 de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) par la présence de *DsRed* (A,B). Cinq jours après la transfection des cellules 293T, on constate l'activité des promoteurs des gènes CR1like de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) (C,D). Deux jours après la transfection des cellules CRL1805, on constate l'activité du promoteur du gène CR1 de l'Homme par la présence de *DsRed* (E,F) ; les autres promoteurs sont inactifs dans cette lignée cellulaire.**

lignée cellulaire	tissu	espèce	Présence de DsRed	
CHO	ovaire	Hamster	J3 à J15	Pour tous les promoteurs des gènes CR1 et CR1-like humain et macaque
293T	rein foetal	Homme	J5 à J16	
HepG2	hépatocyte	Homme	non	
Hela229	épithéliale	Homme	non	
K562	Erythro-monocytaire	Homme	non	
HEL92,1,7	érythroblaste	Homme	non	
U937	monocyte	Homme	non	
UT7	précurseur érythroïde	Homme	non	
CRL1805	lymphoblaste B (RhEBV)	Macaque Rhésus	J2 à J7	Pour le promoteur du gène humain CR1 uniquement

Tableau 17: Présence de DsRed témoignant de l'activité des promoteurs de CR1 et CR1like de l'Homme et du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) en fonction des lignées cellulaires transfectées.

### III. CR1 et paludisme

#### III.1. Recherche des polymorphismes allotypiques dans la région SI<sup>a</sup> du CR1 des primates de l'ancien monde et du nouveau monde

Le CR1 humain présente des antigènes de groupes sanguins Knops dont certains comme SI1 (SI<sup>a</sup>) (Swain-Langley) et McC (Mc Coy) sont impliqués dans la formation des rosettes entre des érythrocytes sains avec des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*. Ces antigènes sont localisés dans le LHR D au niveau des SCR 24 et 25 de la molécule CR1 codés par l'exon 29. Des polymorphismes dans l'exon 29 du gène CR1 codant pour les antigènes McC a et SI2 ont été observés majoritairement chez l'Homme au sein des populations vivant dans les régions où *Plasmodium falciparum* est endémique. Les érythrocytes portant l'antigène SI2 forment beaucoup moins de rosettes en présence d'érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* que ceux portant l'antigène SI1.

Dans ces conditions, les SCR 24 et 25 de CR1 de plusieurs espèces de primates vivant dans les régions endémiques pour *Plasmodium falciparum* mais qui ne sont pas des hôtes naturels de ce pathogène ont été séquencés (Figure 52, page 152).

Chez les primates, on observe des polymorphismes autour de la région codant pour les antigènes McC (position 1590) et S1 (position 1601). Tous les primates de l'ancien monde et du nouveau monde présentent le génotype McC a et S1(S1<sup>a</sup>+) observé chez les humains caucasiens: R1601, S1610 excepté le gorille (R1601T (Figure 52, page 152)

Les singes de l'ancien monde sont S14 (S1610) tandis que les singes du nouveau monde sont 1610F. Le polymorphisme 1610F est unique puisqu'il ne correspond ni à S14 (S1610), ni à S15 (1610T). (tableau 18, page 153)

Des différences entre l'Homme et les primates non-humains existent aussi en position T(Homme)1536A(Chimpanzé), H1539Y(Tamarin), N1540S(Macaque rhésus, Macaque cynomolgus, Babouin et Mandrill), R1564Q (Singe écureuil), V1577A(Babouin), S1579N(Tamarin), R1584Q(Singe écureuil, Tamarin et Saki), T1588I(Singe écureuil), T1588V(Tamarin et Saki), E1597K(Babouin), A1599G(Macaques rhésus et cynomolgus, Mandrill, Gibbon, Orang-outan, Gorille, Singe écureuil, Tamarin et Saki), R1601T (Gorille), V1602E(Tamarin), P1603T (Singe écureuil, Tamarin et Saki), SFFS1607NLYF(Singe écureuil et Saki), FFS1608LYF(Tamarin), LT1611PS(Orang-outan), T1612N(Macaque cynomolgus, Babouin, Mandrill, Gibbon, Singe écureuil, Tamarin et Saki), I1615V (tous les singes sauf Gorille, Chimpanzé et Macaque rhésus), P1621A(Singe écureuil), SHT1628LPI(Singe écureuil), SHT1628FHI(Saki), Q1632R(Singe écureuil), T1635I(Singe écureuil) et G1637D(Macaques rhésus, cynomolgus et Mandrill), G1637N(Babouin et Singe écureuil) et G1637F(Saki).

Les singes du nouveau monde se distinguent des autres primates par des mutations supplémentaires dans la région S1<sup>a</sup> : V1602E(Tamarin), P1603T, S1607N (tous sauf Tamarin), F1608L et F1609Y. Ils se singularisent par le polymorphisme 1610F unique puisqu'il ne correspond ni à S14 (1610S), ni à S15 (1610T) (Figure 52, page 152).

Les polymorphismes des antigènes du groupe sanguin Knops de CR1 sont reportés dans le tableau 18. Des polymorphismes existent au niveau N1540S, S11/S12, S14/S15 et KAM-/+ . En revanche, tous les primates présentent les antigènes Kn a et McC a (tableau 18, page 153) .

Ces résultats montrent une région très polymorphe à travers les primates et suggèrent un rôle significatif du CR1 de « type humain » chez ces différentes espèces de primates. Ces

polymorphismes conservés au cours de l'évolution pourraient être utilisés par ces espèces pour échapper au *Plasmodium falciparum*.

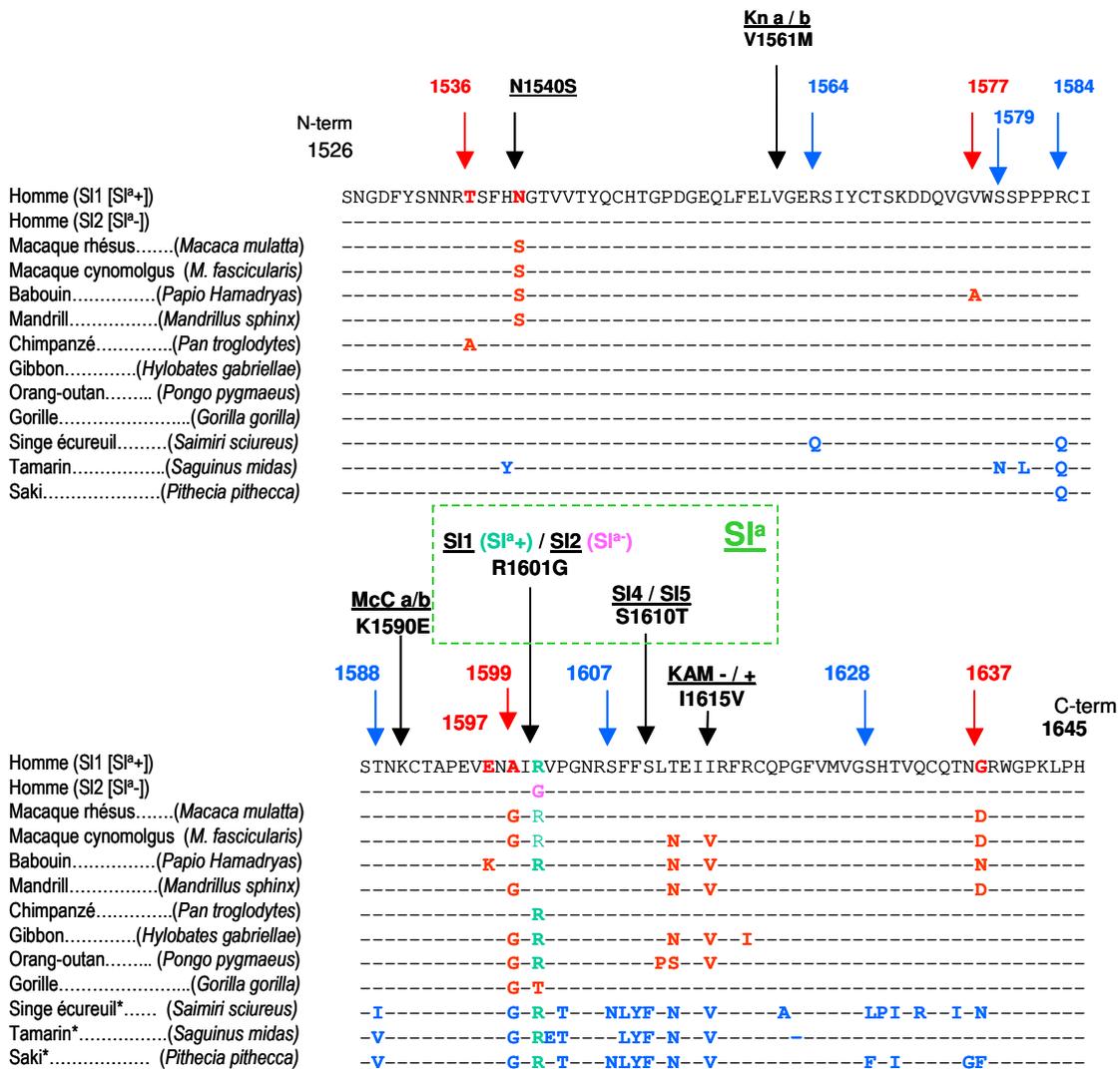


Figure 52 : Polymorphismes entourant la région SI<sup>a</sup> (encadrée en vert) chez certaines espèces de primates de l'ancien monde et du nouveau monde\*.

	Polymorphismes Knops de CR1					
	N1540S	Kn a/b V1561M	McC a / b K1590E	SI1/ SI2 R1601G	SI4/ SI5 S1610T	KAM-/+ I1615V
Homme (SI1 [SIa+])	N1540	Kn a	McC a	SI1	SI4	KAM --
Homme (SI2 [SIa-])	N1540	Kn a	McC a	SI2	SI4	KAM --
Macaque rhésus.....( <i>Macaca mulatta</i> )	1540S	Kn a	McC a	SI1	SI4	KAM --
Macaque cynomolgus ( <i>M. fascicularis</i> )	1540S	Kn a	McC a	SI1	SI4	KAM+
Babouin.....( <i>Papio Hamadryas</i> )	1540S	Kn a	McC a	SI1	SI4	KAM+
Mandrill.....( <i>Mandrillus sphinx</i> )	1540S	Kn a	McC a	SI1	SI4	KAM+
Chimpanzé.....( <i>Pan troglodytes</i> )	N1540	Kn a	McC a	SI1	SI4	KAM --
Gibbon.....( <i>Hylobates gabriellae</i> )	N1540	Kn a	McC a	SI1	SI4	KAM+
Orang-outan.....( <i>Pongo pygmaeus</i> )	N1540	Kn a	McC a	SI1	SI4	KAM+
Gorille.....( <i>Gorilla gorilla</i> )	N1540	Kn a	McC a	1601T	SI4	KAM --
Singe écureuil*..... ( <i>Saimiri sciureus</i> )	N1540	Kn a	McC a	SI1	1610F	KAM+
Tamarin*.....( <i>Saguinus midas</i> )	N1540	Kn a	McC a	SI1	1610F	KAM+
Saki*..... ( <i>Pithecia pithecca</i> )	N1540	Kn a	McC a	SI1	1610F	KAM+

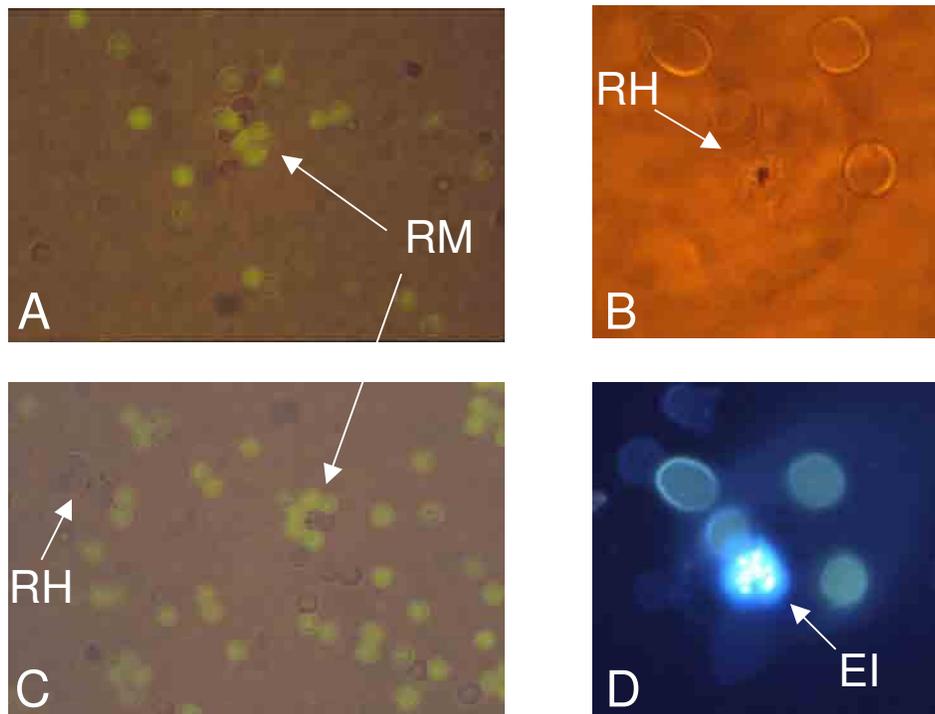
**Tableau 18 : Polymorphismes associés aux groupes sanguins Knops de CR1 humain chez les primates de l'ancien monde et les primates du nouveau monde\*.**

### **III.2. Etude de la formation des rosettes entre des érythrocytes humains infectés par la souche *P. falciparum* 89F5 Var O et des érythrocytes de Macaque rhésus sains**

Les érythrocytes de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) portent à leur surface un CR1 de « type humain » arrangé en bouquets comme chez l'Homme, mais aussi un CR1 supplémentaire de « type singe » ou CR1like à ancrage phospholipidique (liaison GPI), plus court et plus abondant. Le CR1 de « type humain » a été génotypé SI1 (SI<sup>a+</sup>) mais présente des polymorphismes de structure de part et d'autre de la région SI<sup>a</sup> qui pourraient permettre à l'espèce Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) d'échapper à une infection par *P. falciparum*.

Dans ces conditions, nous avons voulu savoir si les érythrocytes de Macaque étaient susceptibles de former des rosettes avec des érythrocytes humains parasités par *P. falciparum*.

En microscopie à fluorescence, le marquage des érythrocytes de Macaque rhésus au C-FDA ( en vert) permet de distinguer les érythrocytes de Macaque sains des érythrocytes humains cultivés en présence de *P. falciparum*. Les rosettes composées d'érythrocytes humains infectés et non infectés (Figures 53 B et D, page 154) ont été rompues mécaniquement et placées en présence d'érythrocytes de Macaque marqués au C-FDA.



**Figure 53: Analyse par microscopie à fluorescence du rosetting entre des érythrocytes humains infectés par *Plasmodium falciparum* (souche 89F5 var O) et des érythrocytes humains ou Macaques non infectés. RM : Rosettes mixtes entre des érythrocytes humains infectés par *Plasmodium falciparum* (souche 89F5 var O) et des érythrocytes de Macaques rhésus non infectés observées en contraste de phase (A,C). RH : Rosettes entre des érythrocytes humains infectés par *Plasmodium falciparum* (souche 89F5 var O) et des érythrocytes humains non infectés observées en contraste de phase (B,C). Erythrocytes humains infectés par *Plasmodium falciparum* (souche 89F5 var O) marqué au colorant Hoescht observés en microscopie à fluorescence (D).**

Après une incubation d'une heure à 37 °C, l'observation en microscopie à fluorescence montre la reformation de rosettes « humaines » composées d'érythrocytes infectés et d'érythrocytes non-infectés humains (Figure 53 B, page 154) mais aussi de quelques rosettes « mixtes » composées d'érythrocytes humains et macaques. Vingt champs d'observation ont permis de déceler 5 rosettes mixtes. (Figure 53 A,C, page 154).

Il semble donc qu'en dépit de la présence des polymorphismes autour de la position de l'antigène S11(S1<sup>a</sup>), il soit possible que des érythrocytes de Macaque rhésus forment des rosettes avec des érythrocytes humains infectés par la souche 89F5 var O de *P. falciparum*.

### III.3. Phénotype Hegelson et antigènes de groupes sanguins de CR1(Knops)

Dans le cadre d'une collaboration avec le CNRGS (Centre National de Recherche sur les Groupes sanguins), nous avons génotypé la région SCR24-25 du CR1 d'une population humaine présentant des autoanticorps sériques dirigés contre les antigènes de groupes sanguins de CR1(Knops). Parmi ces 56 individus, nous avons identifié par cytométrie de flux, 5 sujets caucasiens de phénotype Hegelson présentant une densité de CR1/E faible (<150 sites). Le génotypage de la région SCR24-25 de leur CR1 montre qu'ils présentent tous l'antigène KAM (Tableau 19, page 155). Ce premier résultat est différent de ceux obtenus par Covas *et al.* (Tableau 10, page 58) qui montrent que 42% des caucasiens, 38% des asiatiques et 91 % des afro-brésiliens présentent l'antigène KAM. Le fait que 100% des Hegelson soit KAM+ laisse supposer un possible lien entre la densité faible de CR1/E et la présence de KAM. Toutefois, le nombre d'individus Hegelson génotypés est insuffisant pour affirmer ce résultat (p exact de Fisher =0,02), ce qui nécessite la poursuite de cette collaboration.

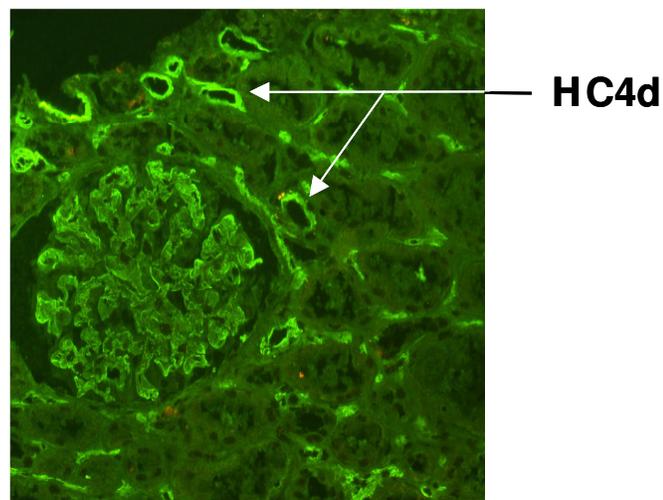
Sujets Hegelson	Densité CR1/E	Polymorphismes Knops des SCR24-25				
Heg 1	67	Kn a	McC a	S11	SI4	KAM+
Heg 2	72	Kn a	McC a	S11	SI4	KAM+
Heg 3	137	Kn a	McC a	S11	SI4	KAM+
Heg 4	103	Kn a	McC a	SI2	SI4	KAM+
Heg 5	45	Kn b	McC a	S11	SI4	KAM+

**Tableau 19 : Densité de CR1/E et génotypage du SCR24-25 des sujets de phénotype « Hegelson ».**

## **IV. EC4d, HC4d et rejet aigu humoral en transplantation rénale**

### **IV.1. Observation du dépôt de C4d histologique (HC4d) en microscopie à fluorescence**

Les dépôts de C4d histologique (HC4d) apparaissent sous la forme d'un marquage linéaire vert fluorescent le long des capillaires péri-tubulaires. Seuls les marquages de plus de 50% des capillaires péri-tubulaires sont considérés comme positifs. Les marquages focaux, de même que l'absence de marquage des capillaires péri-tubulaires sont considérés comme négatifs. Le marquage des capillaires glomérulaires sert de témoin positif interne.



**Figure 54 : Coupe de biopsie rénale de transplanté rénal présentant des dépôts de C4d histologique (HC4d) au niveau des capillaires péri-tubulaires**

### **IV.2. Dépôt de C4d érythrocytaire (EC4d)**

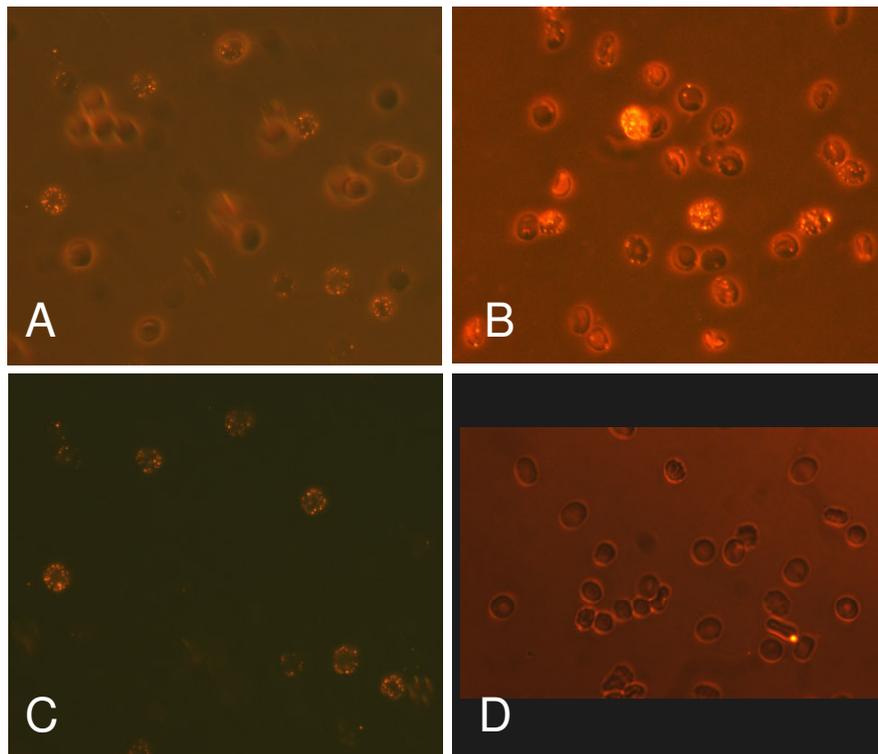
#### **IV.2.1. Observations des dépôts de C4d, C3b et d'immunoglobulines en microscopie à fluorescence**

Le marquage anti-C4d des érythrocytes de transplantés rénaux en situation de rejet aigu humoral est plus intense (EC4d+) (Figure 55 A, page 157) que celui des sujets sans rejet aigu humoral (EC4d-)(Figure 55 D, page 157). Les patients lupiques en poussée présentent un

marquage très intense sur la plupart de leurs érythrocytes (EC4d+)(Figure 55 B, page 157). Ces résultats ont été quantifiés par cytométrie de flux.

Chez les transplantés rénaux et les lupiques, on observe un marquage C4d granulaire et hétérogène d'un érythrocyte à l'autre.

On ne constate pas de dépôt de C3 ou d'immunoglobulines à la surface des érythrocytes présentant un dépôt de C4d. Le marquage rouge correspond à l'anti-C4d couplé à la phycoérythrine. On n'observe pas de marquage vert témoignant de la présence d'un anti-C3b ou d'un anti-Ig(H+L) humaine couplés à FITC(Figure 55 C, page 157).



**Figure 55 : Dépôts de C4d érythrocytaire de patients (lupiques et transplantés rénaux) et de sujet sain observés en microscopie à fluorescence. Le dépôt de EC4d est moins important (A) chez les patients transplantés que chez les lupiques en poussée (B). Le dépôt de C4d des érythrocytes de transplantés rénaux en situation de rejet aigu humoral est plus intense (EC4d+) (A) que celui des sujets sans rejet aigu humoral (EC4d-) (D). Chez les transplantés rénaux, le marquage C4d est granulaire et hétérogène d'un érythrocyte à l'autre (A). Chez les patients lupiques, le marquage C4d est granulaire et hétérogène d'un érythrocyte à l'autre (B). Le marquage rouge correspond à l'anti-C4d couplé à la phycoérythrine. On n'observe pas de marquage vert témoignant de la présence d'un anti-C3b ou d'un anti-Ig(H+L) humaine couplés à FITC (C).**

### IV.3. Dépôt de EC4d obtenu *in vitro* : TEDA

De façon à pouvoir comparer les mesures des dépôts EC4d des patients transplantés renaux réalisés chaque semaine par cytométrie de flux, nous avons utilisé un témoin standard appelé : TEDA. Nous avons fabriqué ce témoin standard *in vitro* en provoquant artificiellement des dépôts de C4d à la surface d'érythrocytes humains de sujets sains à l'aide d'un tampon hypersucré selon la technique décrite au VII.7 (Matériels et Méthodes).

Lors de la fabrication du dépôt de C4d à la surface d'érythrocytes de patients hypogammaglobulinémiques, on observe en cytométrie de flux que le dépôt de C4d est d'autant moins important que leur taux d'Immunoglobuline G sérique est bas. Il semble donc que le mécanisme de dépôt de C4d *in vitro* soit IgG dépendant (voir IV.3.1).

#### IV.3.1. Dépôt de C4d *in vitro* en fonction du taux d'immunoglobulines G sériques

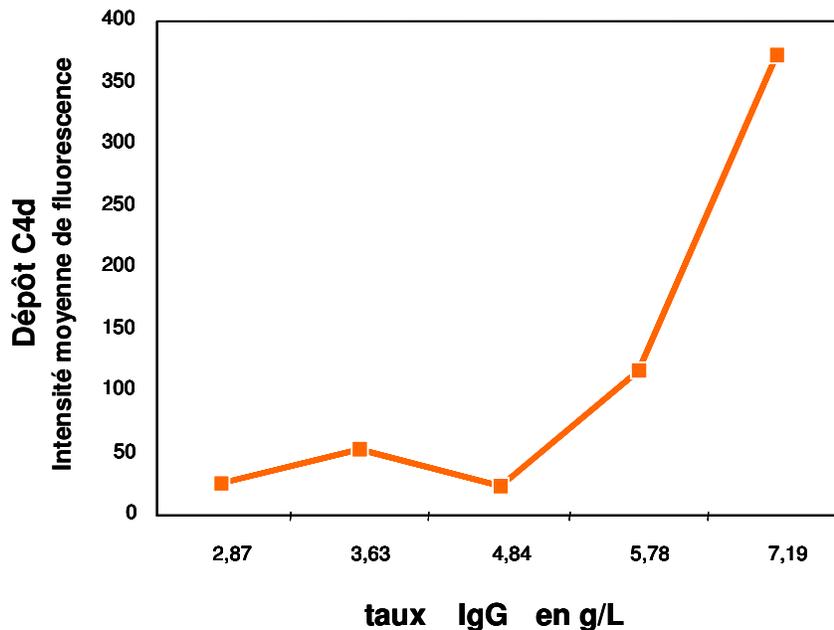


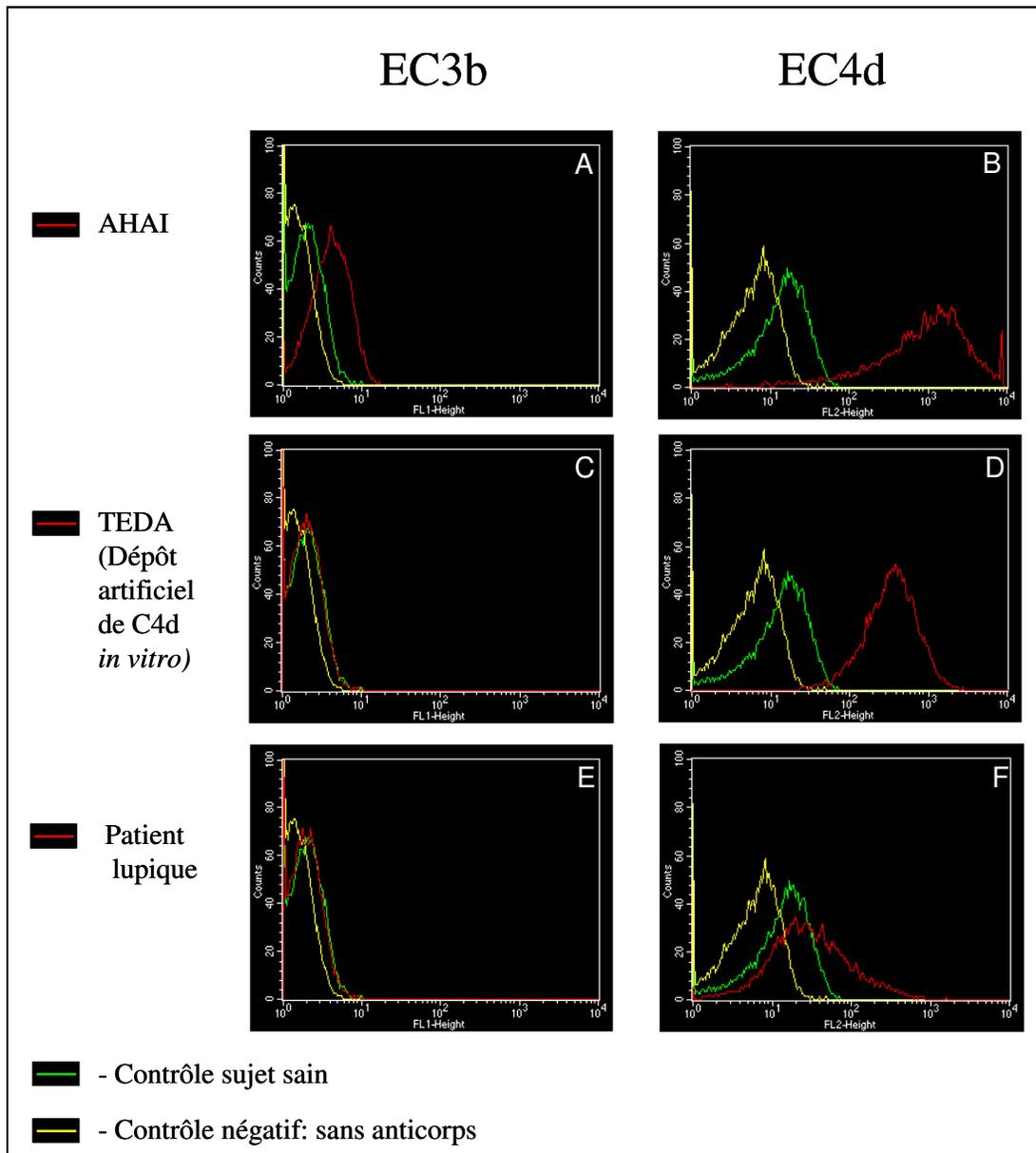
Figure 56 : Dépôt de C4d *in vitro* en fonction du taux d'immunoglobulines G (IgG) sériques. Le dépôt de C4d artificiel obtenu *in vitro* à partir de sang de patients hypogammaglobulinémiques est d'autant plus important que leur taux d'immunoglobulines G sériques est élevé. Le mécanisme de dépôt de C4d *in vitro* semble dépendre du taux d'immunoglobulines G sériques.

#### **IV.4. Evaluation par cytométrie de flux des dépôts de C3b et C4d à la surface des TEDA, des érythrocytes de sujets sains, des patients lupiques ou atteints d'anémie hémolytique autoimmune.**

L'analyse des immunomarquages anti-C3b et anti-C4d par cytométrie de flux montre que les patients souffrant d'anémie hémolytique autoimmune présentent des dépôts érythrocytaires de C3b et C4d (EC3b et EC4d) plus importants que ceux du sujet sain qui correspond à notre contrôle (Témoin seuil décrit au VII.6 du Matériel et Méthodes) (Figure 57 A,B, page 160). Les dépôts de EC3b et EC4d des sujets sains varient d'un individu à l'autre mais restent inférieurs ou égales à ceux du Témoin seuil que nous avons utilisé pour l'étude du dépôt de EC4d dans le rejet aigu humoral en transplantation rénale. Les dépôts de EC3b et EC4d du Témoin seuil correspondent à des dépôts physiologiques normaux.

Concernant les TEDA (érythrocytes sur lesquels nous avons déposé artificiellement du C4d), on observe effectivement pour le EC4d, un dépôt plus important que le dépôt physiologique du Témoin seuil. En revanche le dépôt de EC3b est équivalent au dépôt physiologique du Témoin seuil. Il semble que le phénomène permettant la production artificielle de EC4d *in vitro* ne permette pas de production de EC3b. (Figure 57 C,D, page 160).

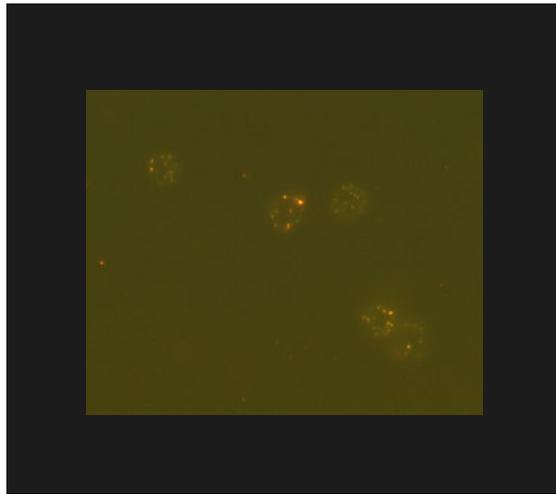
Les patients lupiques quant à eux se caractérisent par un dépôt de EC4d plus important que le dépôt physiologique EC4d du Témoin seuil et par un dépôt de EC3b équivalent à celui du Témoin seuil. Ce phénomène est également observé après un épisode de rejet humoral chez les patients transplantés rénaux. (Figure 57 E,F, page 160)



**Figure 57 : Analyse par cytométrie de flux des dépôts de C3b et C4d à la surface des TEDA, des érythrocytes de sujet sain et des patients (lupique ou atteint d'anémie hémolytique autoimmune :AHAI). Le patient AHAI présente des dépôts érythrocytaires de C3b (EC3b) et de C4d (EC4d) plus importants que ceux du sujet sain (A, B). Les érythrocytes TEDA présentent un dépôt de EC3b équivalent à celui du sujet sain et un dépôt de EC4d plus important que celui du sujet sain (C, D) . Le patient lupique présente un dépôt EC3b équivalent à celui du sujet sain mais un dépôt de EC4d légèrement plus important que celui du sujet sain.**

## IV.5. Distribution de CR1/E et dépôt de EC4d

En microscopie à fluorescence, les marquages granulaires anti-C4d et anti-CR1 ne sont pas totalement superposables. En effet, après double marquage à l'aide d'un anti-C4d couplé à la phycoérythrine et d'un anti-CR1 couplé à la FITC, nous retrouvons d'une part des granules verts et rouges distincts à la surface des globules marqués et d'autre part un mélange orangé des 2 marquages correspondant à une colocalisation de C4d et CR1 (Figure 58).



**Figure 58 : Les marquages granulaires anti-C4d et anti-CR1 ne sont pas totalement superposables. Après double marquage à l'aide d'un anti-C4d couplé à la phycoérythrine et d'un anti-CR1 couplé à la FITC, nous retrouvons d'une part des granules rouges (dépôts de C4d) et verts (bouquets de CR1) distincts à la surface des érythrocytes et d'autre part un mélange rouge-vert des 2 marquages correspondant à la colocalisation de C4d et CR1.**

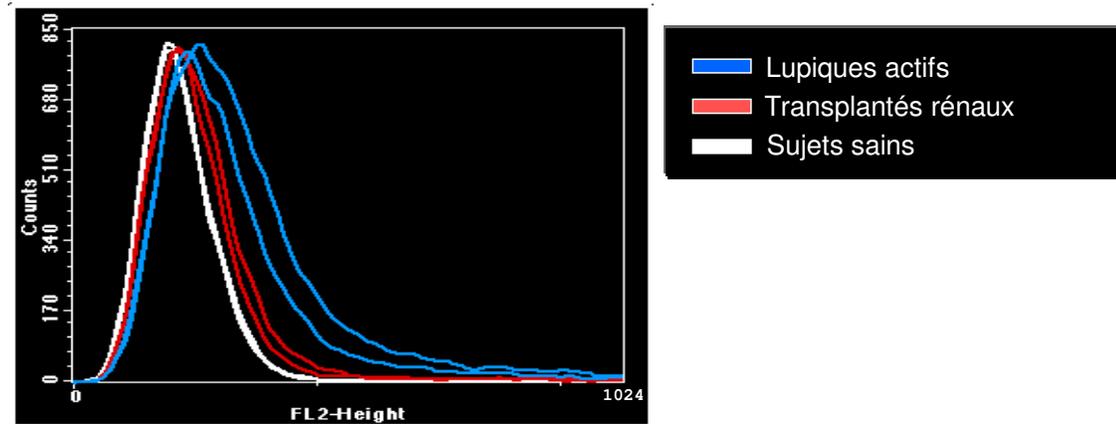
Nous avons confirmé cette première observation en décapant la surface des érythrocytes de patients lupiques et de sujets sains présentant des dépôts de EC4d (obtenus *in vitro*) par des traitements enzymatiques utilisant la trypsine et la papaïne. Les érythrocytes débarrassés de leurs molécules CR1 ne perdent qu'une partie de leur dépôt de C4d (tableau 20, page 161). Ceci signifie que le C4d est fixé pour une part sur le CR1 mais pas uniquement. Il existe à la surface des érythrocytes d'autres récepteurs du C4d insensibles à la trypsine et la papaïne. Le

dépôt de C4d n'est pas restreint à la distribution de CR1.

Échantillons	Traitement enzymatique	CR1(CD35) résiduel	C4d résiduel
			% (IMF)
Érythrocytes avec dépôt de C4d ( <i>in vitro</i> ) = TEDA	Aucun	100 (718)	100 (303,1)
	Trypsine (15 min)	19 (134)	51 (154,8)
	Trypsine (30 min)	0 (-14)	17 (50,5)
	Papaïne	2 (13)	2 (7,3)
Érythrocytes de patient lupique	Aucun	100 (293)	100 (37,4)
	Trypsine (15 min)	35 (102)	71 (26,7)
	Papaïne	13 (37)	24 (9,1)

**Tableau 20 : Présence de CR1 et C4d après traitements enzymatiques (par la papaïne et la trypsine) des érythrocytes d'un sujet sain présentant des dépôts de EC4d (obtenus *in vitro*) : TEDA et des érythrocytes d'un patient lupique. IMF : intensité moyenne de fluorescence.**

#### IV.6. Comparaison par cytométrie de flux des dépôts de C4d à la surface des érythrocytes de sujets sains, de patients lupiques et de patients transplantés rénaux.



**Figure 59 : Evaluation du dépôt de C4d en cytométrie de flux après immunomarquage des érythrocytes de sujets sains, de patients lupiques et de patients transplantés rénaux par l'anticorps monoclonal anti-C4d. Chaque couleur correspond à une catégorie de patients. Deux patients par catégories sont représentés. L'intégrale de chaque courbe représente 10 000 évènements comptabilisés en cytométrie.**

Il apparaît sur la Figure 59 que le niveau du canal moyen de fluorescence (MFC) est différent dans les trois catégories représentées. Ainsi, les MFC des deux lupiques sont plus élevés (MFC= 33, MFC 46) que ceux des deux transplantés (MFC= 27, MFC= 30) qui sont eux-mêmes plus élevés que les deux témoins sains (MFC= 22, MFC= 22.5). Ces résultats confirment nos observations en microscopie à fluorescence.

En absence d'anticorps primaire anti-C4d (contrôle négatif), le MFC observé pour ces 3 catégories de sujets est de 18 (courbe non représentée).

Comme contrôle positif de marquage, nous avons comparé, le marquage C4d au marquage CR1 utilisé pour déterminer la densité de CR1/E des 3 catégories : sujets sains, patients lupiques et patients transplantés rénaux. Le système d'amplification par la phycoérythrine utilisé pour révéler l'anticorps primaire étant le même dans les 2 cas, nous avons évalué dans

un premier temps le dépôt de C4d en fonction de la droite d'étalonnage de CR1 utilisée pour mesurer la densité de CR1 érythrocytaire.

Nous avons également utilisé le TEDA comme contrôle positif. Il a d'ailleurs été fabriqué dans ce but. Malheureusement, le dépôt de EC4d à la surface de ces globules est très important avec une intensité moyenne de fluorescence de 303,1 (voir tableau 20, page 162) et la comparaison avec les niveaux de EC4d des patients transplantés s'avère difficile.

Dans ces conditions, nous avons choisi un sujet sain comme standard (appelé Témoin seuil) et exprimant du EC4d à un niveau physiologique élevé par rapport aux autres sujets sains. Le dépôt EC4d des patients est évalué en fonction du dépôt EC4d du témoin seuil par le calcul du ratio :

$$\text{Ratio EC4d MFC\%} = (\text{MFC prélèvement Z} / \text{MFC Témoin Seuil}) \times 100$$

Les patients présentant un ratio EC4d MFC% supérieur à 105 % sont considérés positifs pour EC4d.

#### IV.7. Valeurs de C4d érythrocytaire pour les trois populations étudiées : générale, transplantée et lupique

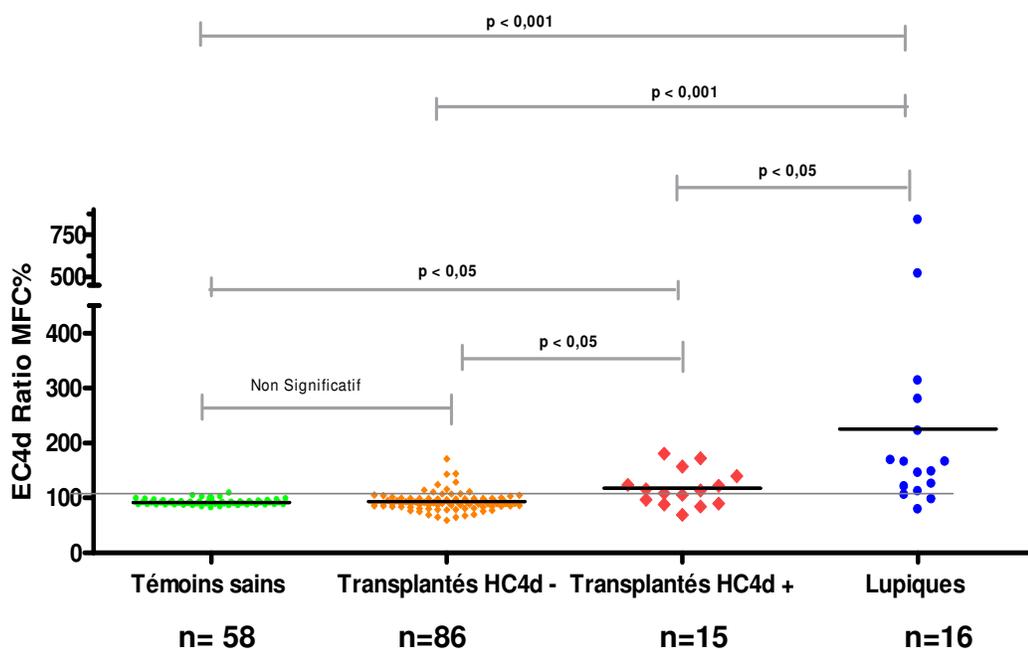


Figure 60 : Intensité de l'immunomarquage C4d érythrocytaire pour les témoins sains, les patients transplantés HC4d négatifs, les patients transplantés HC4d positifs et les patients lupiques. Chaque point représente une valeur EC4d. Les barres noires représentent la médiane de chaque groupe.

Les patients transplantés ayant présenté une dysfonction aiguë de leur greffon et dont la biopsie révèle un marquage diffus C4d des capillaires péri-tubulaires présentent un immunomarquage érythrocytaire C4d plus intense que la population de témoins sains ou même que la population transplantée HC4d négative, cela avec une significativité statistique dans les deux cas (selon les tests de Kurskall Wallis et de comparaisons multiples de Dunn).

Groupes	Nombre de sujets	Médiane	Minimum	Maximum	Ecart Type
Témoins sains	58	90,69	81,99	108,71	5,46
Transplantés HC4d -	86	90,18	59,40	171,47	17,03
Transplantés HC4d +	15	113,53	69,48	180,71	32,57
Témoins Lupiques	16	157,13	79,05	838,69	196,98

**Tableau 21 - Composition des effectifs de témoins et de malades et distribution du EC4d**

## **IV.8. EC4d, HC4d et Rejet Aigu Humoral**

### **IV.8.1. Comparaison EC4d et HC4d**

La Comparaison EC4d/HC4d sur la base de toutes les biopsies (n = 101) est le critère principal d'observation de cette étude. Les incidences de EC4d positifs et négatifs sont ici comparées aux incidences de HC4d positifs et négatifs, pour l'ensemble des biopsies.

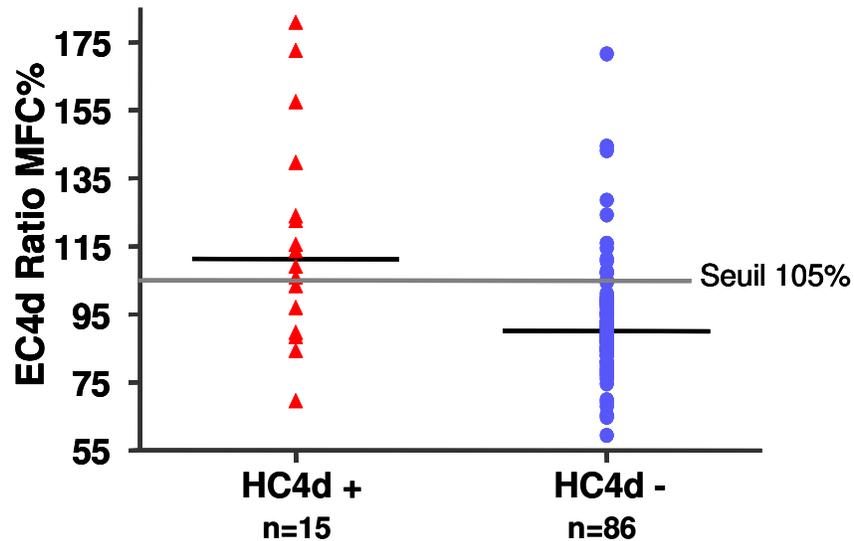


Figure 61 : Intensité de marquage EC4d selon les deux catégories de transplantés rénaux : à gauche (HC4d +), marquage diffus des capillaires péri tubulaires par l'anti-C4d, à droite pas de marquage diffus des capillaires péri tubulaires par l'anti-C4d (HC4d -). Les barres noires horizontales représentent la médiane de chaque distribution.

On constate 83 cas de concordance entre le marquage C4d érythrocytaire et le marquage C4d capillaires péri tubulaires et 18 cas de discordance entre le marquage C4d érythrocytaire et le marquage C4d capillaires péri tubulaires (Figure 61, tableau 22 , page 166 et 167).

Sur l'ensemble des biopsies réalisées avec immunofluorescence C4d disponible (101 biopsies), l'incidence de positivité au niveau des capillaires péri tubulaires était de 15%. L'incidence des prélèvements EC4d, concomitants des 101 biopsies, retenus comme positifs était de 23%. Le tableau de contingence (tableau 22, page 167) révèle des différences statistiquement significatives :

- une concordance pour 83 paires EC4d/HC4d qui se décomposent en 10 paires doubles positives et 73 paires doubles négatives
- une discordance pour 18 paires EC4d/HC4d qui se décomposent en 5 paires histologie positive / érythrocytes négatifs, relatives à 5 patients et 13 paires histologie négative / érythrocytes positifs, relatives à 11 patients (Figure 61, tableau 22, page 166 et 167).

L'analyse et la confrontation aux données cliniques des patients discordants sont traitées dans le chapitre « Discussion ».

	<b>H C4d+</b>	<b>H C4d -</b>	<b>Total</b>
<b>E C4d +</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>23</b>
<b>E C4d -</b>	<b>5</b>	<b>73</b>	<b>78</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>86</b>	<b>101</b>

**Tableau 22 : Nombre de marquages EC4d positifs ou négatifs en fonction de la présence ou non d'un marquage diffus des capillaires péri-tubulaires du greffon – p < 0,0001**

L'analyse de la concordance selon le test de Fisher exact révèle une différence extrêmement significative avec un p inférieur à 0,0001.

Dans ces conditions, en incluant les biopsies réalisées après un an de greffe on obtient une sensibilité du EC4d pour la détection des biopsies capillaires péri-tubulaires C4d positives de 67% et une spécificité de 85%. La valeur prédictive positive du EC4d est de 44% et la valeur prédictive négative de 94%.

#### **IV.8.2. EC4d et capillarite**

L'incidence des lésions de capillarite sur l'ensemble des biopsies est de 48/146 soit 33%. L'incidence de EC4d positif est de 29 /146 soit 20%. Il apparaît sur la figure 62 (page 168) que les intensités de marquages EC4d les plus importantes correspondent aux biopsies comportant des signes de capillarite péri-tubulaire.

Le tableau de contingence (tableau 23, page 168) révèle une différence significative (p < 0,001). La présence de C4d à la surface des globules rouges des patients transplantés est liée positivement à la présence de capillarite sur les prélèvements histologiques :

- 119 paires concordantes EC4d/capillarite ont été comptabilisées, comprenant 25 paires doubles positifs et 94 paires doubles négatifs
- 27 paires discordantes EC4d/capillarite ont été comptabilisées, comprenant 23 paires EC4d-/Capillarite présente et 4 paires EC4d+/Capillarite absente.

La sensibilité de détection de la capillarite par le EC4d est de 52% et sa spécificité de 95%.  
Les VPP et VPN du EC4d pour la capillarite sont respectivement de 86% et 80%.

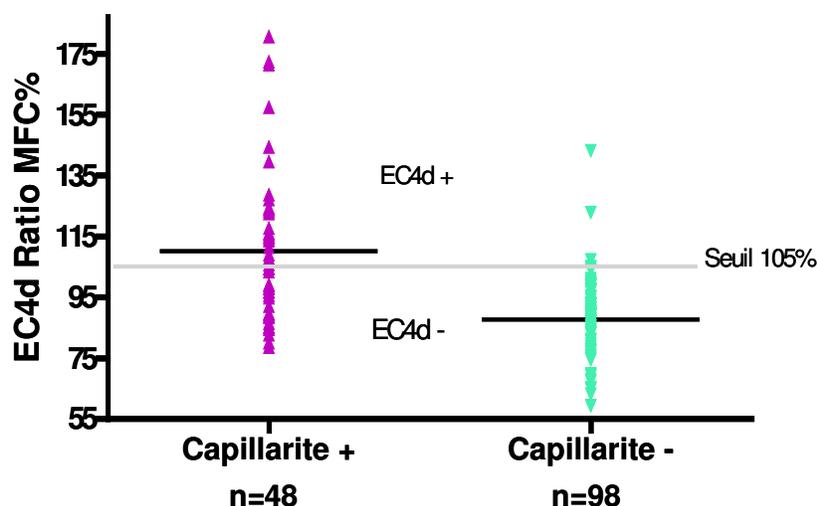


Figure 62 : Intensité de marquage EC4d en fonction de la présence ou non de signes de capillarite sur la biopsie

	Capillarite +	Capillarite -	Total
EC4d +	25	4	29
EC4d -	23	94	117
Total	48	98	146

Tableau 23 : Nombre de marquages EC4d positifs ou négatifs en fonction de la présence ou non d'une capillarite péri-tubulaire relevée sur la biopsie du greffon (étude sur toutes les biopsies réalisées, n=146)

$p < 0,0001$

La corrélation positive entre la présence accrue de C4d à la surface des érythrocytes et l'existence d'une capillarite au niveau du greffon, mise en évidence précédemment sur les 146 biopsies, est retrouvée avec le même niveau de significativité statistique et quasiment les mêmes valeurs de concordances et discordances EC4d/capillarite pour les 101 biopsies que comporte le sous-groupe de biopsies disposant d'une immunofluorescence C4d.

### IV.8.3. HC4d et capillarite

La présence de marquage C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires est reliée statistiquement positivement à l'existence de signes inflammatoires au niveau de ces mêmes capillaires. Nous retrouvons plus de biopsies avec un marquage diffus C4d des capillaires péri-tubulaires en présence de capillarite qu'en l'absence de capillarite. Ainsi l'incidence de HC4d positifs est de 11/39 soit 29% en présence de capillarite, alors qu'elle n'est que de 6,4% en l'absence de capillarite.

	Capillarite +	Capillarite -	Total
HC4d +	11	4	15
HC4d -	28	58	86
Total	39	62	101

**Tableau 24 : Marquage C4d diffus des capillaires péri-tubulaires et présence ou non d'une capillarite péri-tubulaire relevée sur la biopsie du greffon (étude sur toutes les biopsies disposant d'un fragment pour l'IF, n=101) ; p < 0,004**

Le tableau de contingence ci-dessus dont le p est de 0,004 révèle :

- 69 paires concordantes HC4d/Capillarite se décomposant en 11 paires doublement positives et 58 paires doublement négatives
- 32 paires discordantes HC4d/Capillarite

La sensibilité de HC4d retrouvée ici pour détecter l'existence d'une capillarite sur les biopsies de greffons rénaux est de 28% et la spécificité de 93%. VPP et VPN valent respectivement 73% et 67%.

Il existe une relation positive forte entre le marquage C4d érythrocytaire et le marquage C4d diffus des capillaires péri-tubulaires du greffon rénal, ce dernier étant le critère considéré aujourd'hui comme le plus important pour le diagnostic de rejet aigu humoral.

#### IV.8.4. EC4d et glomérulite (g)

Le marquage C4d érythrocytaire est plus important en présence de glomérulite qu'en l'absence de glomérulite. La figure ci-dessous nous indique que les trois plus importantes intensités de marquage EC4d correspondent à des biopsies avec glomérulite alors que les valeurs les plus basses de marquage C4d érythrocytaire correspondent à des biopsies sans glomérulite.

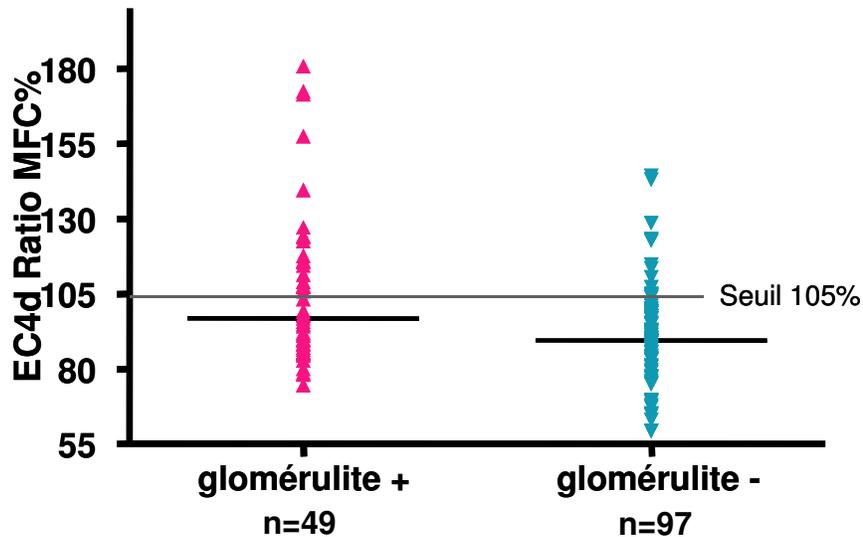


Figure 63 : Intensité de marquage érythrocytaire EC4d en fonction de la présence ou non de signes de glomérulite sur la biopsie

Le tableau de contingence (tableau 25, page 171) retrouve bien une corrélation statistiquement significative selon le test de Fisher exact avec un  $p < 0,0001$ .

L'incidence de marquage C4d érythrocytaire est de 39% dans le groupe avec glomérulites (glomérulite +) et de 10,3% dans le groupe sans glomérulite (glomérulite-).

La sensibilité du EC4d pour détecter la présence de glomérulite sur la biopsie est donc de 39% et la spécificité de 90%. VPP et VPN valent respectivement 65% et 74%.

	Glomérulite +	Glomérulite -	Total
EC4d +	19	10	29
EC4d -	30	87	117
Total	49	97	146

**Tableau 25 : Marquage érythrocytaire EC4d en fonction de la présence ou non de signes de glomérulite sur la biopsie. (p = 0,0001)**

#### IV.8.5. HC4d et glomérulite (g)

L'incidence de glomérulite dans le groupe HC4d positif est de 24% contre 8,5% dans le groupe HC4d négatif. La différence est statistiquement significative (p= 0,046). La sensibilité de HC4d pour la glomérulite est donc de 24%, la spécificité de 91,5%, la VPP de 67% et la VPN de 63%.

	Glomérulite +	Glomérulite -	Total
HC4d +	10	5	15
HC4d -	32	54	86
Total	42	59	101

**Tableau 26 : Marquage C4d des capillaires péri-tubulaires et présence ou non de glomérulite**

#### IV.8.6. EC4d et critères histologiques stringents de rejet aigu humoral

Nous choisissons ici de sélectionner deux groupes de patients situés de part et d'autre de l'échelle diagnostique du rejet aigu humoral (RAH). Nous sélectionnons ainsi d'une part les patients qui remplissent deux critères histologiques standards (capillarite et glomérulite) de RAH et le critère pathognomonique de marquage C4d diffus des capillaires péri-tubulaires : il s'agit des patients HC4d+ Capillarite + et glomérulite+ (H+ Cap + g+). Nous avons

sélectionné par ailleurs les patients qui ne remplissent aucun de ces trois critères : il s'agit des patients HC4d- Capillarite - et glomérulite- (H- Cap - g -).

Le premier groupe H+ Cap + g + comporte donc des patients qui remplissent deux critères sur trois de RAH, le troisième (présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre le greffon), n'étant pas disponible de manière systématique pour tous les patients, il n'a pas été pris en considération.

Dans ces deux sous groupes on retrouve des incidences de positivité EC4d très différentes et hautement significatives statistiquement (tableau 27, page 172) :

- dans le groupe H+ Cap + g+ l'incidence de positivité du EC4d est de 90%, ce groupe comprenant 9 biopsies réalisées auprès de 8 patients distincts ayant présenté cliniquement un rejet aigu humoral caricatural.
- dans le groupe H – Cap – g- l'incidence de positivité du EC4d est de 6,4%

Les cas discordants pour ces deux groupes seront analysés dans le chapitre « discussion ». En considérant que ces discordants correspondent à un cas de faux négatifs et trois cas de faux positifs on obtient une sensibilité de EC4d pour le diagnostic de RAH de 90% avec une spécificité de 94% et des VPP et VPN respectivement de 75% et 98% (tableau 25, page 171).

	HC4d + Capillarite + glomérulite +	HC4d - Capillarite- glomérulite-	Total
EC4d +	9	3	12
EC4d -	1	44	45
Total	10	47	57

**Tableau 27 : Conditions stringentes de diagnostic de Rejet Aigu Humoral et EC4d**

Sur la figure 64 (page 173) nous pouvons constater que les seuls cas de EC4d négatifs alors que l’histologie C4d est positive (hors groupe H+ Cap + g+) correspondent à des situations où il existe véritablement peu de lésions histologiques standards et en particulier des situations où on ne retrouve ni capillarite ni glomérulite.

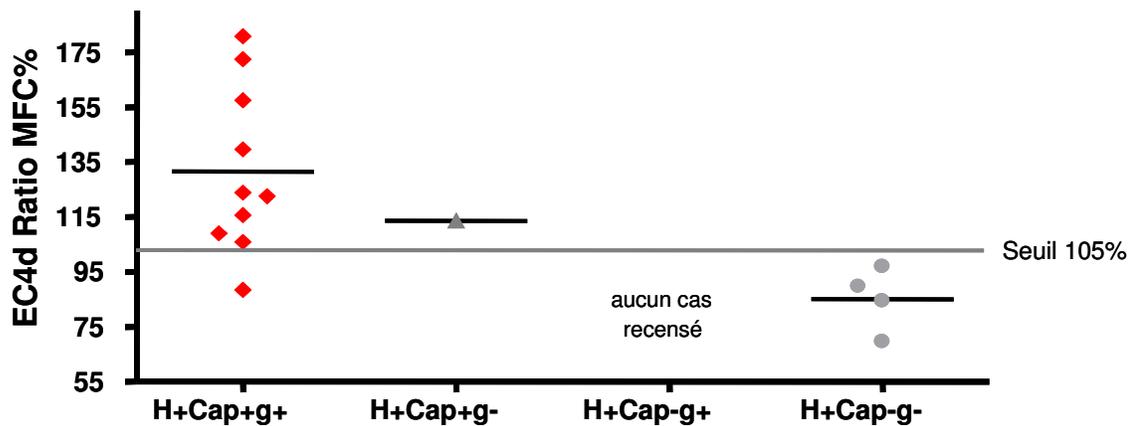


Figure 64 : Marquage EC4d dans le groupe HC4d POSITIF selon la présence de capillarite et/ou de glomérulite.

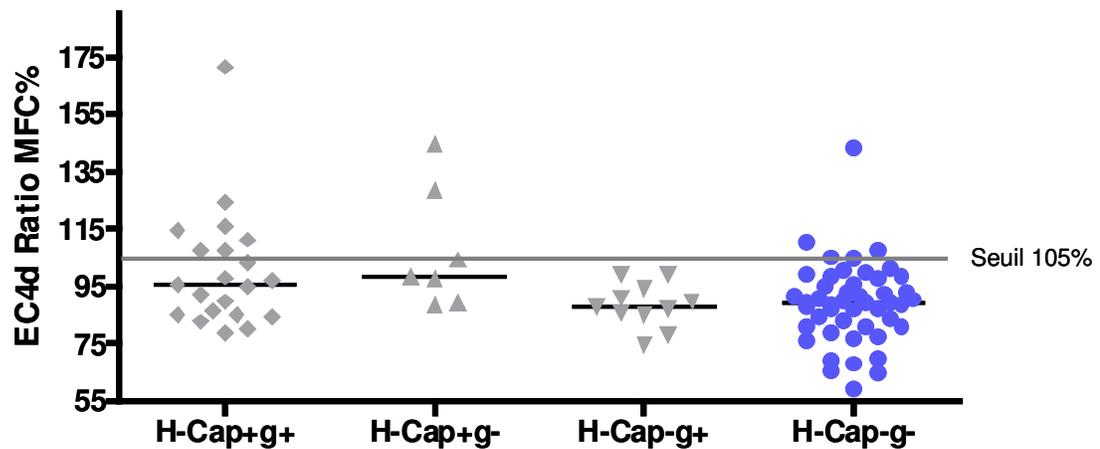


Figure 65 : Marquage EC4d dans le groupe HC4d NEGATIF selon la présence de capillarite et/ou de glomérulite.

L'analyse de la distribution du EC4d dans les groupes HC4d+ d'une part et HC4d- d'autre part révèle :

- premièrement dans le groupe HC4d +, les valeurs quantitatives de EC4d sont plus élevées dans le sous-groupe associant capillarite et glomérulite, que dans le groupe n'en présentant pas ( $p < 0,05$ ). Une seule biopsie comporte un immunomarquage diffus C4d des capillaires péritubulaires associé à des lésions de capillarite sans lésions visibles de glomérulite, le EC4d contemporain de cette biopsie était positif. Aucune biopsie HC4d positive ne comportait des lésions de glomérulite sans capillarite associée.
- deuxièmement dans le groupe HC4d -, et de manière analogue au groupe HC4d+, les valeurs quantitatives de EC4d sont plus élevées dans le sous-groupe associant capillarite et glomérulite que dans le groupe n'en présentant pas ( $p < 0,05$ ) (Figure 64 et 65, page 173)

#### **IV.8.7. Comparaison du EC4d dans les sous-groupes capillarite/glomérulite indépendamment du HC4d**

L'analyse des distributions du EC4d croisées avec les quatre combinaisons possibles d'association glomérulite-capillarite révèle des différences nettes, statistiquement significatives, en faveur d'une relation positive entre capillarite et augmentation du EC4d (Figure 66, Tableaux 28 et 29 pages 175 et 176).

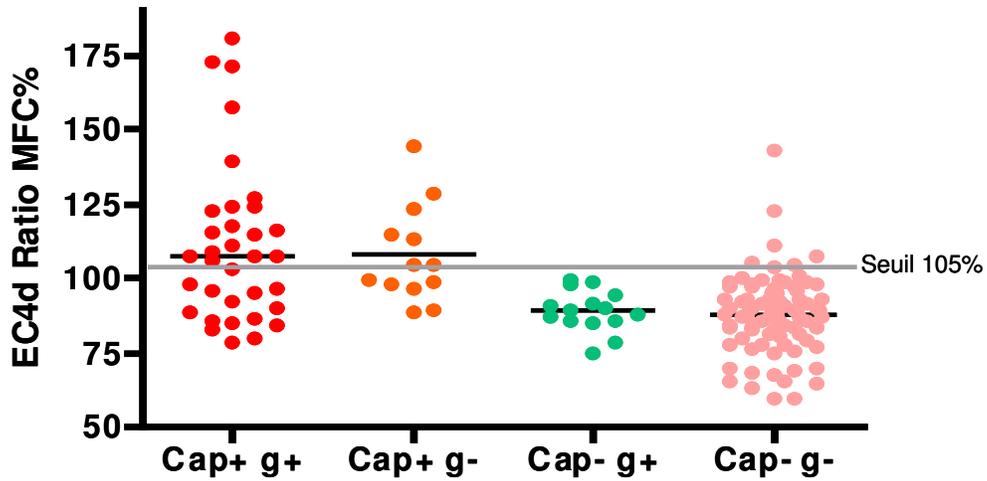


Figure 66 : Capillarite, glomérulite et EC4d

Comparaison	Valeur de p
Cap + g + vs. Cap + g -	$p > 0.05$
Cap + g + vs. Cap - g +	$p < 0.05$
Cap + g + vs. Cap - g -	$p < 0.001$
Cap + g - vs. Cap - g +	$p < 0.05$
Cap + g - vs. Cap - g -	$p < 0.001$
Cap - g + vs. Cap - g -	$p > 0.05$

Tableau 28 : Test des comparaisons multiples de Dunn appliqué à la valeur quantitative de EC4d en fonction des combinaisons capillarite / glomérulite

Groupe	n	Médiane	Minimum	Maximum	Ecart Type
Cap + g +	34	107.30	78.58	180.71	26.9
Cap + g -	13	104.30	88.66	144.41	16.36
Cap - g +	15	89.51	74.54	99.23	7.03
Cap - g -	84	88.79	59.40	143.12	13.37

**Tableau 29 : Caractéristiques des distributions de EC4d en fonction des différentes catégories capillarite/glomérulite.**

## **DISCUSSION**

## **I. Etude de la distribution et de la densité des 2 espèces moléculaires de CR1 érythrocytaire du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) : CR1 de « type humain » et CR1 de « type singe » ou CR1like (CR1L)**

Certaines espèces de primates non humains ont été décrites comme n'exprimant à la surface de leurs érythrocytes qu'une seule forme de CR1, plus courte que la forme humaine (de 55 à 135kDa). Nous avons désigné cette espèce moléculaire comme E-CR1 de « type singe » ou CR1like (CR1L).

D'autres espèces de primates non humains expriment en plus de cette forme courte, une protéine similaire en taille au CR1 humain (200kDa). Nous avons désigné cette espèce moléculaire comme E-CR1 de « type humain ».

Dans cette étude, les espèces moléculaires de CR1 érythrocytaire, leurs distributions et leurs densités ont été étudiées chez le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) à l'aide d'un ensemble d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes des molécules de CR1 humain en utilisant les techniques de western blot, de cytométrie de flux et de microscopie confocale.

L'étude par western blot montre que les érythrocytes du Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) expriment deux espèces moléculaires de CR1 qui diffèrent par leur poids moléculaire (200kDa/165kDa). Le CR1 érythrocytaire de « type humain » a la même taille que le CR1 humain tandis que le CR1 de « type singe » est plus court.

L'analyse par cytométrie de flux après traitement des érythrocytes de Macaque rhésus par la phospholipase C montre que le CR1 érythrocytaire de « type humain » est transmembranaire comme le CR1 humain tandis que le CR1 de « type singe » est à ancrage phospholipidique (liaison GPI).

Le CR1 de « type singe » du Macaque rhésus correspond au CR1 décrit chez le Babouin et le Chimpanzé dont la molécule est courte, à ancrage phospholipidique et codée par le gène *CR1like* [217].

Pour les espèces comme le Babouin, le Patas, le Mangabey et le Chimpanzé, il n'a été rapporté l'existence que d'une seule forme de CR1 érythrocytaire : CR1L ou CR1 érythrocytaire de « type singe ». D'autres espèces telles que l'Orang-outan, le Gibbon, le Colobus et le Gorille expriment les deux molécules (CR1 et CR1L) à la surface de leurs érythrocytes tout comme le Macaque rhésus [210].

L'analyse par microscopie confocale montre que les molécules de CR1 érythrocytaire de Macaque rhésus forment des bouquets de CR1 comme chez l'Homme tandis que la molécule de CR1L érythrocytaire est distribuée de façon diffuse. Ce résultat observé chez le Macaque rhésus ne correspond pas à ce qui est décrit chez le Chimpanzé. En effet, les érythrocytes de Chimpanzé qui n'expriment apparemment que la forme CR1 de « type singe » (CR1L) présentent des arrangements en bouquets de CR1L beaucoup plus gros que ceux observés chez l'Homme [214]. Nous suggérons que le Chimpanzé possède en fait une espèce moléculaire CR1 très minoritaire par rapport à CR1L et que la formation de grappes se fait à l'initiative du CR1 transmembranaire de « type Humain » en dépit de sa faible minorité. Ce mécanisme a pu être omis dans le contexte de très fort niveau de CR1 de « type singe ».

L'anticorps monoclonal anti-CR1 3D9 dont nous avons confirmé qu'il ne reconnaît un épitope présent que sur le CR1 érythrocytaire de « type humain » (200kDa) a été retenu pour l'étude de la distribution des 2 espèces moléculaires de CR1 (CR1 et CR1L) [210].

La quantification des sites antigéniques de CR1 par cytométrie de flux montre 2 espèces moléculaires de CR1 présentes à la surface des érythrocytes de Macaque rhésus dans des taux 5 à 20 fois plus élevés que chez l'Homme. La comparaison des 2 immunomarquages chez le Macaque rhésus révèle la présence de 30 à 40 % du CR1 érythrocytaire de « type humain » et de 60 à 70% du CR1 érythrocytaire de « type singe ».

Un polymorphisme allotypique du CR1 érythrocytaire de « type humain » a également été mis en évidence chez le Macaque rhésus. En effet, le CR1 érythrocytaire de « type humain » de deux Macaques (340 et 353), bien que plus abondant que celui du Macaque 332 n'est pas reconnu par l'anticorps monoclonal anti-CR1 E11.

Pour l'Homme, le fait que son CR1 érythrocytaire soit arrangé en bouquets constitue un avantage considérable dans la mesure où bien qu'exprimant une faible densité de CR1 érythrocytaire (200 à 1000 molécules), il est capable de lier les complexes immuns efficacement.

Les analyses en microscopie confocale ont permis de montrer que le CR1 de « type humain » érythrocytaire de Macaque se caractérise par la même distribution en bouquets que chez l'Homme, alors que la forme CR1 de « type singe » à liaison GPI chez le Macaque rhésus est plus diffuse. Il a été supposé que les primates comme le Chimpanzé ou le Babouin qui n'expriment que le CR1 de « type singe », le faisaient avec une forte densité en vue de compenser l'absence de leur CR1 de « type humain ».

Nos observations chez le Macaque rhésus montrent que le haut niveau d'expression du CR1 de « type singe » n'est pas un acquis de l'évolution pour compenser le manque de CR1 de « type humain » érythrocytaire.

Plusieurs études ont rapporté que le CR1 de « type singe » est codé par une duplication partielle du gène CR1 [219]. Une séquence semblable de rôle inconnu existe dans le génome humain au sein d'une zone particulière appelée RCA, nommée *CR1like* [76,78]. Chez le Babouin, le Chimpanzé et le cynomolgus, le CR1 érythrocytaire de « type singe » est une molécule à liaison GPI codée par un homologue du *CR1like* humain [215].

Les comparaisons des 5 premiers SCR de CR1 et *CR1like* du Babouin, Chimpanzé et de l'Homme, indiquent une proximité phylogénétique entre le Chimpanzé et l'Homme (près de 95% d'homologie en acides aminés pour le *CR1like* et 98% pour le CR1), tandis que le Chimpanzé et le Babouin sont un peu plus éloignés avec 85% d'homologie pour *CR1like* et 89% pour CR1). Ainsi *CR1like* est plus divergent que le CR1 pour ces 3 espèces, suggérant que le *CR1like* est plus ancien. Si cela est vrai, cela suggère que CR1 dérive du *CR1like* [215].

Le Macaque rhésus 279 est une femelle macaque en bonne santé qui constitue une découverte intéressante dans la mesure où elle est dépourvue de CR1 « de type singe ». La numération des sites antigéniques de CR1 par cytométrie de flux (avant et après traitement par la phospholipase C) et l'analyse en microscopie confocale de ce Macaque ont permis de montrer de façon certaine, que le CR1 de « type humain » à la surface de ses érythrocytes, est arrangé en bouquets et n'est pas à liaison GPI, mais transmembranaire. L'immunomarquage anti-CD59 a permis de confirmer que ce Macaque est capable de produire des molécules à liaison GPI comme en témoigne la présence de CD59 à la surface de ses globules rouges. CD59 peut d'ailleurs être décapé après traitement à la phospholipase C. Le CR1 érythrocytaire de « type humain » du Macaque rhésus 279 est toujours reconnu par tous les anticorps monoclonaux anti-CR1 utilisés au cours de cette étude alors qu'aucun ne parvient à détecter l'espèce moléculaire de CR1 de « type singe » rendant improbable la simple déficience d'un épitope ou d'une partie de la molécule. Cela suggère plutôt l'absence d'expression de l'espèce moléculaire de CR1 de « type singe » pour ce Macaque. Malheureusement, il ne nous a pas été possible d'approfondir nos investigations avec ce Macaque notamment par manque de connaissances au sujet de ses antécédants familiaux. Son bilan immun était apparemment normal et elle a répondu convenablement à un essai vaccinal à base de GP120 du VIH (communication personnelle de B. HURTREL).

Le Macaque 279 exhibe ainsi un « profil humain » en exprimant uniquement le CR1 de « type humain » avec une densité érythrocytaire de 500 sites en moyenne, correspondant au génotype de densité (HL) le plus commun chez l'Homme. Dépourvu de CR1 de « type singe », ce Macaque a dû développer d'autres moyens physiologiques pour contrôler la clairance des complexes immuns et contourner ainsi cette déficience, finalement comme l'espèce humaine a dû le faire.

Pour les primates non-humains exprimant les 2 espèces moléculaires de CR1 érythrocytaire, il a été montré que le CR1 de « type humain » a une plus grande affinité pour C3b et C4b que le CR1 de « type singe » [76]. Une plus faible affinité du CR1 érythrocytaire de « type singe » a été suggérée pour expliquer pourquoi il est exprimé en plus grande quantité que le CR1 de l'Homme puisqu'un plus grand nombre de molécules de CR1 de faible affinité est nécessaire pour lier les complexes immuns. Cependant, le fait que le Macaque rhésus exprime du CR1 transmembranaire de « type humain » à la même densité que celle trouvée chez l'Homme, exclut cette hypothèse.

Les raisons de la co-existence à la surface des érythrocytes des primates non-humains du CR1 de « type singe » et du CR1 de « type humain » restent à élucider sachant que notre espèce est la seule dépourvue de CR1 à liaison GPI.

La conservation du CR1 érythrocytaire de « type singe » par le Macaque rhésus et d'autres primates non-humains a été dans un premier temps considérée comme un acquis au cours de l'évolution qui pourrait protéger ces espèces contre les maladies endémiques.

En effet, le CR1 humain est un facteur de virulence pour *Plasmodium falciparum* dans le cas de la malaria en se liant à une adhésine malariale exprimée à la surface des érythrocytes infectés et appelée PfEMP1 [267]. Cette liaison induit la formation des rosettes ou « *rosetting* », qui est un phénomène associé à la sévérité de la maladie. Le site de liaison à PfEMP1 semble faire intervenir la partie C-terminale de CR1, incluant le SCR25 situé dans le LHR D[267], une région absente de *CR1like*. Ainsi, il a été supposé que si une protéine semblable à PfEMP1 est exprimée par des érythrocytes de primates non-humains infectés par *Plasmodium falciparum*, le « *rosetting* » ne se produit pas. Les différences de susceptibilité entre humains et grands singes vis à vis de *Plasmodium falciparum* ont été supposées reliées au fait que la forme courte de CR1 des singes est dépourvue de LHRD [210].

Nos résultats ont démontré que le Macaque rhésus exprime autant de CR1 érythrocytaire de « type-humain » que l'Homme voire plus et qu'il peut même survivre à une déficience en CR1 érythrocytaire de « type singe ».

Dans ces conditions, nous avons étudié le phénomène de rosettes chez le Macaque rhésus. Nous avons aussi analysé chez des primates de l'ancien monde et du nouveau monde, la présence d'éventuels polymorphismes dans la région de CR1 (région SI<sup>a</sup>) où se situe le site de liaison aux protéines de *Plasmodium falciparum*.

## **II. Etude de la région SI<sup>a</sup> chez certains singes de l'ancien monde et certains singes du nouveau monde**

Notre étude a montré que les primates non-humains présentent des polymorphismes supplémentaires dans la région SI<sup>a</sup> de leur CR1, en plus de ceux répertoriés chez l'Homme.

Ils présentent également des polymorphismes pour certains antigènes du groupe sanguin Knops de CR1 au niveau N1540S, S11/S12, S14/S15 et KAM-/+. En revanche, tous les primates étudiés présentent les antigènes Kn a et McC a.

Pour ce qui est des espèces Macaque rhésus, Macaque cynomolgus, Orang-outan, seules espèces à exprimer CR1 de « type humain », on observe que CR1 porte l'antigène S11(SI<sup>a</sup>+). Leur CR1 est donc susceptible de se lier à la protéine de *Plasmodium falciparum* : PfEMP1.

Toutefois, les Macaques rhésus, Macaque cynomolgus, Orang-outan ne sont pas des hôtes naturels de *P. falciparum*. Nous suggérons donc que des polymorphismes autour de S11 comme A1599G peuvent altérer la capacité de liaison à PfEMP1 et expliquer l'absence de susceptibilité à *P. falciparum*.

Nos résultats ne concernent que 3 ou 4 individus d'une même espèce. Les génotypages doivent être poursuivis au sein de cohortes d'individus plus nombreux de façon à montrer si ces polymorphismes sont spécifiques des espèces ou allotypiques.

## **III. Etude de la formation des rosettes entre érythrocytes de Macaque rhésus et érythrocytes humains infectés par *Plasmodium falciparum***

Le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) n'est pas un hôte naturel de *P. falciparum* [340]. Nous avons montré qu'il présentait à la surface de ses érythrocytes une forme CR1 analogue à la forme humaine et une forme plus courte de CR1 beaucoup plus abondante. Nous avons voulu savoir si dans ces conditions sachant que nous avons trouvé des SNP proches des nucléotides impliqués dans le polymorphisme SI<sup>a</sup>, si les érythrocytes de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) étaient susceptibles de former des rosettes avec des érythrocytes humains infectés par *P. falciparum*. Nous avons envisagé que les érythrocytes de Macaque rhésus (*Macaca*

*mulatta*) seraient protégés de ce phénomène par les polymorphismes entourant la région S1<sup>a</sup> de CR1 et/ ou par le CR1like beaucoup plus abondant.

Nous avons donc mis en présence des érythrocytes humains infectés par *P. falciparum*, des érythrocytes de Macaque rhésus. Nous avons observé au bout d'une heure, la présence de quelques rosettes mixtes composées d'érythrocytes humains infectés et d'érythrocytes de Macaques sains.

Il semble donc que la formation de rosettes soit possible entre des érythrocytes humains infectés issus de rosettes rompues mécaniquement (rupture incomplète) et des érythrocytes de Macaque rhésus.

La formation de rosettes qui impliquent toute une panoplie de molécules membranaires érythrocytaires et parasitaires ainsi que des molécules sériques est peut être dans notre expérience indépendante des molécules de CR1 et CR1like macaques. Les moyens techniques dont nous disposons pour le décapage des 2 formes de CR1 (CR1 et CR1like) des érythrocytes de Macaque par des enzymes telles que la trypsine et la phospholipase C ne nous permettent pas de décaper uniquement l'une ou l'autre des molécules CR1 et CR1like. De plus, l'emploi de ces enzymes modifie la surface des érythrocytes humains et macaques en endommageant d'autres protéines membranaires, ce qui nous limite dans l'étude de l'implication des formes de CR1 dans la formation de rosettes entre érythrocytes humains et macaques.

Le Macaque étant génotypé comme S11 (S1<sup>a</sup>+) et le fait que notre étude montre la formation de rosettes, suggèrent que dans notre étude avec la souche *P. falciparum* 89F5 var o, le Macaque ne semble pas protégé du « rosetting »:

- ni par la forme CR1like (à ancrage phospholipidique et beaucoup plus abondante)
- ni par les polymorphismes structuraux trouvés autour de la position de l'antigène S11 (S1<sup>a</sup>).

La formation de rosettes entre des érythrocytes macaques S11 (S1<sup>a</sup>+) et les érythrocytes humains infectés par *P. falciparum* corrèle avec les résultats observés chez l'Homme et décrits par Alexa Rowe *et al.* qui montrent que les érythrocytes humains S11 (S1<sup>a</sup>+) font des rosettes avec les érythrocytes infectés par *P. falciparum*.

Nous ne sommes pas certains de l'implication de CR1 dans la formation des rosettes. L'emploi de sérum humain dans les cultures du parasite, en présence d'érythrocytes de Macaque peut être à l'origine de la formation des rosettes dont on sait que dans certains cas elle nécessite la présence d'Igs. Nous n'avons pas été en mesure de nous affranchir de ce paramètre, le sérum humain étant indispensable au développement de la souche *P. falciparum* 89F5 var o.

#### **IV. Analyse des promoteurs des gènes CR1 et CR1like chez l'Homme et le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*)**

Au cours de cette étude, nous avons découvert les promoteurs des gènes CR1 et CR1L de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*). Nous avons séquencé et cloné les 660 pb en amont des gènes CR1 et CR1L correspondant à leur promoteur proximal. L'activité de ces promoteurs a été testée dans plusieurs lignées cellulaires.

Sachant que l'expression d'un gène est médiée par des interactions entre les facteurs de transcription (facteurs trans) et leurs sites de liaison (facteurs cis) situés au niveau des promoteurs, *enhancers* ou *silencers*, les régions promotrices des gènes CR1 et CR1L du Macaque rhésus ont été analysées à l'aide du logiciel TESS. Ce logiciel nous a donné les positions des sites de liaison de facteurs de transcription pouvant se fixer potentiellement sur chacune des régions promotrices des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhésus.

Les régions promotrices des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhésus ont été clonées en amont d'un gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente DsRed puis transfectées dans plusieurs lignées cellulaires.

Les transfections des lignées cellulaires humaines comme HepG2, HeLa 229, K562, HeLa 92.1.7, U937 et UT7 n'ont pas permis de produire la protéine DsRed quels que soient les promoteurs transfectés. Nous suggérons que ces cellules sont moins permissives que les cellules CHO et 293T. Cela suggère que la machinerie transcriptionnelle est soit bloquée par un élément trans inhibiteur, soit dépourvue d'un élément activateur.

La transfection des CHO et 293T a permis de produire de la protéine DsRed suggérant que ces régions sont promotrices et que nous avons bien isolé les promoteurs de CR1 et CR1L de Macaque rhésus (*Macaca mulatta*). Les pourcentages d'homologie entre les séquences peptides signal du CR1 Humain et Macaque et entre les séquences peptides signal du CR1L Humain et Macaque confirment que nous avons bien isolé les promoteurs des gènes CR1 et CR1L du Macaque rhésus.

L'analyse en microscopie à fluorescence montre que pour une lignée donnée (CHO et 293T) l'activité des régions promotrices CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque est effective.

Vingt pourcents des cellules transfectées produisent de la protéine DsRed à un même niveau d'intensité de fluorescence. La DsRed est observée dans les cellules CHO et 293T respectivement 2 jours et 5 jours après transfection. Cela suggère que les cellules CHO sont dans ce cas, plus permissives ou que les constructions plasmidiques sont plus rapidement actives dans les cellules CHO que dans les cellules 293T.

Le gène DsRed sous le contrôle du promoteur du gène CR1L macaque n'est pas surexprimé *in vitro* par rapport à CR1, comme l'est CR1L à la surface des érythrocytes de Macaque rhésus *in vivo*. Le gène DsRed sous le contrôle du promoteur du gène CR1L Humain est exprimé *in vitro*, bien que CR1L ne soit pas produit à la surface des érythrocytes humains *in vivo*. Cela suggère que les régions promotrices ne contiennent pas tous les éléments cis de régulation autrement dit que le promoteur proximal est suffisant pour activer l'expression du gène rapporteur mais pas pour le réguler comme *in vivo*.

Les cellules CHO et 293T fournissent des facteurs trans suffisant pour activer l'expression du gène rapporteur mais pas pour le réguler comme *in vivo*. Les cellules CHO et 293T seraient capables de produire du CR1 et CR1L d'Homme et de Macaque rhésus.

Les régions promotrices des gènes CR1 et CR1L contiennent des sites de liaison de facteurs de transcription communs permettant leur activité *in vitro*. MZF-1(-91), SP1(-76), (+1) et Ets(-64) décrits par Kim *et al* pourraient être impliqués dans ce mécanisme [127, 128].

Le fait que seule la région promotrice du gène CR1 humain permette de produire DsRed dans les lymphocytes B de Macaque rhésus infectés à l'EBV (CRL1805) suggère que cette lignée cellulaire contient des facteurs de transcription spécifiques pouvant activer uniquement le promoteur proximal de CR1 humain. La région promotrice de CR1 humain présente des sites de liaison spécifiques tels que gata-1(-449), c-myc(-356), c-myb(-266) et AML1(-14) qui pourraient être impliqués dans ce cas.

Quand on compare les régions promotrices de CR1 humain et macaque et de CR1L macaque, on observe que les sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que AP1(-527), YY(-436), MZF-1 (-91), SP1(-213) (-77) et Ets(-64) sont conservés. Ces facteurs pourraient être impliqués dans l'expression de CR1 de l'Homme et CR1 et CR1L de Macaque rhésus *in vivo* sachant que MZF-1(-91), SP1(-76), (+1) et Ets(-64) ont été décrits dans la régulation de CR1 humain par Kim *et al*. MZF-1 semble être impliqué dans l'hématopoïèse à travers un mécanisme qui permet l'activation du promoteur de CD34 [80].

Bien qu'AP1 (-140) soit décrit dans le promoteur de CR1 humain [127], il est manquant dans les régions promotrices de CR1 et CR1L de Macaque rhésus. Cela minore son action potentielle dans la régulation de ces gènes. Les sites de liaison pour Ets-1 (-64), MZF-1 (-91), SP1 (-77) sont conservés dans les régions promotrices de CR1 et CR1L de Macaque rhésus.

AML1 présent dans le promoteur de CR1 humain est absent des promoteurs de CR1L humain et macaque. L'élimination du site AML1 réduit de façon significative mais sans toutefois abolir l'activité du promoteur CR1 humain [127]. Les promoteurs des gènes CR1 de l'Homme et du Macaque qui s'expriment avec la même densité à la surface de leurs érythrocytes contiennent le motif AML1. Le promoteur du gène CR1L de Macaque dont la molécule est 10 fois plus exprimée à la surface des érythrocytes est dépourvue de ce motif. Le promoteur du gène CR1L de l'Homme dont le transcrit est uniquement observé au niveau des tissus lymphoïdes fœtaux et hématopoïétiques est aussi dépourvu de ce site. Cela suggère qu'AML1 n'est pas indispensable à l'expression des gènes CR1 et CR1L.

Le promoteur du gène CR1L de l'Homme se caractérise par des sites de liaisons pour des facteurs de transcription spécifiques tels que LBP1(-527) à la place d'AP1 et c-ets-2 (-213) à la place de SP1 des promoteurs de CR1 humain, CR1 et CR1L macaques. Il se singularise par la perte de YY1(-456). LBP1(-527), c-ets-2 (-213) et la perte de YY1(-456) pourraient être impliqués dans la perte d'expression érythrocytaire de CR1L chez l'Homme *in vivo*. En effet, LBP1 est décrit comme répresseur [341].

Le fait d'avoir observé *in vivo* des transcrits de CR1L [80] et que dans les cellules CHO et 293T le promoteur du gène CR1L humain soit actif suggère *in vivo* une régulation post-transcriptionnelle du gène CR1L humain négative, au niveau par exemple de la traduction, ce qui conduit à l'absence de la molécule à la surface des érythrocytes.

La région promotrice de CR1L de Macaque dont la protéine est surexprimée à la surface des érythrocytes se caractérise par des sites de liaison pour des facteurs de transcription spécifiques tels que IRF1/IRF2(-651), gata1(-608), LEF1(-426), YY1(-386) (à la place de c-ets-2 dans le promoteur des gènes CR1 et CR1L humains et CR1 macaque), YY1(-305, -72) et MAF(-178). Ces facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la surrégulation de CR1L chez le Macaque rhésus.

Nous proposons un modèle hypothétique faisant intervenir les facteurs HES-1 (+7), AML1(-54) et AP1(+7) pour expliquer les différentes régulations des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhésus *in vivo*.

CR1 humain est exprimé grâce à AP1(-145), MZF1(-91), SP1(-77), Ets(-64) et AML1 (-54) [127,129] mais aussi AP1(+7).

CR1L humain n'est pas exprimé à cause de la substitution de AP1(+7) par HES1(+7) et de l'absence de AML1 (-54) [80]. En effet, HES1 peut avoir un rôle d'inhibiteur [342] tandis que AP1 est activateur [343]. HES1 est notamment impliqué dans le signal notch [344,345] qui aboutit à une régulation négative de la différenciation cellulaire au cours de l'hématopoïèse, la myogénèse, la neurogénèse [346,347], l'éducation thymique [348]. HES1 inhibe la transcription des gènes Mash-1 et CD4 chez la souris et l'Homme. Il peut également s'associer à AML1 pour réguler la transcription [349] et son action peut s'améliorer en se combinant à c-Myb [342]. CR1L humain possède d'ailleurs 2 sites de liaison pour c-myb en (-629 et -109).

Malgré la présence de HES1, le CR1 de Macaque s'exprime grâce à la présence de AML1(-54) qui court-circuite l'action de HES1.

Le gène CR1L de Macaque s'exprime parce que son promoteur présente le site de liaison AP1(+7) à la place de HES1(+7). La surrégulation de ce gène *in vivo* par rapport aux CR1 humain et macaque peut être la conséquence de la présence de sites de liaison spécifiques comme IRF1/IRF2(-651), gata1(-608), LEF1(-426), YY1(-386) (à la place de c-ets-2 dans le promoteur des gènes CR1 et CR1L humains et CR1 macaque), YY1(-305, -72) et MAF(-178). Des études complémentaires comme des délétions au niveau des sites de fixation des facteurs HES1, AP1 ou c-myb, l'emploi d'ARN interférents, ou l'allongement des promoteurs proximaux peuvent être entreprises pour vérifier cette hypothèse.

Au niveau humain, nous n'avons pas observé de différences dans les séquences des promoteurs de CR1 des sujets présentant les génotypes de densités différents : HH(~1000 CR1/E), HL (~500 CR1/E) et LL (~180 CR1/E).

Nous n'avons pas non plus observé de différences chez les sujets de phénotype « Hegelson » caractérisés par une densité faible de CR1/E (<150 sites).

Notre étude s'est concentrée sur l'analyse des promoteurs proximaux des gènes CR1 et CR1L de l'Homme et du Macaque rhésus.

Comme il a été montré pour plusieurs gènes (dont CR2), le premier intron semble être une zone critique dans la régulation génique. Il serait intéressant d'étendre notre étude à son niveau pour rechercher d'éventuels *enhancers* ou *silencers*.

Il semble par ailleurs préférable d'utiliser des cellules primaires et produisant naturellement CR1 plutôt que des cellules transformées car le processus de transformation peut altérer de manière significative l'activité transcriptionnelle du gène étudié [350]. L'évaluation de

l'activité de chaque promoteur pourrait être appréciée en cytométrie de flux, en mesurant la moyenne de fluorescence des cellules transfectées produisant la protéine DsRed.

CD46 et CR1L semblent avoir le même profil d'expression. En effet CD46 et CR1L sont absents de la surface érythrocytaire chez l'Homme mais présents chez le Macaque rhésus [351]. Il serait donc intéressant d'étudier le promoteur de CD46 en vue de déceler un mécanisme commun de régulation génique avec CR1L de Macaque rhésus.

## **V. Etude du dépôt de C4d érythrocytaire (EC4d) dans le rejet aigu humoral en transplantation rénale**

### **V.1. EC4d et caractéristiques de la population de transplantés rénaux étudiée**

On ne constate pas de différences de marquage EC4d liées à l'âge ou bien au sexe des patients. Les deux seuls paramètres cliniques pré greffe, parmi les critères recensés, influençant de manière significative le niveau de EC4d étaient le rang de transplantation et la néphropathie causale lupique ou non lupique.

On retrouve une corrélation entre le rang de transplantation et le EC4d : plus le nombre de transplantations est élevé plus le patient a un risque de EC4d élevé post-greffe. Dans le cas d'une patiente de la cohorte greffée pour la cinquième fois à l'âge de 35 ans dont sa néphropathie causale était un Syndrome Hémolytique et Urémique ayant conduit à l'insuffisance rénale chronique dans l'enfance, nous avons observé une évolution post-greffe tout à fait satisfaisante jusqu'au troisième mois de greffe. Au delà, la fonction rénale s'est légèrement dégradée sans cause évidente avec une créatinémie passant de 65 à 95  $\mu\text{mol/L}$ , la biopsie du greffon a révélé la présence d'une légère capillarite glomérulaire (g1) et intertubulaire associée à un marquage HC4d positif de manière diffuse. Le EC4d était légèrement au dessus de notre seuil de 105%. Cette double positivité C4d est en fait difficile à interpréter dans ce cas précis étant donné qu'elle peut correspondre à plusieurs cas de figure : activité de rejet médiée par des anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes du greffon, simple accommodation immunologique étant donné que la fonction rénale n'est que modérément dégradée ou bien encore dérégulation du système inhibiteur du complément du fait de la présence d'un anticorps dirigé contre le facteur H du complément chez cette patiente. Nous n'avons pu disposer pour l'ensemble des patients du taux d'immunisation des patients

avant greffe. Ce paramètre (PRA) bien corrélé à une augmentation du risque de rejet aigu humoral sera intéressant à confronter au marquage EC4d.

Pour ce qui est de l'influence de la néphropathie causale, la cohorte comportait quatre patients lupiques connus. Il s'agissait de quatre femmes, trois sur quatre avaient des valeurs EC4d au-dessus du seuil de 105%. Ce rapport de positif/négatif est statistiquement différent entre lupiques et non lupiques ( $p=0,02$ ). Il peut s'agir ici d'une positivité liée à l'activité résiduelle de la maladie lupique puisque les maladies à complexes immuns, nous l'avons vu précédemment, augmentent très nettement le dépôt de C4d à la surface érythrocytaire. Ceci a été clairement démontré par l'équipe de JM Ahearn en corrélant le niveau de dépôt EC4d aux scores d'activité de la maladie lupique [21,22]. Nous avons retrouvé des résultats similaires concernant les 16 patients lupiques non transplantés représentés sur la figure 60 (page 164) au chapitre «Résultats». En effet les quatre patientes les plus élevées parmi ces 16, correspondaient à des maladies lupiques sévères hospitalisées pour traitement par cyclophosphamide. Au sein de la cohorte globale des 306 patients transplantés cette fois-ci, analysés en EC4d, la tendance à l'augmentation dans la population lupique est confirmée pour 9 patientes sur 12.

## **V.2. EC4d, HC4d et rejet aigu humoral en transplantation rénale**

Le résultat principal de notre étude, novateur et jamais décrit à ce jour, est l'existence d'une relation positive et forte entre le marquage C4d érythrocytaire et le marquage C4d diffus des capillaires péri-tubulaires du greffon rénal, ce dernier étant le critère considéré aujourd'hui comme le plus important pour le diagnostic de rejet aigu humoral.

### **V.2.1. Comparaison EC4d et HC4d**

La concordance entre EC4d et HC4d est de 83/101 biopsies. Le EC4d a une sensibilité de 67% pour détecter un marquage diffus C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires, une spécificité de 85%, une valeur prédictive positive de 44% et une valeur prédictive négative de 94%. Cette sensibilité imparfaite est largement améliorée si l'on ne considère que les rejets humoraux survenant la première année de greffe. En effet avec un effectif conséquent comprenant 83 biopsies réalisées durant la première année de greffe, la sensibilité du EC4d pour le HC4d passe à 80%, avec une spécificité de 85%, une VPP de 42% et une excellente

VPN de 97%. L'immense majorité des rejets aigus humoraux survenant durant les premiers mois de greffe, il est tout à fait légitime de retenir ces valeurs pour ce test [352].

### **V.2.2. Analyse des cas discordants EC4d/HC4d**

Les caractéristiques cliniques des patients EC4d+/HC4d- sont détaillées ci-dessous dans le tableau 30, page 191. Il s'agit de 13 prélèvements EC4d correspondant à 13 biopsies concomitantes réalisées auprès de 11 patients. On peut clairement noter pour plus d'un tiers de ces patients (4/11), la présence de lésions d'artérite avec un score de vasculite v de Banff coté à 1 pour moitié de l'effectif et à 2 pour l'autre moitié. Même si dans notre série, l'incidence de HC4d positif n'est pas significativement plus élevée dans la catégorie « rejet vasculaire », il n'en reste pas moins que l'artérite constitue un des critères de microscopie optique qui doit faire rechercher de manière systématique d'autres marqueurs de rejet aigu humoral. Ces quatre patients A, B, C et D peuvent donc tout à fait correspondre à des faux négatifs histologiques HC4d détectés par le EC4d. Ceci est d'autant plus vrai qu'il existe d'autres signes histologiques en microscopie optique pouvant évoquer le caractère humoral : tous présentent des signes de capillarite glomérulaire et péritubulaire.

L'incidence de l'artérite dans le rejet aigu humoral est en fait très variable d'une étude à une autre, la plupart des études retrouvent une incidence de l'ordre de 25% [353]. Dans notre série, deux biopsies, correspondant à deux patients distincts, sur les 15 HC4d positifs présentaient des signes d'artérite ce qui représente 13,5%.

La patiente I est hautement suspecte de rejet aigu humoral tardif EC4d positif et HC4d négatif. En effet cette patiente, à plus de 5 ans de sa troisième greffe, arrête son traitement immunosuppresseur et présente une insuffisance rénale aiguë majeure nécessitant une épuration extra-rénale. La biopsie révèle des lésions de rejet aigu cellulaire Ib caractérisées par la prédominance de plasmocytes et une intense capillarite. Au vu de ces résultats la négativité du C4d sur les capillaires est difficile à interpréter, ce d'autant plus que la patiente immunisée après deux greffes et n'ayant pas de spécificités partagées entre les deux précédents greffons et le greffon actuel a présenté des anticorps anti-HLA spécifiquement dirigés contre les molécules HLA de classe II de son troisième donneur.

Les patients E et F peuvent correspondre à des faux positifs EC4d bien que leurs biopsies révèlent des lésions de capillarite et de glomérulite.

	Sexe	Lieu	Age (ans)	Délai BR (jours)	n greffe	NP causale	Rens. cliniques	Capillaires Dilatés	g	i	t	v	Banff	Ratio EC4d MFC%
<b>Patient A</b>	F	Lyon	26	35	2	HSF	IRA anurique	OUI	1	3	2	2	2 B	107,74
<b>Patient B</b>	M	Necker	52	9	1	NAS	IRA	OUI	3	2	3	1	2 A	111,34
<b>Patient B</b>	M	Necker	52	64	1	NAS	IRA	OUI	0	0	0	0	NS	144,41
<b>Patient C</b>	F	Necker	40	10	1	LED	IRA	OUI	1	1	2	1	2 A	115,96
<b>Patient C</b>	F	Necker	40	28	1	LED	IRA	NON	0	0	0	0	NS	110,68
<b>Patient D</b>	M	Lyon	25	32	1	Indéterminée	IRA	OUI	3	3	1	2	2 B	114,39
<b>Patient E</b>	F	Necker	67	360	1	PKR	Protéinurie	OUI	3	1	1	0	BL	107,21
<b>Patient F</b>	F	Necker	57	24	1	NTIC	IRA	OUI	1	0	0	0	NS	124,32
<b>Patient G</b>	F	Necker	25	14	1	Uropathie	Immunoallergie	NON	0	0	0	0	NS	107,26
<b>Patient H</b>	F	Necker	69	58	1	Amylose AA	Immunoallergie	NON	0	1	0	0	NS	143,12
<b>Patient I</b>	F	Necker	30	2088	3	Néphroblastome	IRA + DSA Arrêt traitement	OUI	3	3	3	0	1 B	171,47
<b>Patient J</b>	F	Necker	26	739	1	Oxalose	Pneumopathie	OUI	0	2	2	0	1 A	128,65
<b>Patient K</b>	F	Reims	59	14	1	NAS	IRA	NON	0	0	0	0	NS	105,10

**Tableau 30 : Caractéristiques cliniques et histologiques des 11 patients discordants EC4d + HC4d-. (NS = non spécifique ; HSF : hyalinose segmentaire focale ; NAS : néphroangiosclérose ; LED : lupus érythémateux disséminé ; PKR : polykystose rénale ; NTIC : néphropathie tubulo interstitielle chronique ; IRA : insuffisance rénale aiguë) ; DSA(anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes du donneur) ; g : glomérulite ; i : interstitiel ; t : tubulite ; v : vasculite.**

Les patientes G et H ont présenté une manifestation immunoallergique précoce après transplantation. Comme nous l'avons vu précédemment l'immunoallergie est une cause d'augmentation du dépôt de EC4d. La patiente G a présenté une urticaire associée à une hyperéosinophilie, la cause incriminée a été la prophylaxie par Bactrim®. La seconde a présenté une manifestation urticarienne similaire secondaire à un traitement par Amoxicilline®. Le EC4d positif pour ces deux patientes et discordant avec le marquage C4d des capillaires péri-tubulaires correspond donc probablement à l'activation du complément dans un contexte immuno-allergique.

Nous n'avons pas retrouvé d'explication évidente à l'élévation du EC4d pour la patiente J âgée de 26 ans et greffée rénale pour une oxalose primitive. La biopsie rénale chez cette patiente a été réalisée dans un contexte de dégradation subaiguë de la fonction rénale et de pneumopathie aiguë.

Enfin la patiente K avait un EC4d à la limite de la positivité avec une valeur de 105,1%, ceci au quatorzième jour de sa première transplantation rénale.

Les caractéristiques cliniques des patients EC4d+/HC4d- sont détaillées ci-dessous dans le tableau 31:

	Sexe	Lieu	Age (ans)	Délai BR (Jours)	n greffe	NP causale	Rens. cliniques	Cap Dilatés	g	i	t	v	Banff	Ratio EC4d MFC%
Patient A'	F	Lyon	34	883	1	GNMP	IRA	NON	0	1	1	0	BL	89,59
Patient B'	M	Necker	34	148	4	PKRAR	RA Humoral traité	OUI	1	0	0	0	NS	88,40
Patient C'	M	Reims	60	3228	1	PKR	IRA et DSA	NON	0	0	0	0	NS	84,30
Patient D'	M	Reims	25	9	2	GNMP	IRA	NON	0	0	0	0	NS	69,48
Patient E'	M	Lyon	35	736	2	HSF	IRA	NON	0	3	3	0	1 B	96,83

**Tableau 31 : Caractéristiques cliniques et histologiques des 5 patients discordants EC4d négatifs HC4d positifs.**

(BR : biopsie rénale ; NP : néphropathie causale ; Cap : capillaire ; GNMP : glomérulonéphrite membrano proliférative ; PKRAR : polykystose rénale autosomique récessive ; PKR : polykystose rénale ; HSF : hyalinose segmentaire focale, RA : rejet humoral ; IRA : insuffisance rénale aiguë ; DSA : anticorps spécifiquement dirigés contre des antigènes du donneur ; g : glomérulite ; i : interstitiel ; t : tubulite ; v : vasculite.

Deux éléments nous interpellent à la lecture du tableau 31, détaillant les cas de HC4d positifs associés à un EC4d contemporain négatif.

- Le premier est que le patient B' était HC4d + EC4d + lors d'un prélèvement antérieur, réalisé à J68 de sa quatrième greffe. Le EC4d s'est donc négativé alors que le HC4d est resté positif à J148. Chez ce patient, entre J68 et J148, le marquage érythrocytaire a baissé de manière concomitante à la régression des lésions aiguës constatées en histologie standard (régression des lésions de glomérulite, de tubulite et de l'infiltrat interstitiel inflammatoire).
- Le second est qu'aucun des quatre autres patients ne présente de lésions nettes de glomérulite, de capillarite, d'artérite, de micro thromboses ou de suffusions hémorragiques. La microscopie optique est donc *pauci* lésionnelle chez ces patients. Par ailleurs trois patients sur les quatre précités ont été biopsiés à plus de deux ans et demi de greffe avec même pour le patient C', une biopsie réalisée à 10 ans de greffe. On peut donc se demander dans ces trois cas de positivité tardive, si le dépôt de C4d

au niveau des capillaires péri-tubulaires n'est pas le témoin d'un rejet humoral chronique plutôt qu'aigu.

### **V.2.3. EC4d, nature de l'infiltrat cellulaire et perte de greffon**

Il est établi qu'un rejet aigu comportant un infiltrat inflammatoire comportant une population monocyto-macrophagique correspond à un pronostic péjoratif et est plus volontiers lié à une alloréactivité humorale avec positivité HC4d [46, 354-357]. Dans notre série, trois biopsies sur les 146 réalisées, correspondant à trois patients distincts biopsiés pour des dysfonctions précoces de leur greffon, comportaient des lésions de glomérulite avec un infiltrat constitué de cellules de la lignée monocyttaire-macrophagique. Le EC4d contemporain de ces trois biopsies était anormalement élevé et dépassait notre seuil de 105%. Le HC4d était concordant dans deux cas sur trois. Il est donc possible qu'il s'agisse ici d'un autre cas de HC4d faussement négatif.

Il est décrit par ailleurs que l'infiltrat du greffon par des plasmocytes correspond également à des situations peu favorables pour la survie du greffon et fait très fortement suspecter l'implication d'anticorps dirigés contre le greffon, produits naturels de ces plasmocytes [358]. Or une seule biopsie sur les 146 comportait un fibro-œdème associé à un infiltrat plasmocytaire, il s'agit de la patiente I dont l'histoire a été détaillée précédemment. Nous rappellerons simplement qu'il s'agissait d'une patiente avec un EC4d très positif et un HC4d négatif, constituant donc très certainement un cas de HC4d faussement négatif identifié en EC4d.

Par ailleurs, si l'on s'intéresse aux pertes rapides de greffon survenant sur la courte période d'observation de l'étude, nous en dénombrons quatre, deux consécutivement à une mauvaise observance du traitement immunosuppresseur (la patiente I détaillée précédemment et une patiente ayant arrêté son traitement après 10 années de greffe avec pour conséquence un rejet aigu (EC4d +HC4d +) ; une troisième patiente immunisée à plus de 70% en classe I et greffée pour la deuxième fois a présenté un rejet aigu « vasculaire » majeur après 10 jours de greffe, la première biopsie ne comportait pas de fragment analysable en immunofluorescence et le EC4d réalisé deux jours avant la biopsie était à 140%. Malgré un très lourd traitement immunosuppresseur anti-Lymphocytes B, la fonction du greffon ne récupère pas, la patiente est biopsiée pour la deuxième fois à J35, elle révèle la persistance des lésions de capillarite

glomérulaire et inter tubulaire et le HC4d est positif focalement sur 30% des capillaires péri-tubulaires, le Ratio EC4d MFC est à ce moment de 107,5%. Enfin la quatrième perte de greffon correspondait à une patiente qui a présenté un rejet aigu après six années de greffe de grade 1B, HC4d négatif et EC4d négatif mais avec présence d'anticorps anti-HLA spécifiquement dirigés contre le greffon. Au total, parmi ces 4 pertes de greffon on dénombre deux patients EC4d + HC4d -, un patient EC4d + HC4d + et un patient EC4d – HC4d -.

Parmi l'ensemble des 146 biopsies deux comportaient un rejet aigu de grade III de Banff. Leur marquage C4d était : HC4d négatif et EC4d négatif. Cela nous fait penser que les rejets présentant des lésions vasculaires cataclysmiques, analogues aux rejets des greffes ABO incompatibles, ne comportent pas ou peu de dépôt de C4d que ce soit au niveau rénal ou bien au niveau érythrocytaire. Les résultats à ce niveau sont contradictoires avec ceux décrits dans la littérature [359,360].

#### **V.2.4. Limites et biais de cette étude**

Le principal biais de l'étude est probablement la multiplicité des observateurs des paramètres histologiques. S'agissant d'une étude multicentrique l'idéal serait de procéder à une double lecture à l'aveugle des lames. Par contre, les marquages EC4d et la lecture en cytométrie de flux étaient réalisés sans connaissance de l'histoire clinique et uniquement au laboratoire.

Les différences de signaux observés en cytométrie de flux entre érythrocytes considérés comme fortement marqués et érythrocytes considérés comme faiblement marqués sont relativement faibles. Toutefois la sensibilité et la reproductibilité de notre immunomarquage permettent de retenir ces faibles différences comme significatives.

Le seuil de 105% a été défini arbitrairement compte tenu des valeurs EC4d retrouvées dans la population générale. Le seuil pour le meilleur compromis de sensibilité et de spécificité devra être déterminé avec l'aide de courbes ROC.

### **V.3. Physiopathologie du EC4d et du HC4d**

#### **V.3.1. C4d plasmatique et C4d érythrocytaire**

Il semble que l'on puisse détecter du C4d sérique à une concentration 30 fois plus importante que celle estimée à la surface des globules rouges. (1000 µg/L dans le sérum pour 33 µg/L estimés pour un sujet normal à la surface du globule rouge). Une seule étude a analysé le C4d sérique en transplantation [361]. Les transplantés cardiaques ont été prélevés dans la période initiale de greffe afin de mesurer le taux de C4d sérique. Il n'y avait pas de différence significative entre le niveau de C4d sérique et l'incidence ou non d'un rejet aigu sur la biopsie endomyocardique. Chez l'ensemble de ces greffés cardiaques, on a constaté une augmentation du C4d sérique par rapport au niveau de la population saine.

L'étude du C4d sérique en transplantation rénale semble difficile à interpréter compte tenu de la baisse de la filtration glomérulaire et de la clairance des petites protéines, facteurs pouvant être indépendants du rejet et faire varier les taux de C4d sérique.

#### **V.3.2. Hypothèses physiopathologiques de dépôt de EC4d dans le RAH**

L'hypothèse avancée pour expliquer le dépôt de HC4d au niveau des capillaires péritubulaires est une activation de la voie classique du complément par des anticorps dirigés contre des antigènes exprimés à la surface des cellules endothéliales. Or des données récentes ultra structurales indiquent que les dépôts de C4d, de même que de C3d et d'éléments du complexe d'attaque membranaire ne se trouvent pas au niveau des cellules endothéliales mais au niveau de la membrane basale située sous l'endothélium [362]. Il semble que des immunoglobulines se localisent dans les mêmes zones pour tous les patients étudiés. Cependant les études en immunofluorescence ne retrouvent que rarement des immunoglobulines ou même d'autres fractions du complément sur les biopsies de rejet aigu humoral caricatural. Ceci pose les questions suivantes : quelles sont les cibles possibles ? Par quelle voie ces cibles activent le complément ?

Les globules rouges n'expriment pas les molécules HLA de classe I ou de classe II. Il est alors difficile d'imaginer que des anticorps anti-HLA activent le C4 circulant directement à la surface du globule rouge. On peut tout à fait imaginer une dérégulation systémique du complément qui augmenterait le « tick over » basal chez tout individu [363,364]. Ce

phénomène est décrit pour le C3. En effet, on retrouve de manière physiologique du C3d à la surface des globules rouges des sujets normaux [365-367]. Ce dépôt est augmenté dans certaines conditions pathologiques comme les anémies hémolytiques auto-immunes [368]. Walport *et al.* évaluent en moyenne le dépôt de C4d érythrocytaire à 200 molécules chez les sujets normaux et à 1800 molécules chez les lupiques [369]. En fonction de ces travaux et dans l'attente de nos résultats de RIA (*Radio immuno assay*), nous évaluons le dépôt de C4d érythrocytaire chez les transplantés rénaux à 500 molécules en moyenne.

On peut aussi envisager que les érythrocytes circulant dans le greffon au moment où se produisent les mécanismes inflammatoires lors de l'épisode de rejet, fixent du C4d par un effet spectateur « *bystander* ». Des expériences *in vitro* sont en cours au laboratoire en vue de démontrer la possibilité d'un tel phénomène.

### V.3.3. Hypothèses physiopathologiques de dépôt de EC4d *in vitro*

Ce mécanisme est dépendant des IgG et conduit à la production de dépôt de C4d.

Nous suggérons que le tampon hypersucré conduit à une agglutination des érythrocytes par une fixation non spécifique d'anticorps, ce qui conduit à l'activation partielle de la voie classique du complément jusqu'à l'étape du clivage de C4.

Nos observations au cours de la manipulation étayent cette hypothèse. En effet nous constatons effectivement l'agglutination, mais pas d'hémolyse ce qui montre qu'il n'y a pas de formation de complexe d'attaque membranaire.

Le dépôt E C4d *in vitro* pourrait aussi résulter d'un mécanisme analogue à celui décrit pour le C3 *in vivo* qui restant en veille, est capable de s'autoactiver. (boucle d'auto amplification).

Mais pourquoi autoactivation de la boucle de C4 sans autoactivation de C3 *in vitro*?

Nous émettons 2 hypothèses :

1) EC3b a été effectivement produit mais sa demi-vie est plus faible que celle de EC4d et il a été dégradé avant la manipulation d'immunomarquage des TEDA. Les TEDA sont conservés à 4°C au-delà d'un mois et ceux qui ont été utilisés avaient plus de 15 jours.

2) EC3b est totalement transformé en EC3d . Ce dernier n'est pas révélé par l'anticorps anti-C3b FITC employé qui reconnaît un épitope spécifique de C3b et absent de C3d.

L'emploi d'un anticorps anti-C3d s'impose donc au cours d'une prochaine manipulation et devrait nous éclairer à ce sujet. Afin de comparer les immunomarquages C3d et C4d entre

eux, nous utiliserons le même système de révélation amplifié (Streptavidine phycoérythrine) pour l'anti-C3d que celui utilisé pour l'anti-C4d. Nous espérons augmenter notre sensibilité de détection par rapport à l'anti-C3b (directement marqué FITC) et ainsi mieux discriminer les dépôts faibles de C3.

#### **V.4. Intérêt clinique potentiel du EC4d en transplantation**

Compte tenu de la relation positive entre EC4d et HC4d, particulièrement intéressante sur les biopsies réalisées la première année de greffe, l'utilisation du EC4d comme marqueur d'une activité humorale chez le transplanté rénal est tout à fait envisageable. Le rapport de concordance Kappa dérivé du test de Fisher est de 0,42 pour l'ensemble des biopsies soit une concordance modérée et de 0,47 lorsque la biopsie est réalisée avant un an.

Avec une valeur prédictive négative de 97% si l'indication de biopsie du greffon était posée dans le seul but de rechercher des signes de rejet aigu humoral, un EC4d négatif pourrait dissuader de réaliser cette biopsie.

## **CONCLUSIONS**

Nous avons montré que le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) exprime à la surface de ces érythrocytes un CR1 transmembranaire de « type humain » dont la taille, la densité et la distribution en bouquets sont comparables à celles observées pour le CR1 de l'Homme. Le Macaque rhésus exprime aussi une forme plus courte de « type singe » ou *CR1like* (CR1L), plus abondante (2 à 10 fois plus), plus diffuse et liée à la membrane plasmique par un ancrage glycophosphatidylinositol .

A l'aide d'une batterie d'anticorps monoclonaux, nous avons montré l'existence de polymorphismes allotypiques de CR1 de « type singe » et découvert une femelle Macaque rhésus dépourvue de CR1 de « type singe » érythrocytaire. Cette femelle au demeurant en bonne santé nous a permis de confirmer que le CR1 de « type humain » est exprimé avec la même densité et la même distribution en bouquets que chez l'Homme.

Chez onze espèces de primates de l'ancien monde et du nouveau monde, nous avons étudié les polymorphismes de la région S1<sup>a</sup> de CR1 impliquée dans les phénomènes d'adhérence inter-érythrocytaire entre les érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* et les érythrocytes sains humains. Nous avons découvert pour chaque espèce de primate l'existence de polymorphismes supplémentaires spécifiques , en plus de ceux déjà connus chez l'Homme comme antigènes de groupes sanguins de CR1 (Knops). Malgré la présence de ces polymorphismes autour de l'antigène S11 (S1<sup>a</sup>+), nous avons montré que les érythrocytes de Macaque rhésus formaient des rosettes avec des érythrocytes humains infectés par *Plasmodium falciparum*. Il semble donc que ces polymorphismes n'aient pas d'effet protecteur contre *Plasmodium falciparum*, du moins *in vitro*.

Nous avons séquencé les promoteurs des gènes CR1 et *CR1like* du Macaque rhésus et montré qu'ils pouvaient être actifs dans les lignées cellulaires 293T et CHO . L'analyse *in silico* des promoteurs des gènes CR1 et *CR1like* du Macaque rhésus et de l'Homme montre que les sites de liaison pour Ets et MZF1 sont conservés pour tous les promoteurs (CR1 et CR1L macaques et humains) ce qui conforte leur implication dans la régulation de ces gènes.

En revanche le site AML1 décrit dans la littérature comme régulant le gène CR1 humain est présent dans le promoteur du gène CR1 du Macaque rhésus mais absent du promoteur du gène CR1L macaque bien que CR1L macaque soit jusqu'à 10 fois plus exprimé. AML1 ne régule pas CR1L du Macaque rhésus ce qui minimise son implication dans la régulation du gène CR1 humain. D'autres facteurs ont été mis en évidence . HES 1 dont le site de liaison est proche du site d'initiation de la transcription pourrait réguler négativement CR1 macaque et

CR1L humain. De même LBP1 pourrait inhiber la synthèse de CR1L humain. Il nous faut donc poursuivre cette analyse en démontrant le rôle de ces facteurs. Pour cela, l'utilisation d'ARN interférant afin de bloquer l'action des facteurs de transcription dans des cellules produisant du CR1 est à envisager.

L'analyse de la région promotrice du gène *CR1like* humain a permis de mettre en évidence un polymorphisme allélique qui correspond à une délétion de 18 nucléotides (+47 à +64) chez certains sujets humains. Cette délétion n'entraîne ni d'apparition ni de perte de site de liaison pour un facteur de transcription.

L'étude du marquage C4d des érythrocytes des patients transplantés rénaux réalisé de manière concomitante à la biopsie du greffon rénal, auprès de 132 patients appartenant à trois centres distincts de transplantation français, révèle :

-l'existence d'une relation positive forte entre le marquage C4d érythrocytaire et le marquage diffus C4d des capillaires péri-tubulaires, concordant pour 83 des doubles marquages et discordant dans 18 cas. Le EC4d en tant que test sanguin pour le diagnostic de dépôts de C4d péri-tubulaires a une très bonne sensibilité et une très bonne spécificité (respectivement de 80 et 85%) avec une excellente valeur prédictive négative de 97%, lorsque le prélèvement est fait durant la première année de greffe.

-l'existence d'une relation positive forte entre le marquage C4d érythrocytaire et capillarite glomérulaire ou inter tubulaire, lésions retrouvées plus fréquemment dans le rejet aigu humoral que cellulaire.

Il semble donc au vu de ces résultats que le C4d érythrocytaire offre un intérêt certain pour le diagnostic et le suivi des rejets en transplantation rénale. Le mécanisme des dépôts de C4d reste à élucider. En effet, il ne semble ni faire intervenir l'activation de la voie classique du complément, ni les infiltrats cellulaires habituels.

# **PUBLICATION**

WAITUMBI JN, DONVITO B, KISSERLI A, COHEN JH, STOUTE JA.  
Age-related changes in red blood cell complement regulatory proteins and susceptibility to severe malaria. *J Infect Dis.* 2004 ; 190(6):1183-91.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Reynes M, Aubert JP, Cohen JH, Audouin J, Tricottet V, Diebold J et al. Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens. *J Immunol* 1985; 135(4):2687-94.
2. Cohen JH, Aubry JP, Revillard JP, Banchereau J, Kazatchkine MD. Human T lymphocytes expressing the C3b/C4b complement receptor type one (CR1, CD35) belong to Fc gamma receptor-positive CD4-positive T cells. *Cell Immunol* 1989; 121(2):383-90.
3. Cohen JH, Aubry JP, Jouvin MH, Wijdenes J, Bancherau J, Kazatchkine M et al. Enumeration of CR1 complement receptors on erythrocytes using a new method for detecting low density cell surface antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1987; 99(1):53-58.
4. Cohen JH, Geffriaud C, Caudwell V, Kazatchkine MD. Genetic analysis of CR1 (the C3b complement receptor, CD35) expression on erythrocytes of HIV-infected individuals. *AIDS* 1989; 3(6):397-99.
5. Cohen JH, Caudwell V, Levi-Strauss M, Bourgeois P, Kazatchkine MD. Genetic analysis of CR1 expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989; 32(4):393-97.
6. Cornillet P, Philbert F, Kazatchkine MD, Cohen JH. Genomic determination of the CR1 (CD35) density polymorphism on erythrocytes using polymerase chain reaction amplification and HINDIII restriction enzyme digestion. *J Immunol Methods* 1991; 136(2):193-97.
7. Cohen JH, Lutz HU, Pennaforte JL, Bouchard A, Kazatchkine MD. Peripheral catabolism of CR1 (the C3b receptor, CD35) on erythrocytes from healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1992; 87(3):422-28.
8. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344(15):1140-44.
9. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344(14):1058-66.
10. Murakami Y, Imamichi T, Nagasawa S. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. *Immunology* 1993; 79(4):633-38.
11. Kerepesi LA, Hess JA, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Complement component C3 is required for protective innate and adaptive immunity to larval *strongyloides stercoralis* in mice. *J Immunol* 2006; 176(7):4315-22.
12. Sacks SH, Chowdhury P, Zhou W. Role of the complement system in rejection. *Curr Opin Immunol* 2003; 15(5):487-92.
13. Atkinson JP. Origin of the Fourth Component of Complement Related Chido and Rodgers Blood Group Antigens. *Complement* 1988; (5):65-76.
14. Van Del Elsen JM, Martin A, Wong V, Clemenza L, Rose DR et al. X ray crystal structure of the C4d fragment of human complement component C4, *J Mol Biol* 2002; 322(5) 1103-15.

15. Ferreira A. The murine H-2.7 specificity is an antigenic determinant of C4d, a fragment of the fourth component of the complement system. *J Exp Med* 1980; 151(6):1424-35.
16. Tilley CA, Romans DG, Crookston MC. Localisation of Chido and Rodgers determinants to the C4d fragment of human C4. *Nature* 1978; 276(5689):713-15.
17. Chu VF, Marsh WL, Gigli I. Chido and Rogers antigenic determinant on the fourth component of human complement. *J Immunol* 1982; 128(1):181-85.
18. Freysdottir J, Sigfusson A. A flow cytometric assay for measuring complement receptor 1 (CR1) and the complement fragments C3d and C4d on erythrocytes. *J Immunol Methods* 1991; 142(1):45-52.
19. Leddy JP, Frank MM, Gaither T, Baum J and Klemperer MR. Hereditary deficiency of the sixth component of complement in man. I. Immunochemical, biologic, and family studies. *J Clin Invest* 1974; 53(2): 544-53.
20. Giles CM, Robson T. Immunoblotting human C4 bound to human erythrocytes in vivo and in vitro. *Clin Exp Immunol* 1991; 84(2):263-69.
21. Manzi S, Navratil JS, Ruffing MJ, Liu CC, Danchenko N, Nilson SE et al. Measurement of erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50(11):3596-04.
22. Manzi S, Ahearn JM, Salmon J. New insights into complement: a mediator of injury and marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13(5):298-03.
23. Liu CC, Manzi S, Kao AH, Navratil JS, Ruffing MJ, Ahearn JM. Reticulocytes bearing C4d as biomarkers of disease activity for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52(10):3087-99.
24. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991; 86(3):464-70.
25. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmüller G et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993; 43(6):1333-38.
26. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(10):2208-14.
27. Regele H, Böhmig GA, Habicht A, Gollowitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(9):2371-80.

28. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries -- the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant* 2003; 3(6):646-52.
29. Nickleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(1):242-51.
30. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int* 2001; 59(1):334-41.
31. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(1):234-41.
32. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11(6):609-18
33. Haas M, Ratner LE, Montgomery RA. C4d staining of perioperative renal transplant biopsies. *Transplantation* 2002; 74(5):711-17.
34. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3(6):708-14.
35. Makrides SC. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev* 1998; 50(1):59-87.
36. Pratt JR, Abe K, Miyazaki M, Zhou W, Sacks SH. In situ localization of C3 synthesis in experimental acute renal allograft rejection. *Am J Pathol* 2000; 157(3):825-31.
37. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2000; 105(10):1363-71.
38. Thurman JM, Royer PA, Ljubanovic D, Dursun B, Lenderink AM, Edelstein CL et al. Treatment with an inhibitory monoclonal antibody to mouse factor B protects mice from induction of apoptosis and renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(3):707-15.
39. Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation* 2001; 104(12):1413-18.
40. Jeannot M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med* 1970; 282(3):111-17.
41. Karakoz I, Hasek M, Kohoutova L. The role of bursa of Fabricius and thymus in antibody-mediated allograft rejection in ducks. *Folia Biol (Praha)* 1976; 22(5):304-11.
42. Danovitch GM. *Handbook of Kidney Transplantation*. Philadelphia: Lippincott and William; 2005

43. Bohmig G, Regele H. Diagnosis and treatment of antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int* 2003; 16(11):773-87.
44. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3(6):708-14.
45. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(3):779-87.
46. Magil AB. Infiltrating cell types in transplant glomerulitis: relationship to peritubular capillary C4d deposition. *Am J Kidney Dis* 2005; 45(6):1084-89.
47. Fogo AKM. Renal Transplantation. In: Saunders E, (ed). *Diagnostic Atlas of Renal Pathology*, 2005: 399-410.
48. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991; 86(3):464-70.
49. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993; 43(6):1333-38.
50. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation* 1990; 49(1):85-91.
51. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int* 2001; 59(1):334-341.
52. Birmingham DJ. Erythrocyte complement receptors. *Crit Rev Immunol* 1995; 15(2):133-54.
53. Fearon DT. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *J Exp Med* 1980; 152(1):20-30.
54. Ross GD, Winchester RJ, Rabellino EM, Hoffman T. Surface markers of complement receptor lymphocytes. *J Clin Invest* 1978; 62(5):1086-92.
55. Gasque P, Chan P, Mauger C, Schouft MT, Singhrao S, Dierich MP et al. Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *J Immunol* 1996; 156(6):2247-55.

56. Delibrias CC, Mouhoub A, Fischer E, Kazatchkine MD. CR1(CD35) and CR2(CD21) complement C3 receptors are expressed on normal human thymocytes and mediate infection of thymocytes with opsonized human immunodeficiency virus. *Eur J Immunol* 1994; 24(11):2784-88.
57. Rodgaard A, Christensen LD, Thomsen BS, Wiik A, Bendixen G. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression on peripheral T lymphocytes: both CD4- and CD8-positive cells express CR1. *Complement Inflamm* 1991; 8(5-6):303-09.
58. Wilson JG, Tedder TF, Fearon DT. Characterization of human T lymphocytes that express the C3b receptor. *J Immunol* 1983; 131(2):684-89.
59. Langeggen H, Berge KE, Johnson E, Hetland G. Human umbilical vein endothelial cells express complement receptor 1 (CD35) and complement receptor 4 (CD11c/CD18) in vitro. *Inflammation* 2002; 26(3):103-10.
60. Dykman TR, Hatch JA, Aqua MS, Atkinson JP. Polymorphism of the C3b/C4b receptor (CR1): characterization of a fourth allele. *J Immunol* 1985; 134(3):1787-89.
61. Wong WW, Wilson JG, Fearon DT. Genetic regulation of a structural polymorphism of human C3b receptor. *J Clin Invest* 1983; 72(2):685-93.
62. Dykman TR, Hatch JA, Atkinson JP. Polymorphism of the human C3b/C4b receptor. Identification of a third allele and analysis of receptor phenotypes in families and patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1984; 159(3):691-03.
63. Lublin DM, Griffith RC, Atkinson JP. Influence of glycosylation on allelic and cell-specific mr variation, receptor processing, and ligand binding of the human complement C3b/C4b receptor. *J Biol Chem* 1986; 261(13):5736-44.
64. Klickstein LB, Wong WW, Smith JA, Weis JH, Wilson JG, Fearon DT. Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins. *J Exp Med* 1987; 165(4):1095-12.
65. McLure CA, Dawkins RL, Williamson JF, Davies RA, Berry J, Natalie LJ et al. Amino acid patterns within short consensus repeats define conserved duplicons shared by genes of the RCA complex. *J Mol Evol* 2004; 59(2):143-57.
66. Barlow PN, Baron M, Norman DG, Day AJ, Willis AC, Sim RB et al. Secondary structure of a complement control protein module by two-dimensional 1H NMR. *Biochemistry* 1991; 30(4):997-04.
67. Wong WW, Kennedy CA, Bonaccio ET, Wilson JG, Klickstein LB, Weis JH et al. Analysis of multiple restriction fragment length polymorphisms of the gene for the human complement receptor type 1. Duplication of genomic sequences occurs in association with a high molecular mass receptor allotype. *J Exp Med* 1986; 164(5):1531-46.

68. Holers VM, Chaplin DD, Leykam JF, Gruner BA, Kumar V, Atkinson JP. Human complement C3b/C4b receptor (CR1) mRNA polymorphism that correlates with the CR1 allelic molecular weight polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(8):2459-63.
69. Changelian PS, Fearon DT. Tissue-specific phosphorylation of complement receptors CR1 and CR2. *J Exp Med* 1986; 163(1):101-15.
70. Xiang L, Rundles JR, Hamilton DR, Wilson JG. Quantitative alleles of CR1: coding sequence analysis and comparison of haplotypes in two ethnic groups. *J Immunol* 1999; 163(9):4939-45.
71. Birmingham DJ, Irshaid F, Gavit KF, Nagaraja HN, Yu CY, Rovin BH et al. A polymorphism in the type one complement receptor (CR1) involves an additional cysteine within the C3b/C4b binding domain that inhibits ligand binding. *Mol Immunol* 2007; 44(14):3510-16.
72. Birmingham DJ, Chen W, Liang G, Schmitt HC, Gavit K, Nagaraja HN. A CR1 polymorphism associated with constitutive erythrocyte CR1 levels affects binding to C4b but not C3b. *Immunology* 2003; 108(4):531-38.
73. Moulds JM, Zimmerman PA, Doumbo OK, Kassambara L, Sagara I, Diallo DA et al. Molecular identification of Knops blood group polymorphisms found in long homologous region D of complement receptor 1. *Blood* 2001; 97(9):2879-85.
74. Covas DT, de Oliveira FS, Rodrigues ES, Abe-Sandes K, Silva WA Jr, Fontes AM. Knops blood group haplotypes among distinct Brazilian populations. *Transfusion* 2007; 47(1):147-53.
75. Moulds JM, Zimmerman PA, Doumbo OK, Diallo DA, Atkinson JP, Krych-Goldberg M et al. Expansion of the Knops blood group system and subdivision of SI(a). *Transfusion* 2002; 42(2):251-56.
76. Wong WW, Cahill JM, Rosen MD, Kennedy CA, Bonaccio ET, Morris MJ et al. Structure of the human CR1 gene. Molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. *J Exp Med* 1989; 169(3):847-63.
77. Vik DP, Wong WW. Structure of the gene for the F allele of complement receptor type 1 and sequence of the coding region unique to the S allele. *J Immunol* 1993; 151(11):6214-24.
78. Hourcade D, Miesner DR, Bee C, Zeldes W, Atkinson JP. Duplication and divergence of the amino-terminal coding region of the complement receptor 1 (CR1) gene. An example of concerted (horizontal) evolution within a gene. *J Biol Chem* 1990; 265(2):974-80.
79. Hourcade D, Miesner DR, Atkinson JP, Holers VM. Identification of an alternative polyadenylation site in the human C3b/C4b receptor (complement receptor type 1) transcriptional unit and prediction of a secreted form of complement receptor type 1. *J Exp Med* 1988; 168(4):1255-70.

80. Logar CM, Chen W, Schmitt H, Yu CY, Birmingham DJ. A human CR1-like transcript containing sequence for a binding protein for iC4 is expressed in hematopoietic and fetal lymphoid tissue. *Mol Immunol* 2004; 40(11):831-40.
81. McLure CA, Williamson JF, Stewart BJ, Keating PJ, Dawkins RL. Genomic analysis reveals a duplication of eight rather than seven short consensus repeats in primate CR1 and CR1L: evidence for an additional set shared between CR1 and CR2. *Immunogenetics* 2004; 56(9):631-38
82. McLure CA, Williamson JF, Stewart BJ, Keating PJ, Dawkins RL. Indels and imperfect duplication have driven the evolution of human Complement Receptor 1 (CR1) and CR1-like from their precursor CR1 alpha: importance of functional sets. *Hum Immunol* 2005; 66(3):258-73.
83. Rodriguez de Cordoba S, Dykman TR, Ginsberg-Fellner F, Ercilla G, Aqua M, Atkinson JP et al. Evidence for linkage between the loci coding for the binding protein for the fourth component of human complement (C4BP) and for the C3b/C4b receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(24):7890-92.
84. Rodriguez de Cordoba S, Lublin DM, Rubinstein P, Atkinson JP. Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *J Exp Med* 1985; 161(5):1189-95.
85. Weis JH, Morton CC, Bruns GA, Weis JJ, Klickstein LB, Wong WW et al. A complement receptor locus: genes encoding C3b/C4b receptor and C3d/Epstein-Barr virus receptor map to 1 q32. *J Immunol* 1987; 138(1):312-15.
86. Rey-Campos J, Rubinstein P, Rodriguez de Cordoba S. Decay-accelerating factor. Genetic polymorphism and linkage to the RCA (regulator of complement activation) gene cluster in humans. *J Exp Med* 1987; 166(1):246-52.
87. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:431-55.
88. Rey-Campos J, Rubinstein P, Rodriguez de Cordoba S. A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *J Exp Med* 1988; 167(2):664-69.
89. Carroll MC, Alicot EM, Katzman PJ, Klickstein LB, Smith JA, Fearon DT. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. *J Exp Med* 1988; 167(4):1271-80.
90. Pangburn MK. Differences between the binding sites of the complement regulatory proteins DAF, CR1, and factor H on C3 convertases. *J Immunol* 1986; 136(6):2216-21.
91. Arnaout MA, Melamed J, Tack BF, Colten HR. Characterization of the human complement (C3b) receptor with a fluid phase C3b dimer. *J Immunol* 1981; 127(4):1348-54.

92. Reilly BD, Makrides SC, Ford PJ, Marsh HCJr, Mold C. Quantitative analysis of C4b dimer binding to distinct sites on the C3b/C4b receptor (CR1). *J Biol Chem* 1994; 269(10):7696-01.
93. Ross GD, Newman SL, Lambris JD, Devery-Pocius JE, Cain JA, Lachmann PJ. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum II. Location of binding sites in the C3 fragments for factors B and H, complement receptors, and bovine conglutinin. *J Exp Med* 1983; 158(2):334-52.
94. Klickstein LB, Bartow TJ, Miletic V, Rabson LD, Smith JA, Fearon DT. Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. *J Exp Med* 1988; 168(5):1699-17.
95. Krych M, Hourcade D, Atkinson JP. Sites within the complement C3b/C4b receptor important for the specificity of ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(10):4353-57.
96. Taniguchi-Sidle A, Isenman DE. Interactions of human complement component C3 with factor B and with complement receptors type 1 (CR1, CD35) and type 3 (CR3, CD11b/CD18) involve an acidic sequence at the N-terminus of C3 alpha'-chain. *J Immunol* 1994; 153(11):5285-02.
97. Lambris JD, Lao Z, Oglesby TJ, Atkinson JP, Hack CE, Becherer JD. Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor b binding and functional sites in the third complement component. *J Immunol* 1996; 156(12):4821-32.
98. Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B. Phosphorylation of C3 by a casein kinase released from activated human platelets increases opsonization of immune complexes and binding to complement receptor type 1. *Eur J Immunol* 2001; 31(4):1047-54.
99. Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1(CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* 1997; 7(3):345-55.
100. Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med* 2000; 192(12):1797-08.
101. Tas SW, Klickstein LB, Barbashov SF, Nicholson-Weller A. C1q and C4b bind simultaneously to CR1 and additively support erythrocyte adhesion. *J Immunol* 1999; 163(9):5056-63.
102. Iida KNV. Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade. *J Exp Med* 1981; 153(5):1138-50.
103. Masaki T, Matsumoto M, Nakanishi I, Yasuda R, Seya T. Factor I-dependent inactivation of human complement C4b of the classical pathway by C3b/C4b receptor (CR1, CD35) and membrane cofactor protein (MCP, CD46). *J Biochem* 1992; 111(5):573-78.

104. Medof ME, Iida K, Mold C, Nussenzweig V. Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med* 1982; 156(6):1739-54.
105. Krych-Goldberg M, Hauhart RE, Subramanian VB, Yurcisin BM 2nd, Crimmins DL, Hourcade DE et al. Decay accelerating activity of complement receptor type 1 (CD35). Two active sites are required for dissociating C5 convertases. *J Biol Chem* 1999; 274(44):31160-68.
106. Klickstein LB, Bartow TJ, Miletic V, Rabson LD, Smith JA, Fearon DT. Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1, CD35) by deletion mutagenesis. *J Exp Med* 1988; 168(5):1699-17.
107. Makrides SC, Scesney SM, Ford PJ, Evans KS, Carson GR, Marsh HC Jr. Cell surface expression of the C3b/C4b receptor (CR1) protects Chinese hamster ovary cells from lysis by human complement. *J Biol Chem* 1992; 267(34):24754-61.
108. Krych M, Clemenza L, Howdeshell D, Hauhart R, Hourcade D, Atkinson JP. Analysis of the functional domains of complement receptor type 1 (C3b/C4b receptor; CD35) by substitution mutagenesis. *J Biol Chem* 1994; 269(18):13273-78.
109. Kalli KR, Hsu PH, Bartow TJ, Ahearn JM, Matsumoto AK, Klickstein LB et al. Mapping of the C3b-binding site of CR1 and construction of a (CR1)<sub>2</sub>-F(ab')<sub>2</sub> chimeric complement inhibitor. *J Exp Med* 1991; 174(6):1451-60.
110. Krych-Goldberg M, Hauhart RE, Porzukowiak T, Atkinson JP. Synergy between two active sites of human complement receptor type 1 (CD35) in complement regulation: implications for the structure of the classical pathway C3 convertase and generation of more potent inhibitors. *J Immunol* 2005; 175(7):4528-35.
111. Hourcade D, Liszewski MK, Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Functional domains, structural variations and pathogen interactions of MCP, DAF and CR1. *Immunopharmacology* 2000; 49(1-2):103-16.
112. Minota S, Terai C, Nojima Y, Takano K, Takai E, Miyakawa Y et al. Low C3b receptor reactivity on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus detected by immune adherence hemagglutination and radioimmunoassays with monoclonal antibody. *Arthritis Rheum* 1984; 27(12):1329-35.
113. Miyakawa Y, Yamada A, Kosaka K, Tsuda F, Kosugi E, Mayumi M. Defective immune-adherence (C3b) receptor on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1981; 2(8245):493-97.
114. Iida K, Mornaghi R, Nussenzweig V. Complement receptor (CR1) deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1982; 155(5):1427-38.
115. Tao K, Nicholls K, Rockman S, Kincaid-Smith P. Expression of complement 3 receptors (CR1 and CR3) on neutrophils and erythrocytes in patients with iga nephropathy. *Clin Nephrol* 1989; 32(5):203-08.

116. Quadri RA, Schifferli JA. Over-estimation of the number of complement receptor type 1 (CR1) on erythrocytes. *Scand J Immunol* 1992; 36(1):125-30.
117. Nickells M, Hauhart R, Krych M, Subramanian VB, Geoghegan-Barek K, Marsh HC Jr et al. Mapping epitopes for 20 monoclonal antibodies to CR1. *Clin Exp Immunol* 1998; 112(1):27-33.
118. Chen CH, Ghiran I, Beurskens FJ, Weaver G, Vincent JA, Nicholson-Weller A et al. Antibody CR1-2B11 recognizes a non-polymorphic epitope of human CR1 (CD35). *Clin Exp Immunol* 2007; 148(3):546-54.
119. Paccaud JP, Carpentier JL, Schifferli JA. Direct evidence for the clustered nature of complement receptors type 1 on the erythrocyte membrane. *J Immunol* 1988; 141(11):3889-94.
120. Chevalier J, Kazatchkine MD. Distribution in clusters of complement receptor type one (CR1) on human erythrocytes. *J Immunol* 1989; 142(6):2031-36.
121. Paccaud JP, Carpentier JL, Schifferli JA. Difference in the clustering of complement receptor type 1 (CR1) on polymorphonuclear leukocytes and erythrocytes: effect on immune adherence. *Eur J Immunol* 1990; 20(2):283-89.
122. Wilson JG, Murphy EE, Wong WW, Klickstein LB, Weis JH, Fearon DT. Identification of a restriction fragment length polymorphism by a CR1 cDNA that correlates with the number of CR1 on erythrocytes. *J Exp Med* 1986; 164(1):50-59.
123. Rodriguez de Cordoba S, Rubinstein P. Quantitative variations of the C3b/C4b receptor (CR1) in human erythrocytes are controlled by genes within the regulator of complement activation (RCA) gene cluster. *J Exp Med* 1986; 164(4):1274-83.
124. Herrera AH, Xiang L, Martin SG, Lewis J, Wilson JG. Analysis of complement receptor type 1 (CR1) expression on erythrocytes and of CR1 allelic markers in caucasian and african american populations. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87(2):176-83.
125. Funkhouser TA, Vik DP. Complement receptor type 1 gene regulation: retinoic acid and cytosine arabinoside increase CR1 expression. *Scand J Immunol* 1999; 49(1):21-28.
126. Funkhouser TA, Vik DP. Mechanism of regulation of complement receptor type 1 transcription by cytosine arabinoside in a pre-erythroid model. *Scand J Immunol* 1999; 49(1):29-37.
127. Kim JH, Lee S, Choe SY. Characterization of the human CR1 gene promoter. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47(4):655-63.
128. Funkhouser T, Vik DP. Promoter activity of the 5' flanking region of the complement receptor type 1 (CR1) gene: basal and induced transcription. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490(1-2):99-05.

129. Kim JH, Lee S, Rho JK, Choe SY. AML1, the target of chromosomal rearrangements in human leukemia, regulates the expression of human complement receptor type 1 (CR1) gene. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(9):933-40.
130. Rho JK, Kim JH, Yu J, Choe SY. Correlation between cellular localization of TEL/AML1 fusion protein and repression of AML1-mediated transactivation of CR1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297(1):91-95.
131. Song H, Kim JH, Rho JK, Park SY, Kim CG, Choe SY. Functional characterization of TEL/AML1 fusion protein in the regulation of human CR1 gene promoter. *Mol Cells* 1999; 9(5):560-63.
132. Cockburn IA, Rowe JA. Erythrocyte complement receptor 1 (CR1) expression level is not associated with polymorphisms in the promoter or 3' untranslated regions of the CR1 gene. *Int J Immunogenet* 2006; 33(1):17-20.
133. Ripoche J, Sim RB. Loss of complement receptor type 1 (CR1) on ageing of erythrocytes. Studies of proteolytic release of the receptor. *Biochem J* 1986; 235(3):815-21.
134. Moldenhauer F, Botto M, Walport MJ. The rate of loss of CR1 from ageing erythrocytes in vivo in normal subjects and SLE patients: no correlation with structural or numerical polymorphisms. *Clin Exp Immunol* 1988; 72(1):74-78.
135. Fishelson Z, Marikovsky Y. Reduced CR1 expression on aged human erythrocytes: immuno-electron microscopic and functional analysis. *Mech Ageing Dev* 1993; 72(1):25-35.
136. Edberg JC, Wright E, Taylor RP. Quantitative analyses of the binding of soluble complement-fixing antibody/dsDNA immune complexes to CR1 on human red blood cells. *J Immunol* 1987; 139(11):3739-47.
137. Lennek R, Baldwin AS Jr, Waller SJ, Morley KW, Taylor RP. Studies of the physical biochemistry and complement-fixing properties of DNA/anti-DNA immune complexes. *J Immunol* 1981; 127(2):602-08.
138. Cosio FG, Shen XP, Hebert LA. Immune complexes bind preferentially to specific subpopulations of human erythrocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 55(3):337-54.
139. Madi N, Paccaud JP, Steiger G, Schifferli JA. Immune complex binding efficiency of erythrocyte complement receptor 1 (CR1). *Clin Exp Immunol* 1991; 84(1):9-15.
140. Ng YC, Schifferli JA, Walport MJ. Immune complexes and erythrocyte CR1 (complement receptor type 1): effect of CR1 numbers on binding and release reactions. *Clin Exp Immunol* 1988; 71(3):481-85.
141. Dorval BL, Cosio FG, Birmingham DJ, Hebert LA. Human erythrocytes inhibit complement-mediated solubilization of immune complexes. *J Immunol* 1989; 142(8):2721-27.
142. Medof ME, Prince GM. Immune complex alterations occur on the human red blood cell membrane. *Immunology* 1983; 50(1):11-18.

143. Medof ME, Prince GM, Oger JJ. Kinetics of interaction of immune complexes with complement receptors on human blood cells: modification of complexes during interaction with red cells. *Clin Exp Immunol* 1982; 48(3):715-25.
144. Varga L, Thiry E, Fust G. BSA-anti-BSA immune complexes formed in the presence of human complement do not bind to autologous red blood cells. *Immunology* 1988; 64(3):381-84.
145. Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, VanAman ME, Birmingham DJ, Waxman FJ. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest* 1983; 71(2):236-47.
146. Waxman FJ, Hebert LA, Cosio FG, Smead WL, VanAman ME, Taguian JM et al. Differential binding of immunoglobulin A and immunoglobulin G immune complexes to primate erythrocytes in vivo. Immunoglobulin A immune complexes bind less well to erythrocytes and are preferentially deposited in glomeruli. *J Clin Invest* 1986; 77(1):82-89.
147. Kimberly RP, Edberg JC, Merriam LT, Clarkson SB, Unkeless JC, Taylor RP. In vivo handling of soluble complement fixing Ab/dsDNA immune complexes in chimpanzees. *J Clin Invest* 1989; 84(3):962-70.
148. Cosio FG, Hebert LA, Birmingham DJ, Dorval BL, Bakaletz AP, Kujala GA et al. Clearance of human antibody/DNA immune complexes and free DNA from the circulation of the nonhuman primate. *Clin Immunol Immunopathol* 1987; 42(1):1-9.
149. Edberg JC, Kujala GA, Taylor RP. Rapid immune adherence reactivity of nascent, soluble antibody/DNA immune complexes in the circulation. *J Immunol* 1987; 139(4):1240-44.
150. Birmingham DJ, Hebert LA, Cosio FG, VanAman ME. Immune complex erythrocyte complement receptor interactions in vivo during induction of glomerulonephritis in nonhuman primates. *J Lab Clin Med* 1990; 116(2):242-52.
151. Lobatto S, Daha MR, Voetman AA, Evers-Schouten JH, Van Es AA, Pauwels EK et al. Clearance of soluble aggregates of human immunoglobulin G in healthy volunteers and chimpanzees. *Clin Exp Immunol* 1987; 69(1):133-41.
152. Schifferli JA, Ng YC, Estreicher J, Walport MJ. The clearance of tetanus toxoid/anti-tetanus toxoid immune complexes from the circulation of humans. Complement- and erythrocyte complement receptor 1-dependent mechanisms. *J Immunol* 1988; 140(3):899-04.
153. Davies KA, Hird V, Stewart S, Sivolapenko GB, Jose P, Epenetos AA et al. A study of in vivo immune complex formation and clearance in man. *J Immunol* 1990; 144(12):4613-20.
154. Madi N, Steiger G, Estreicher J, Schifferli JA. Immune adherence and clearance of hepatitis B surface Ag/Ab complexes is abnormal in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1991; 85(3):373-78.

155. Jepsen HH, Svehag SE, Jensenius JC, Sim RB. Release of immune complexes bound to erythrocyte complement receptor (CR1), with particular reference to the role of factor I. *Scand J Immunol* 1986; 24(2):205-13.
156. Rasmussen JM, Jepsen HH, Svehag SE. Influence of processing by erythrocyte C3b/C4b receptors (CR1) on binding of immune complexes to raji cells and polymorphonuclear granulocytes. *Scand J Immunol* 1987; 26(4):437-44.
157. Medof ME, Lam T, Prince GM, Mold C. Requirement for human red blood cells in inactivation of C3b in immune complexes and enhancement of binding to spleen cells. *J Immunol* 1983; 130(3):1336-40.
158. Emlen W, Burdick G, Carl V, Lachmann PJ. Binding of model immune complexes to erythrocyte CR1 facilitates immune complex uptake by U937 cells. *J Immunol* 1989; 142(12):4366-71.
159. Emlen W, Carl V, Burdick G. Mechanism of transfer of immune complexes from red blood cell CR1 to monocytes. *Clin Exp Immunol* 1992; 89(1):8-17.
160. Taylor RP, Ferguson PJ, Martin EN, Cooke J, Greene KL, Grinspun K et al. Immune complexes bound to the primate erythrocyte complement receptor (CR1) via anti-CR1 mAbs are cleared simultaneously with loss of CR1 in a concerted reaction in a rhesus monkey model. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82(1):49-59.
161. Barbosa JE, Harrison RA, Barker PJ, Lachmann PJ. An anti-peptide antibody that recognizes a neo-antigen in the CR1 stump remaining on erythrocytes after proteolysis. *Clin Exp Immunol* 1992; 87(1):144-49.
162. Cosio FG, Shen XP, Birmingham DJ, Van Aman M, Hebert LA. Evaluation of the mechanisms responsible for the reduction in erythrocyte complement receptors when immune complexes form in vivo in primates. *J Immunol* 1990; 145(12):4198-06.
163. Imrie HJ, Jones DR. Complement coating of erythrocytes is reduced following their interaction with neutrophils in vitro without loss of complement receptor 1 (CR1). *Clin Exp Immunol* 1997; 109(1):217-22.
164. Craig ML, Waitumbi JN, Taylor RP. Processing of C3b-opsonized immune complexes bound to non-complement receptor 1 (CR1) sites on red cells: phagocytosis, transfer, and associations with CR1. *J Immunol* 2005; 174(5):3059-66.
165. O'Shea JJ, Brown EJ, Seligmann BE, Metcalf JA, Frank MM, Gallin JI. Evidence for distinct intracellular pools of receptors for C3b and C3bi in human neutrophils. *J Immunol* 1985; 134(4):2580-87.
166. Kumar A, Wetzler E, Berger M. Isolation and characterization of complement receptor type 1 (CR1) storage vesicles from human neutrophils using antibodies to the cytoplasmic tail of CR1. *Blood* 1997; 89(12):4555-65.

167. Jost C, Klickstein L, Wetzler E, Kumar A, Berger M. Intracellular storage and regulated plasma membrane expression of human complement receptor type 1 in rat basophil leukemia cell transfectants. *Blood* 1998; 92(1):300-09.
168. Turner JR, Tartakoff AM, Berger M. Intracellular degradation of the complement C3b/C4b receptor in the absence of ligand. *J Biol Chem* 1988; 263(10):4914-20.
169. Fearon DT, Kaneko I, Thomson GG. Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1981; 153(6):1615-28.
170. Paccaud JP, Carpentier JL, Schifferli JA. Exudation induces clustering of CR1 receptors at the surface of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172(3):1203-08.
171. Forslid J, Hallden G, Hed J. The inhibition of CR1 mobilization of human granulocytes by the presence of erythrocytes. A possible mechanism for intravascular regulation of granulocyte modulation. *Immunology* 1991; 74(4):685-88.
172. Furebring M, Håkansson L, Venge P, Sjölin J. C5a, interleukin-8 and tumour necrosis factor-alpha-induced changes in granulocyte and monocyte expression of complement receptors in whole blood and on isolated leukocytes. *Scand J Immunol* 2006; 63(3):208-16
173. Nuutila J, Hohenthal U, Laitinen I, Kotilainen P, Rajamäki A, Nikoskelainen J et al. Quantitative analysis of complement receptors, CR1 (CD35) and CR3 (CD11b), on neutrophils improves distinction between bacterial and viral infections in febrile patients: comparison with standard clinical laboratory data. *J Immunol Methods* 2006; 315(1-2):191-01.
174. Pauksens K, Fjaertoft G, Douhan-Håkansson L, Venge P. Neutrophil and monocyte receptor expression in uncomplicated and complicated influenza A infection with pneumonia. *Scand J Infect Dis* 2007; 1-12
175. Cotter MJ, Zaiss AK, Muruve DA. Neutrophils interact with adenovirus vectors via Fc receptors and complement receptor 1. *J Virol* 2005; 79(23):14622-31.
176. Brown EJ. The interaction of small oligomers of complement 3B (C3B) with phagocytes. High affinity binding and phorbol ester-induced internalization by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1989; 264(11):6196-01.
177. Bussolino F, Fischer E, Turrini F, Kazatchkine MD, Arese P. Platelet-activating factor enhances complement-dependent phagocytosis of diamide-treated erythrocytes by human monocytes through activation of protein kinase C and phosphorylation of complement receptor type one (CR1). *J Biol Chem* 1989; 264(36):21711-19.
178. Fallman M, Andersson R, Andersson T. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J Immunol* 1993; 151(1):330-38.
179. Józsi M, Prechl J, Bajtay Z, Erdei A. Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. *J Immunol* 2002; 168(6):2782-88.

180. Nielsen CH, Pedersen ML, Marquart HV, Proding WM, Leslie RG. The role of complement receptors type 1 (CR1, CD35) and 2 (CR2, CD21) in promoting C3 fragment deposition and membrane attack complex formation on normal peripheral human B cells. *Eur J Immunol* 2002; 32(5):1359-67.
181. Leslie RG, Proding WM, Nielsen CH. Complement receptors type 1 (CR1, CD35) and 2 (CR2, CD21) cooperate in the binding of hydrolyzed complement factor 3 (C3i) to human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 2003; 33(12):3311-21.
182. Prodeus AP, Goerg S, Shen LM, Pozdnyakova O, Chu L, Alicot EM et al. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity* 1998; 9(5):721-31.
183. Bottger EC, Hoffmann T, Hadding U, Bitter-Suermann D. Influence of genetically inherited complement deficiencies on humoral immune response in guinea pigs. *J Immunol* 1985; 135(6):4100-07.
184. Birmingham DJ, Shen XP, Hartman JA, Dillon JJ, Hebert LA. Effect of chronic human recombinant erythropoietin therapy on antibody responses to immunization in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 1996; 50(2):543-49.
185. Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol* 1998; 160(11):5273-79.
186. Yoshida K, van den Berg TK, Dijkstra CD. Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* 1993; 80(1):34-39.
187. Tuveson DA, Ahearn JM, Matsumoto AK, Fearon DT. Molecular interactions of complement receptors on B lymphocytes: a CR1/CR2 complex distinct from the CR2/CD19 complex. *J Exp Med* 1991; 173(5):1083-89.
188. Daha MR, Bloem AC, Ballieux RE. Immunoglobulin production by human peripheral lymphocytes induced by anti-C3 receptor antibodies. *J Immunol* 1984; 132(3):1197-01.
189. Weiss L, Delfraissy JF, Vazquez A, Wallon C, Galanaud P, Kazatchkine MD. Monoclonal antibodies to the human C3b/C4b receptor (CR1) enhance specific B cell differentiation. *J Immunol* 1987; 138(9):2988-93.
190. Kerekes K, Prechl J, Bajtay Z, Jozsi M, Erdei A. A further link between innate and adaptive immunity: C3 deposition on antigen-presenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells. *Int Immunol* 1998; 10(12):1923-30.
191. Wagner C, Ochmann C, Schoels M, Giese T, Stegmaier S, Richter R et al. The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes. *Mol Immunol* 2006; 43(6):643-51.
192. Carroll MC, Janeway CA. Innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(1):11-12.

193. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258):50-53.
194. Pascual M, Steiger G, Sadallah S, Paccaud JP, Carpentier JL, James R et al. Identification of membrane-bound CR1 (CD35) in human urine: evidence for its release by glomerular podocytes. *J Exp Med* 1994; 179(3):889-99.
195. Nangaku M. Complement regulatory proteins in glomerular diseases. *Kidney Int* 1998; 54(5):1419-28.
196. Sivasankar B, Dinda AK, Tiwari SC, Srivastava LM, Das N. Modulation of urinary CR1 in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13(4):228-33.
197. Yoon SH, Fearon DT. Characterization of a soluble form of the C3b/C4b receptor (CR1) in human plasma. *J Immunol* 1985; 134(5):3332-38.
198. Sadallah S, Lach E, Lutz HU, Schwarz S, Guerne PA, Schifferli JA. CR1, CD35 in synovial fluid from patients with inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum* 1997; 40(3):520-26.
199. Vedeler CA, Matre R, Sadallah S, Schifferli J. Soluble complement receptor type 1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with guillain-barre syndrome and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996; 67(1):17-20.
200. Pascual M, Duchosal MA, Steiger G, Giostra E, Pechere A, Paccaud JP et al. Circulating soluble CR1 (CD35). Serum levels in diseases and evidence for its release by human leukocytes. *J Immunol* 1993; 151(3):1702-11.
201. Sadallah S, Lach E, Schwarz S, Gratwohl A, Spertini O, Schifferli JA. Soluble complement receptor 1 is increased in patients with leukemia and after administration of granulocyte colony-stimulating factor. *J Leukoc Biol* 1999; 65(1):94-101.
202. Dibona D, Montalto G, Clemenza L, Bascone F, Accardo P, Bellavia D et al. Soluble complement receptor type 1(sCR1) in chronic liver diseases - serum levels at different stages of liver diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 114(1):102-05.
203. Ehlers MR, Riordan JF. Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* 1991; 30(42):10065-74.
204. Hamer I, Paccaud JP, Belin D, Maeder C, Carpentier JL. Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain. *Biochem J* 1998; 329 (1):183-90.
205. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC Jr, Carson GR, Concino MF et al. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 1990; 249(4965):146-51.
206. Moulds JM, Rowe KE. Neutralization of Knops system antibodies using soluble complement receptor 1. *Transfusion* 1996; 36(6):517-20.

207. Moulds JM, Nickells MW, Moulds JJ, Brown MC, Atkinson JP. The C3b/C4b receptor is recognized by the knops, mccoys, swain-langley, and york blood group antisera. *J Exp Med* 1991; 173(5):1159-63.
208. Rao N, Ferguson DJ, Lee SF, Telen MJ. Identification of human erythrocyte blood group antigens on the C3b/C4b receptor. *J Immunol* 1991; 146(10):3502-07.
209. Birmingham DJ, Cosio FG. Characterization of the baboon erythrocyte C3b binding protein. *J Immunol* 1989; 142(9):3140-44.
210. Nickells MW, Subramanian VB, Clemenza L, Atkinson JP. Identification of complement receptor type 1-related proteins on primate erythrocytes. *J Immunol* 1995; 154(6):2829-37.
211. Nickells MW, Atkinson JP. Characterization of CR1- and membrane cofactor protein-like proteins of two primates. *J Immunol* 1990; 144(11):4262-68.
212. Hebert LA, Birmingham DJ, Shen XP, Cosio FG. Stimulating erythropoiesis increases complement receptor expression on primate erythrocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 62(3):301-06.
213. Edberg JC, Kimberly RP, Taylor RP. Functional characterization of non-human primate erythrocyte immune adherence receptors: implications for the uptake of immune complexes by the cells of the mononuclear phagocytic system. *Eur J Immunol* 1992; 22(6):1333-39.
214. Atkinson JP et al. Abstracts of the 8th European Meeting on Complement in Human Disease. 8-12 September 2001. Strasbourg, France. *Mol Immunol* 2001; 38(2-3):77-131.
215. Chen W, Logar CM, Shen XP, Birmingham DJ. The chimpanzee and cynomolgus monkey erythrocyte immune adherence receptors are encoded by CR1-like genes. *Immunogenetics* 2000; 52(1-2):46-52.
216. Birmingham DJ, Cosio FG. Determination of factor I cofactor function of nonhuman primate erythrocyte (E) C3b receptors. *FASEB J* 1990; 4: 2188
217. Birmingham DJ, Hebert LA. CR1 and CR1-like: the primate immune adherence receptors. *Immunol Rev* 2001; 180:100-11.
218. Birmingham DJ, Shen XP, Hourcade D, Nickells MW, Atkinson JP. Primary sequence of an alternatively spliced form of CR1. Candidate for the 75,000 m(r) complement receptor expressed on chimpanzee erythrocytes. *J Immunol* 1994; 153(2):691-00.
219. Birmingham DJ, Logar CM, Shen XP, Chen W. The baboon erythrocyte complement receptor is a glycosphosphatidylinositol-linked protein encoded by a homologue of the human CR1-like genetic element. *J Immunol* 1996; 157(6):2586-92.
220. Li B, Sallee C, Dehoff M, Foley S, Molina H, Holers VM. Mouse crry/p65. Characterization of monoclonal antibodies and the tissue distribution of a functional homologue of human MCP and DAF. *J Immunol* 1993; 151(8):4295-05.

221. Wong WW, Fearon DT. P65: a C3b-binding protein on murine cells that shares antigenic determinants with the human C3b receptor (CR1) and is distinct from murine C3b receptor. *J Immunol* 1985; 134(6):4048-56.
222. Foley S, Li B, Dehoff M, Molina H, Holers VM. Mouse Crry/p65 is a regulator of the alternative pathway of complement activation. *Eur J Immunol* 1993; 23(6):1381-84.
223. Miwa T, Zhou L, Hilliard B, Molina H, Song WC. Crry, but not CD59 and DAF, is indispensable for murine erythrocyte protection in vivo from spontaneous complement attack. *Blood* 2002; 99(10):3707-16.
224. Fernández-Centeno E, de Ojeda G, Rojo JM, Portolés P. Crry/p65, a membrane complement regulatory protein, has costimulatory properties on mouse T cells. *J Immunol* 2000; 164(9):4533-42.
225. Molina H. Complement regulation during pregnancy. *Immunol Res* 2005; 32(1-3):187-92.
226. Fingerhuth JD, Benedict MA, Levy DN, Strominger JL. Identification of murine complement receptor type 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(1):242-46.
227. Molina H, Kinoshita T, Webster CB, Holers VM. Analysis of C3b/C3d binding sites and factor I cofactor regions within mouse complement receptors 1 and 2. *J Immunol* 1994; 153(2):789-95.
228. Kinoshita T, Lavoie S, Nussenzweig V. Regulatory proteins for the activated third and fourth components of complement (C3b and C4b) in mice. II. Identification and properties of complement receptor type 1 (CR1). *J Immunol* 1985; 134(4):2564-70.
229. Kalli KR, Fearon DT. Binding of C3b and C4b by the CR1-like site in murine CR1. *J Immunol* 1994; 152(6):2899-03.
230. Molina H, Wong W, Kinoshita T, Brenner C, Foley S, Holers VM. Distinct receptor and regulatory properties of recombinant mouse complement receptor 1 (CR1) and crry, the two genetic homologues of human CR1. *J Exp Med* 1992; 175(1):121-29.
231. Kinoshita T, Takeda J, Hong K, Kozono H, Sakai H, Inoue K. Monoclonal antibodies to mouse complement receptor type 1(CR1). Their use in a distribution study showing that mouse erythrocytes and platelets are CR1-negative. *J Immunol* 1988; 140(9):3066-72.
232. Quigg RJ, Alexander JJ, Lo CF, Lim A, He C, Holers VM. Characterization of C3-binding proteins on mouse neutrophils and platelets. *J Immunol* 1997; 159(5):2438-44.
233. Quigg RJ, Holers VM. Characterization of rat complement receptors and regulatory proteins. CR2 and crry are conserved, and the C3b receptor of neutrophils and platelets is distinct from CR1. *J Immunol* 1995; 155(3):1481-88.
234. Takizawa H, Okada N, Okada H. Complement inhibitor of rat cell membrane resembling mouse crry/p65. *J Immunol* 1994; 152(6):3032-38.

235. Arsenović-Ranin N, Vučević D, Okada N, Dimitrijević M, Colić M. A monoclonal antibody to the rat Crry/p65 antigen, a complement regulatory membrane protein, stimulates adhesion and proliferation of thymocytes. *Immunology* 2000; 100(3):334-44.
236. Antic Stankovic J, Vučević D, Majstorovic I, Vasilijic S, Colic M. The role of rat Crry, a complement regulatory protein, in proliferation of thymocytes. *Life Sci* 2004; 75(25):3053-62.
237. Watanabe M, Morita Y, Mizuno M, Nishikawa K, Yuzawa Y, Hotta N et al. CD59 protects rat kidney from complement mediated injury in collaboration with crry. *Kidney Int* 2000;58(4):1569-79.
238. Manthei U, Nickells MW, Barnes SH, Ballard LL, Cui WY, Atkinson JP. Identification of a C3b/iC3 binding protein of rabbit platelets and leukocytes. A CR1like candidate for the immune adherence receptor. *J Immunol* 1988; 140(4):1228-35.
239. Moore FD Jr. Crrp: a guinea pig protein, identified by sequence homology to human CR1, which contains two short consensus repeat motifs and appears not to be transmembrane or secreted. *J Immunol* 1991; 147(10):3615-22.
240. Molina H, Kinoshita T, Inoue K, Carel JC, Holers VM. A molecular and immunochemical characterization of mouse CR2. Evidence for a single gene model of mouse complement receptors 1 and 2. *J Immunol* 1990; 145(9):2974-83.
241. Kurtz CB, O'Toole E, Christensen SM, Weis JH. The murine complement receptor gene family. Iv. alternative splicing of CR2 gene transcripts predicts two distinct gene products that share homologous domains with both human CR2 and CR1. *J Immunol* 1990; 144(9):3581-91.
242. Kurtz CB, Paul MS, Aegerter M, Weis JJ, Weis JH. Murine complement receptor gene family. II. Identification and characterization of the murine homolog (Cr2) to human CR2 and its molecular linkage to Crry. *J Immunol* 1989; 143(6):2058-67.
243. Aegerter-Shaw M, Cole JL, Klickstein LB, Wong WW, Fearon DT, Lalley PA et al. Expansion of the complement receptor gene family. Identification in the mouse of two new genes related to the CR1 and CR2 gene family. *J Immunol* 1987; 138(10):3488-94.
244. Kingsmore SF, Vik DP, Kurtz CB, Leroy P, Tack BF, Weis JH et al. Genetic organization of complement receptor-related genes in the mouse. *J Exp Med* 1989; 169(4):1479-84.
245. Christensen SM, Martin BK, Tan SS, Weis JH. Identification of sites for distinct DNA binding proteins including Oct-1 and Oct-2 in the CR2 gene. *J Immunol* 1992; 148(11):3610-17.
246. Hu H, Martin BK, Weis JJ, Weis JH. Expression of the murine CD21 gene is regulated by promoter and intronic sequences. *J Immunol* 1997; 158(10):4758-68.
247. Martin BK, Weis JH. Functional identification of transcription control sequences of the mouse Crry gene. *J Immunol* 1993; 151(2):857-69.

248. Paul MS, Aegerter M, O'Brien SE, Kurtz CB, Weis JH. The murine complement receptor gene family. Analysis of mCRY gene products and their homology to human CR1. *J Immunol* 1989; 142(2):582-89.
249. Holguin MH, Kurtz CB, Parker CJ, Weis JJ, Weis JH. Loss of human CR1- and murine Crry-like exons in human CR2 transcripts due to CR2 gene mutations. *J Immunol* 1990; 145(6):1776-81.
250. Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH. P. Falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement receptor 1. *Nature* 1997; 388(6639):292-95.
251. Chambers DR, Procter J, Muratova O, Byrne K, Keister D, Shanks D et al. In vitro RBC exposure to Plasmodium falciparum has no effect on RBC antigen expression. *Transfus Med* 2002; 12(3):213-19.
252. Williams TN. Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(4):388-94.
253. Rowe JA, Rogerson SJ, Raza A, Moulds JM, Kazatchkine MD, Marsh K et al. Mapping of the region of complement receptor (CR) 1 required for Plasmodium falciparum rosetting and demonstration of the importance of CR1 in rosetting in field isolates. *J Immunol* 2000; 165(11):6341-46.
254. Handunnetti SM, van Schravendijk MR, Hasler T, Barnwell JW, Greenwalt DE, Howard RJ. Involvement of CD36 on erythrocytes as a rosetting receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Blood* 1992; 80:2097-04.
255. Carlson J, Wahlgren M. Plasmodium falciparum erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *J Exp Med* 1992; 176:1311-17.
256. Scholander C, Treutiger CJ, Hultenby K, Wahlgren M. Novel fibrillar structure confers adhesive property to malaria-infected erythrocytes. *Nat Med* 1996; 2:204-08.
257. Clough B, Atilola FA, Black J, Pasvol G. Plasmodium falciparum: the importance of IgM in the rosetting of parasite-infected erythrocytes. *Exp Parasitol* 1998; 89:129-32.
258. Treutiger CJ, Scholander C, Carlson J, McAdam KP, Raynes JG, Falksveden L et al. Rouleaux-forming serum proteins are involved in the rosetting of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Exp Parasitol* 1999; 93:215-24.
259. Cockburn IA, Mackinnon MJ, O'Donnell A, Allen SJ, Moulds JM, Baisor M et al. A human complement receptor 1 polymorphism that reduces Plasmodium falciparum rosetting confers protection against severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(1):272-77.
260. Kawamoto Y, Kojima K, Hitsumoto Y, Okada H, Holers VM, Miyama A. The serum resistance of malaria-infected erythrocytes. *Immunology* 1997; 91(1):7-12.

261. Wahlgren M, Carlson J, Helmby H, Hedlund I, Treutiger CJ. Molecular mechanisms and biological importance of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87(3):323-29.
262. Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B et al. Receptor-specific adhesion and clinical disease in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57(4):389-98.
263. Stoute JA. Complement-regulatory proteins in severe malaria: too little or too much of a good thing? *Trends Parasitol* 2005; 21(5):218-23.
264. Owuor BO, Odhiambo CO, Otieno WO, Adhiambo C, Makawiti DW, Stoute JA. Reduced immune complex binding capacity and increased complement susceptibility of red cells from children with severe malaria-associated anemia. *Mol Med* 2008; 14(3-4):89-97.
265. Helegbe GK, Goka BQ, Kurtzhals JA, Addae MM, Ollaga E, Tetteh JK et al. Complement activation in Ghanaian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J* 2007; 17(6):165.
266. Subramanian VB, Clemenza L, Krych M, Atkinson JP. Substitution of two amino acids confers C3b binding to the C4b binding site of CR1 (CD35). Analysis based on ligand binding by chimpanzee erythrocyte complement receptor. *J Immunol* 1996; 157(3):1242-47.
267. Krych-Goldberg M, Moulds JM, Atkinson JP. Human complement receptor type 1 (CR1) binds to a major malarial adhesin. *Trends Mol Med* 2002; 8(11):531-37.
268. Taylor DW, Wells RA, Vernes A, Rosenberg YJ, Vogel S, Diggs CL. Parasitologic and immunologic studies of experimental *Plasmodium falciparum* infection in nonsplenectomized chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34(1):36-44.
269. Speth C, Kacani L, Dierich MP. Complement receptors in HIV infection. *Immunol Rev* 1997; 159:49-67.
270. Munson LG, Scott ME, Landay AL, Spear GT. Decreased levels of complement receptor 1 (CD35) on B lymphocytes in persons with HIV infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 75(1):20-25.
271. Larcher C, Schulz TF, Hofbauer J, Hengster P, Romani N, Wachter H et al. Expression of the C3d/EBV receptor and of other cell membrane surface markers is altered upon HIV-1 infection of myeloid, T, and B cells. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990; 3(2):103-08.
272. Tausk FA, McCutchan A, Spechko P, Schreiber RD, Gigli I. Altered erythrocyte C3b receptor expression, immune complexes, and complement activation in homosexual men in varying risk groups for acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Invest* 1986; 78(4):977-82.
273. Jouvin MH, Rozenbaum W, Russo R, Kazatchkine MD. Decreased expression of the C3b/C4b complement receptor (CR1) in AIDS and AIDS-related syndromes correlates with clinical subpopulations of patients with HIV infection. *AIDS* 1987; 1(2):89-94.

274. Horakova E, Gasser O, Sadallah S, Inal JM, Bourgeois G, Ziekau I, Klimkait T, Schifferli JA. Complement mediates the binding of HIV to erythrocytes. *J Immunol* 2004; 173(6):4236-41.
275. Sadallah S, Hess C, Trendelenburg M, Vedeler C, Lopez-Trascasa M, Schifferli JA. Autoantibodies against complement receptor 1 (CD35) in SLE, liver cirrhosis and HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 2003; 131(1):174-81.
276. Taylor RP, Ferguson PJ. Primate erythrocyte (e) complement receptor (CR1) as an anchor site for bispecific-based therapies to clear pathogens or autoantibodies safely from the circulation. *J Hematother* 1995; 4(5):357-62.
277. Thomsen BS, Heilmann C, Jacobsen SE, Pedersen FK, Morling N, Jakobsen BK et al. Complement C3b receptors on erythrocytes in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30(9):967-71.
278. Thomsen BS, Oxholm P, Nielsen H, Manthorpe R. Erythrocyte complement C3b receptor (CR1) levels and immune complex-induced manifestations in patients with primary sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 1986; (Supplement. 61):127-30.
279. Wilson JG, Wong WW, Schur PH, Fearon DT. Mode of inheritance of decreased C3b receptors on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1982; 307(16):981-86.
280. Walport MJ, Ross GD, Mackworth-Young C, Watson JV, Hogg N, Lachmann PJ. Family studies of erythrocyte complement receptor type 1 levels: reduced levels in patients with SLE are acquired, not inherited. *Clin Exp Immunol* 1985; 59(3):547-54.
281. Thomsen BS, Nielsen H, Andersen V. Erythrocyte CR1 (C3b/C4b receptor) levels and disease activity in patients with SLE. *Scand J Rheumatol* 1987; 16(5):339-46.
282. Wilson JGRWD, Schur PH, Fearon DT. Decreased expression of the C3b/C4b receptor (CR1) and the C3d receptor (CR2) on B lymphocytes and of CR1 on neutrophils of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1986; 29(6):739-47.
283. Arora V, Verma J, Dutta R, Marwah V, Kumar A, Das N. Reduced complement receptor 1 (CR1,CD35) transcription in systemic lupus erythematosus. *Mol Immunol* 2004; 41(4):449-56.
284. Moldenhauer F, David J, Fielder AH, Lachmann PJ, Walport MJ. Inherited deficiency of erythrocyte complement receptor type 1 does not cause susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1987; 30(9):961-66.
285. Cornillet P, Gredy P, Pennaforte JL, Meyer O, Kazatchkine MD, Cohen JH. Increased frequency of the long (S) allotype of CR1 (the C3b/C4b receptor, CD35) in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1992; 89(1):22-25.
286. Van Dyne S, Holers VM, Lublin DM, Atkinson JP. The polymorphism of the C3b/C4b receptor in the normal population and in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(3):570-79.

287. Reveille JD, Moulds JM, Ahn C, Friedman AW, Baethge B, Roseman J et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: I. The effects of HLA class II, C4, and CR1 alleles, socioeconomic factors, and ethnicity at disease onset. LUMINA Study Group. Lupus in minority populations, nature versus nurture. *Arthritis Rheum* 1998; 41(7):1161-72.
288. Halma C, Breedveld FC, Daha MR, Blok D, Evers-Schouten JH, Hermans J, Pauwels EK, van Es LA. Elimination of soluble <sup>125</sup>I-labeled aggregates of IgG in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of serum IgG and numbers of erythrocyte complement receptor type 1. *Arthritis Rheum* 1991; 34(4):442-52.
289. Wang FS, Chu FL, Jin L, Li YG, Zhang Z, Xu D et al. Acquired but reversible loss of erythrocyte complement receptor 1 (CR1, CD35) and its longitudinal alteration in patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol* 2005; 139(1):112-19.
290. Feinberg BB, Jack RM, Mok SC, Anderson DJ. Low erythrocyte complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression in preeclamptic gestations. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54(6):352-57.
291. Walport M, Ng YC, Lachmann PJ. Erythrocytes transfused into patients with SLE and haemolytic anaemia lose complement receptor type 1 from their cell surface. *Clin Exp Immunol* 1987; 69(3):501-07.
292. Morgan BP, Dankert JR, Esser AF. Recovery of human neutrophils from complement attack: removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis. *J Immunol* 1987; 138(1):246-53.
293. Toney DM, Marciano-Cabral F. Membrane vesiculation of *naegleria fowleri* amoebae as a mechanism for resisting complement damage. *J Immunol* 1994; 152(6):2952-59.
294. Butikofer P, Kuypers FA, Xu CM, Chiu DT, Lubin B. Enrichment of two glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, acetylcholinesterase and decay accelerating factor, in vesicles released from human red blood cells. *Blood* 1989; 74(5):1481-85.
295. Test ST, Mitsuyoshi J. Calcium-loaded erythrocytes have a defect in complement regulation distinct from that resulting from exposure to 2-aminoethylisothiuronium bromide. *Blood* 1995; 86(7):2799-06.
296. Pascual M, Lutz HU, Steiger G, Stammer P, Schifferli JA. Release of vesicles enriched in complement receptor 1 from human erythrocytes. *J Immunol* 1993; 151(1):397-04.
297. Ross GD, Yount WJ, Walport MJ, Winfield JB, Parker CJ, Fuller CR et al. Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. *J Immunol* 1985; 135(3):2005-14.
298. Sim RB. Large-scale isolation of complement receptor type 1 (CR1) from human erythrocytes. Proteolytic fragmentation studies. *Biochem J* 1985; 232(3):883-89.

299. Currie MS, Vala M, Pisetsky DS, Greenberg CS, Crawford J, Cohen HJ. Correlation between erythrocyte CR1 reduction and other blood proteinase markers in patients with malignant and inflammatory disorders. *Blood* 1990; 75(8):1699-04.
300. Pascual M, Danielsson C, Steiger G, Schifferli JA. Proteolytic cleavage of CR1 on human erythrocytes in vivo: evidence for enhanced cleavage in AIDS. *Eur J Immunol* 1994; 24(3):702-08.
301. Dervillez X, Oudin S, Libyh MT, Tabary T, Reveil B, Philbert F et al. Catabolism of the human erythrocyte C3b/C4b receptor (CR1, CD35): vesiculation and/or proteolysis?. *Immunopharmacology* 1997; 38(1-2):129-40.
302. Botto M, So AK, Giles CM, Mason PD, Walport MJ. HLA class I expression on erythrocytes and platelets from patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and from normal subjects. *Br J Haematol* 1990; 75(1):106-11.
303. Takahashi K, Kozono Y, Waldschmidt TJ, Berthiaume D, Quigg RJ, Baron A et al. Mouse complement receptors type 1 (CR1;CD35) and type 2 (CR2;CD21): expression on normal B cell subpopulations and decreased levels during the development of autoimmunity in MRL/lpr mice. *J Immunol* 1997; 159(3):1557-69.
304. Wilson JG, Jack RM, Wong WW, Schur PH, Fearon DT. Autoantibody to the C3b/C4b receptor and absence of this receptor from erythrocytes of a patient with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1985; 76(1):182-90.
305. Hebert LA, Birmingham DJ, Mahan JD, Shen XP, McAllister C, Cosio FG et al. Effect of chronically increased erythrocyte complement receptors on immune complex nephritis. *Kidney int* 1994; 45(2):493-99.
306. Inada Y, Kamiyama M, Kanemitsu T, Ikegami H, Watanabe K, Clark WS et al. In vivo binding of circulating immune complexes by C3b receptors (CR1) of transfused erythrocytes. *Ann Rheum Dis* 1989; 48(4):287-94.
307. Hebert LA, Birmingham DJ, Dillon JJ, Cosio FG, Shen XP. Erythropoietin therapy in humans increases erythrocyte expression of complement receptor type 1 (CD35). *J Am Soc Nephrol* 1994; 4(10):1786-91.
308. Hebert LA, Birmingham DJ, Shen XP, Brandt JT, Sedmak DD, Dillon JJ. Effect of recombinant erythropoietin therapy on autoimmunity in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis* 1994; 24(1):25-32.
309. Makrides SC, Scesney SM, Ford PJ, Evans KS, Carson GR, Marsh HC Jr. Cell surface expression of the C3b/C4b receptor (CR1) protects chinese hamster ovary cells from lysis by human complement. *J Biol Chem* 1992; 267(34):24754-61.
310. Nangaku M, Quigg RJ, Shankland SJ, Okada N, Johnson RJ, Couser WG. Overexpression of crry protects mesangial cells from complement-mediated injury. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8(2):223-33.

311. Till GO, Johnson KJ, Kunkel R, Ward PA. Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1982; 69(5):1126-35.
312. Knechtle SJ, Halperin EC, Murphy CE, Saad T, Abernethy K, Miller D et al. The effect of cyclosporine, total lymphoid irradiation, and cobra venom factor on hyperacute rejection. *J Heart Transplant* 1985; 4(5):541-45.
313. Chavez-Cartaya RE, DeSola GP, Wright L, Jamieson NV, White DJ. Regulation of the complement cascade by soluble complement receptor type 1. Protective effect in experimental liver ischemia and reperfusion. *Transplantation* 1995; 59(7):1047-52.
314. Pruitt SK, Bollinger RR. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute allograft rejection. *J Surg Res* 1991; 50(4):350-55.
315. Hill J, Lindsay TF, Ortiz F, Yeh CG, Hechtman HB, Moore FD Jr. Soluble complement receptor type 1 ameliorates the local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *J Immunol* 1992; 149(5):1723-28.
316. Lehmann TG, Koeppl TA, Kirschfink M, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G et al. Post S. Complement inhibition by soluble complement receptor type 1 improves microcirculation after rat liver transplantation. *Transplantation* 1998; 66(6):717-22.
317. Pemberton M, Anderson G, Vetvicka V, Justus DE, Ross GD. Microvascular effects of complement blockade with soluble recombinant CR1 on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. *J Immunol* 1993; 150(11):5104-13.
318. Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH. Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol* 1996; 149(6):2055-66.
319. Pratt JR, Harmer AW, Levin J, Sacks SH. Influence of complement on the allospecific antibody response to a primary vascularized organ graft. *Eur J Immunol* 1997; 27(11):2848-53.
320. Pratt JR, Hibbs MJ, Laver AJ, Smith RA, Sacks SH. Allograft immune response with sCR1 intervention. *Transpl Immunol* 1996; 4(1):72-75.
321. Schmid RA, Zollinger A, Singer T, Hillinger S, Leon-Wyss JR, Schob OM et al. Effect of soluble complement receptor type 1 on reperfusion edema and neutrophil migration after lung allotransplantation in swine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116(1):90-97.
322. Pierre AF, Xavier AM, Liu MY, Cassivi SD, Lindsay TF, Marsh HC et al. Effect of complement inhibition with soluble complement receptor 1 on pig allotransplant lung function. *Transplantation* 1998; 66(6):723-32.
323. Li JS, Jagers J, Anderson PA. The use of TP10, soluble complement receptor 1, in cardiopulmonary bypass. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006; 4(5):649-54.

324. Candinas D, Lesnikoski BA, Robson SC, Miyatake T, Scesney SM, Marsh HCJ et al. Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. *Transplantation* 1996; 62(3):336-42.
325. Pruitt S, Bollinger RR, Collins BH, Marsh HC, Levin JL, Rudolph AR et al. Continuous complement (C) inhibition using soluble C receptor type 1 (sCR1): effect on hyperacute rejection (HAR) of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplant Proc* 1996; 28(2):756.
326. Lucchesi BR, Kilgore KS. Complement inhibitors in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Immunopharmacology* 1997; 38(1-2):27-42.
327. Tan B, Lan YJ, Zhang DC. Protective effects of recombinant SCR15-18 domain of human soluble complement receptor type 1 on myocardial ischemia and reperfusion injury. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2007; 35(11):1037-40.
328. Lazar HL, Bokesch PM, van Lenta F, Fitzgerald C, Emmett C, Marsh HC Jr et al. OBE and the TP10 Cardiac Surgery Study Group. Soluble human complement receptor 1 limits ischemic damage in cardiac surgery patients at high risk requiring cardiopulmonary bypass. *Circulation* 2004; 110(11 Suppl 1):274-79.
329. Lazar HL, Keilani T, Fitzgerald CA, Shapira OM, Hunter CT, Shemin RJ et al. TP10 Cardiac Surgery Study Group. Beneficial effects of complement inhibition with soluble complement receptor 1 (TP10) during cardiac surgery: is there a gender difference? *Circulation* 2007; 116(11 Suppl):183-88.
330. Yazdanbakhsh K, Kang S, Tamasauskas D, Sung D, Scaradavou A. Complement receptor 1 inhibitors for prevention of immune-mediated red cell destruction: potential use in transfusion therapy. *Blood* 2003; 101(12):5046-52.
331. Quigg RJ, Kozono Y, Berthiaume D, Lim A, Salant DJ, Weinfeld A et al. Blockade of antibody-induced glomerulonephritis with Crry-Ig, a soluble murine complement inhibitor. *J Immunol* 1998; 160(9):4553-60.
332. Harris CL, Williams AS, Linton SM, Morgan BP. Coupling complement regulators to immunoglobulin domains generates effective anti-complement reagents with extended half-life in vivo. *Clin Exp Immunol* 2002; 129(2):198-207
333. Reist CJ, Wright JD, Labuguen RH, Taylor RP. Human IgG in immune complexes bound to human erythrocyte CR1 is recognized differently than human IgG bound to an erythrocyte surface antigen. *J Immunol Methods* 1993; 163(2):199-208.
334. Kuhn SE, Nardin A, Klebba PE, Taylor RP. Escherichia coli bound to the primate erythrocyte complement receptor via bispecific monoclonal antibodies are transferred to and phagocytosed by human monocytes in an in vitro model. *J Immunol* 1998; 160(10):5088-97.
335. Iking-Konert C, Stocks S, Weinsberg F, Engelbrecht R, Bleck E, Perniok A et al. First clinical trials of a new heteropolymer technology agent in normal healthy volunteers and patients with systemic lupus erythematosus: safety and proof of principle of the antigen-heteropolymer ETI-104. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(9):1104-12.

336. Voynova E, Tchobanov A, Prechl J, Nikolova M, Baleva M, Erdei A et al. An antibody-based construct carrying DNA-mimotope and targeting CR1(CD35) selectively suppresses human autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett* 2008 [publication en cours].
337. Steinbuch M, Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch Biochem Biophys* 1969; 134(2):279-84.
338. Haynes JD, Diggs CL, Hines FA, Desjardins RE. Culture of human malaria parasites *Plasmodium falciparum*. *Nature* 1976; 263(5580):767-69.
339. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. 1976. *J Parasitol* 2005; 91(3):484-86.
340. Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. Evolutionary relatedness of some primate models of *Plasmodium*. *Mol Biol Evol* 1993; 10(4):914-23.
341. Kato H, Horikoshi M, Roeder RG. Repression of HIV-1 transcription by a cellular protein. *Science* 1991; 251:1476-79.
342. Allen RD 3rd, Kim HK, Sarafova SD, Siu G. Negative regulation of CD4 gene expression by a HES-1-c-Myb complex. *Mol Cell Biol* 2001; 21(9):3071-82.
343. Jacobs-Helber SM, Wickrema A, Birrer MJ, Sawyer ST. AP1 regulation of proliferation and initiation of apoptosis in erythropoietin-dependent erythroid cells. *Mol Cell Biol* 1998; 18(7):3699-07.
344. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* 1995; 9(24):3136-48.
345. Tomita K, Hattori M, Nakamura E, Nakanishi S, Minato N, Kageyama R. The bHLH gene *Hes1* is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev* 1999; 13(9):1203-10.
346. Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H, Honjo T. Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274(11):7238-44.
347. Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Saito T, Masuda S et al. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* 2003; 101(5):1777-83.
348. Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata T, Hosoya N, Saito T et al. Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood* 2001; 98:3283.
349. Levanon D, Goldstein RE, Bernstein Y, Tang H, Goldenberg D, Stifani S et al. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(20):11590-95.

350. Usenko T, Kukushkin A, Pospelova T, Pospelov V. Transient expression of E1A and Ras oncogenes causes downregulation of c-fos gene transcription in nontransformed REF52 cells. *Oncogene* 2003; 22(48):7661-66.
351. Hsu EC, Dörig RE, Sarangi F, Marcil A, Iorio C, Richardson CD. Artificial mutations and natural variations in the CD46 molecules from human and monkey cells define regions important for measles virus binding. *J Virol* 1997; 71(8):6144-54.
352. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001; 71(5):652-58.
353. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11(6):609-18.
354. Magil AB, Tinckam K. Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 2003; 63(5):1888-93.
355. Sund S, Reisaeter AV, Scott H, Mollnes TE, Hovig T. Glomerular monocyte/macrophage influx correlates strongly with complement activation in 1-week protocol kidney allograft biopsies. *Clin Nephrol* 2004; 62(2):121-30.
356. Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int* 2005; 68(4):1866-74.
357. Magil AB, Tinckam KJ. Focal peritubular capillary C4d deposition in acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5):1382-88.
358. Desvaux D, Le Gouvello S, Pastural M, Abtahi M, Suberbielle C, Boeri N et al. Acute renal allograft rejections with major interstitial oedema and plasma cell-rich infiltrates: high gamma-interferon expression and poor clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(4):933-39.
359. Fidler ME, Gloor JM, Lager DJ, Larson TS, Griffin MD, Textor SC et al. Histologic findings of antibody-mediated rejection in ABO blood-group-incompatible living-donor kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4(1):101-07.
360. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005; 352(6):558-69.
361. Vallhonrat H, Williams WW, Dec GW, Keck S, Schoenfeld D, Cosimi AB et al. Complement activation products in plasma after heart transplantation in humans. *Transplantation* 2001; 71(9):1308-11.
362. Pratt JR, Shires M, Affleck LJ, Parker MD, Corps CL, Crellin D et al. Ultrastructural resolution of complement deposition in renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2006; 6(Suppl 2):471.

363. Manderson AP, Pickering MC, Botto M, Walport MJ, Parish CR. Continual low-level activation of the classical complement pathway. *J Exp Med* 2001; 194(6):747-56.
364. Law SK, Dodds AW. C3, C4 and C5: the thioester site. *Biochem Soc Trans* 1990; 18(6):1155-59.
365. Freedman J, Barefoot C. Red blood cell-bound C3d in normal subjects and in random hospital patients. *Transfusion* 1982; 22(6):511-14.
366. Merry AH, Thomson EE, Rawlinson VI, Stratton F. The quantification of C3 fragments on erythrocytes: estimation of C3 fragments on normal cells, acquired haemolytic anaemia cases and correlation with agglutination of sensitized cells. *Clin Lab Haematol* 1983; 5(4):387-97.
367. Rosenfield RE, Jagathambal. Antigenic determinants of C3 and C4 complement components on washed erythrocytes from normal persons. *Transfusion* 1978; 18(5):517-23.
368. Freedman J, Ho M, Barefoot C. Red blood cell-bound C3d in selected hospital patients. *Transfusion* 1982; 22(6):515-20.
- 369 Giles CM, Davies KA, Walport MJ. In vivo and in vitro binding of C4 molecules on red cells: a correlation of numbers of molecules and agglutination. *Transfusion* 1991; 31(3):222-28.

KISSERLI Aymric

Distribution, rôle et régulation du CR1 (CD35, récepteur pour le C3b/C4b) érythrocytaire.  
Analyse de dépôts érythrocytaires de fractions du complément.

---

Résumé

Le CR1 (CD35 / récepteur pour le C3b/C4b) est une glycoprotéine transmembranaire présente à la surface de nombreux types cellulaires. Son rôle principal à la surface des érythrocytes (E) est le transport des complexes immuns (CI) vers le foie et la rate où ils sont éliminés. La fixation des CI aux E est favorisée par la répartition en bouquets de CR1 à la surface des E qui permet une liaison multivalente de forte avidité.

Nous avons montré que le Macaque rhésus (*Macaca mulatta*) exprime un CR1 transmembranaire équivalent à celui de l'Homme en taille, en densité et réparti en bouquets. Ce CR1 de « type humain » présente des polymorphismes allotypiques. Il exprime aussi un CR1 plus court appelé *CR1like* (CR1L), plus abondant, plus diffus, à ancrage glycophosphatidylinositol.

Nous avons mis en évidence des polymorphismes de la région SI<sup>a</sup> de CR1 impliquée dans les phénomènes d'adhérence inter-érythrocytaire entre les E parasités par *P. falciparum* et les E sains chez 12 espèces de primates. Nous avons montré qu'ils ne protègent pas les E de Macaque rhésus contre la formation des rosettes avec des E humains parasités

Nous avons séquencé les promoteurs des gènes CR1 et CR1L de Macaque rhésus (MCR1, MCR1L). AML1 connu comme activateur du gène CR1 humain est présent dans le promoteur de MCR1 mais absent de celui de MCR1L. Ets et MZF1 sont conservés. HES1 et LBP1 pourraient réguler négativement MCR1 et CR1L humain. Nous avons identifié un polymorphisme allélique correspondant à une délétion de 18 nucléotides dans le promoteur de CR1L humain.

Nous avons étudié le dépôt de C4d à la surface des E (EC4d) de patients transplantés rénaux concomitamment à l'analyse de la biopsie du greffon, réalisée le plus souvent pour une suspicion de rejet aigu. Il existe une relation entre le marquage EC4d et le marquage diffus C4d des capillaires péri-tubulaires du greffon ; et entre le marquage EC4d et les lésions histologiques retrouvées en situation de rejet aigu humoral. Il semble donc au vu de ces résultats que le EC4d offre un intérêt certain pour le diagnostic et le suivi des rejets en transplantation rénale. Le mécanisme des dépôts de C4d reste à élucider. Il ne semble ni faire intervenir l'activation de la voie classique du complément, ni les infiltrats cellulaires habituels.

---

Discipline- Spécialité Doctorale : Immunologie, Biotechnologie.

---

Mots-Clés

Complément C4

CR1

Erythrocytes

Régulation de l'expression des gènes

Rejet de greffe

Transplantation rein

---

Intitulé et adresse de l'UFR ou du Laboratoire

Laboratoire d'Immunologie EA 3798

Pole Biomolécule IFR53

UFR Médecine

Université de Reims Champagne-Ardenne